



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS PROGRAMA MULTI-
INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LUCIANA LIMA DE BRITO CÁUPER

DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO E DERIVADOS ISOLADOS DE
RIZÓBACTÉRIAS E *Trichodermas* spp.

MANAUS – AMAZONAS

2018

LUCIANA LIMA DE BRITO CÁUPER

DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO E DERIVADOS ISOLADOS DE
RIZÓBACTÉRIAS E *Trichodermas* spp.

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas
(PPGBiotec).

Orientador: Prof Dr Luiz Antonio de Oliveira

**MANAUS
2018**

Ficha Catalográfica

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

Cáuper, Luciana Lima de Brito
C999d Degradação de petróleo e derivados por isolados de rizobactérias e Trichodermas spp. / Luciana Lima de Brito Cáuper. 2018
169 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Luiz Antonio de Oliveira
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Biodegradação. 2. Rizóbios. 3. Petróleo. 4. Enzimas. I. Oliveira, Luiz Antonio de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Ofereço

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

Dedico

*Ao meu filho Lucas, por todo amor incondicional proporcionado nessa missão
honrosa, que é a de ser mãe; aos meus pais Givaldo
"in memoriam" e Lúcia, pelo
exemplo de vida, ensinamentos, apoio e
amor. Ao meu esposo Fábio Cáuper pela compreensão
e companheirismo em todos os
momentos e, aos
meus irmãos Genário e Gustavo pela
demonstração de amizade e amor.*

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Beleki)

Agradecimentos

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

Aos meus pais, pelo amor incondicional e credibilidade de sempre, que foram e são referências de uma base familiar forte e consolidada, que me serviram de alicerce para que eu concretizasse mais esse projeto de vida.

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

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

Aos meus irmãos Genário e Gustavo, sobrinhos Carlos Gustavo e Júlia e Cunhadas Carla e Débora por toda a amizade e amor dispensados, pessoas especiais que mesmo distante se fazem presente em todos os momentos da minha vida.

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

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

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

A todos os meus amigos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a conclusão de mais essa etapa de minha vida; em especial e de coração, aos amigos do Laboratório, Francisco, Nadionara, Karen Kelly, Mirna e Thaíssa, por toda a contribuição nas atividades do laboratório e pela amizade incondicional.

Ao Instituto Federal do Amazonas – IFAM, por apoiar nas atividades finais desse trabalho, nos cedendo a infra-estrutura, em especial ao apoio técnico do Professor Anderson do Laboratório Técnico de Alimentos, da Técnica Sheyla e Estagiária Raquel.

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

A minha sogra Ivana Moreira por todo aconselhamento nos momentos difíceis.

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

Muitíssimo obrigada !!!

4. LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABI – Applied Biosystems

ANP – Agência Nacional do Petróleo

AO – Água em óleo

AT – Altura total dos líquidos

BDA – Batata-Dextrose-Ágar

BH – Bushnell Haas

BLAST – Basic Local Alignment Searching Tool

CE – Camada Emulsificante

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

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

HPAs – Hidrocarbonetos Policíclico Aromático

H₂O -

IARC – International Agency for Research on Câncer

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

IE – Índice de Emulsificação

NCBI – National Center for Biotechnology Information

N₂ – Nitrogênio Atmosférico

NH₄⁺ - Amônia

OA – Óleo em água

pH – Potencial hidrogeniônico

RDP – Ribossomal Database Project

REMAN – Refinaria de Manaus

rpm – Rotação por minuto

SMY – Sais do meio YM

UFC – Unidade formadora de colônia

μL - Microlitro

YMA – Yeast Manitol Agar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção de derivados de petróleo nas refinarias do Estado do Amazonas – 2015 .	26
Figura 2: Esquema geral das etapas para definição e implementação de um processo de biorremediação (Adaptado de Gaylarde, 2005).....	28
Figura 3: Rotas de biodegradação de alcanos para micro-organismos aeróbios e anaeróbios (adaptado de WENTZEL et al., 2007).....	29
Figura 4: Ilustração do Método de riscagem para avaliação do crescimento de bactérias	48
Figura 5: Valores para crescimento de bactérias	48
Figura 6 - Esquema ilustrativo da atividade de emulsificação.	52
Figura 7: (a) colônia de rizóbio (estirpe INPA R293) em meio YMA, a esquerda, e (b) bactéria Gram-negativa em forma de bastonete, a direita	55
Figura 8: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA com manitol como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.	65
Figura 9: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo óleo diesel como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.	69
Figura 10: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo gasolina como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação	73
Figura 11: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo nafta como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.....	77
Figura 12: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo querosene como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação	81
Figura 13: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo óleo lubrificante como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.	85
Figura 14: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio (A) YMA sem manitol e contendo óleo lubrificante e (B) manitol como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação	86
Figura 15: Demonstração do teste de biodegradação, utilizando o indicador DCPIP, onde A é o controle sem descoloração do indicador; B gasolina com 72 horas de incubação; C nafta com 72 horas; D óleo lubrificante com 72 horas; E diesel com 72 horas e F querosene	88
Figura 16: Biodegradação de derivados de petróleo e manitol por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP.....	98
Figura 17: Índice de Emulsificação (IE) de diferentes tratamentos em Meio SYM com petróleo como fonte de carbono, com biossurfactante de rizobactérias.	114
Figura 18: Índice de Emulsificação (IE) de diferentes tratamentos em Meio INPA com petróleo como fonte de carbono, com biossurfactante de rizobactérias.	114
Figura 19: Comparativo de crescimento entre os tratamentos, com diluição de 10^2 , utilizando solo estéril e petróleo como fonte de carbono.	117
Figura 20: Comparativo de crescimento entre os tratamentos, com diluição de 10^5 , utilizando solo estéril e petróleo como fonte de carbono.	119
Figura 21: Comparativo de crescimento entre os tratamentos, com diluição de 10^2 , utilizando solo não estéril e petróleo como fonte de carbono.	120
Figura 22: Comparativo de crescimento entre os tratamentos, com diluição de 10^5 , utilizando solo não estéril e petróleo como fonte de carbono	122
Figura 23: Biodegradação de derivados de petróleo e INPA por <i>Trichoderma</i> spp. utilizando o indicador redox DCPIP.....	139

Figura 24: Biodegradação de derivados de petróleo e BH por *Trichoderma* spp. utilizando o indicador redox DCPIP..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25: : Índice de Emulsificação (IE) de diferentes tratamentos em Meio BH com petróleo como fonte de carbono, com biossurfactante de trichoderma 144

Figura 26: Índice de Emulsificação (IE) de diferentes tratamentos em Meio INPA com petróleo como fonte de carbono, com biossurfactante de trichoderma 144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rizobactérias reativados e capazes de utilizar petróleo como fonte de carbono e seus respectivos locais de coleta.....	41
Tabela 2: Rizobactérias adquiridas através do isolamento de nódulos de leguminosas e seus respectivos locais de coleta.....	43
Tabela 3: Descrição utilizada para caracterizar morfologicamente bactérias conforme Vincent (1979) e et al. (1997)	46
Tabela 4: Faixa de pontuação para avaliação do crescimento bacteriano utilizando o meio YMA com manitol e YMA s/ manitol e com derivados do petróleo	48
Tabela 5: Consórcios de microrganismos utilizados nos testes de produção de biossurfactantes.	50
Tabela 6 - Convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante.	52
Tabela 7: Morfologia de estirpes de rizobactérias.....	56
Tabela 8: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o manitol como fonte de carbono	62
Tabela 9: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo diesel como fonte de carbono	66
Tabela 10: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o gasolina como fonte de carbono	70
Tabela 11: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o nafta como fonte de carbono	74
Tabela 12: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o querosene como fonte de carbono	78
Tabela 13: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo lubrificante como fonte de carbono	81
Tabela 14: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e o manitol como fonte de carbono em meio líquido.....	89
Tabela 15: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e o óleo diesel como fonte de carbono em meio líquido.....	90
Tabela 16: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e gasolina como fonte de carbono em meio líquido.....	92
Tabela 17: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e o querosene como fonte de carbono em meio líquido.....	93
Tabela 18: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e nafta como fonte de carbono em meio líquido	94
Tabela 19: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e óleo lubrificante como fonte de carbono em meio líquido...	96
Tabela 20: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL ⁻¹), em meio líquido, com manitol como fonte de carbono	100
Tabela 21: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL ⁻¹), em meio líquido, com óleo diesel como fonte de carbono	101
Tabela 22: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL ⁻¹), em meio líquido, com gasolina como fonte de carbono.....	103
Tabela 23: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL ⁻¹), em meio líquido, com querosene como fonte de carbono	104
Tabela 24: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL ⁻¹), em meio líquido, com nafta como fonte de carbono	106

Tabela 25: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL ⁻¹), em meio líquido, com óleo lubrificante como fonte de carbono.....	107
Tabela 26 - Identificação dos isolados com base na comparação de sequência de 16 rDNA obtida com outras depositadas no banco de dados <i>GenBank</i> (análise BLASTn).....	110
Tabela 27: Espessura da camada emulsificante (CE) de estirpes de rizobactérias usando duas soluções de sais diferentes e petróleo como fontes de carbono.....	112
Tabela 28: Densidade Óptica - Atividade emulsificante de estirpes de rizobactérias usando duas soluções de sais diferentes e petróleo como fonte de carbono.....	112
Tabela 29: Índice de Emulsão de rizobactérias	113
Tabela 30: Avaliação do pH durante o teste de avaliação do potencial de emulsificação – Meio SYM e/ou INPA com petróleo e inóculo	115
Tabela 31: Crescimento de rizobactérias em solo estéril, utilizando o meio nutricional INPA, com diluição de 10^2	117
Tabela 32: Crescimento de rizobactérias em solo estéril, utilizando o meio nutricional INPA com diluição de 10^5	118
Tabela 33: Crescimento de rizobactérias em solo não estéril, utilizando o meio nutricional INPA com diluição de 10^2	120
Tabela 34: Crescimento de rizobactérias em solo não estéril, utilizando o meio nutricional INPA com diluição de 10^5	121
Tabela 35: Isolados de trichoderma.....	130
Tabela 36: Classificação quanto a descoloração do DCPIP	131
Tabela 37: Convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante.....	132
Tabela 38: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. utilizando o indicador DCPIP e meio INPA líquido (Controle)	133
Tabela 39: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. utilizando o indicador DCPIP, meio INPA líquido e gasolina como fonte de carbono..	134
Tabela 40: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. utilizando o indicador DCPIP, meio INPA líquido e nafta como fonte de carbono	135
Tabela 41: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. utilizando o indicador DCPIP, meio INPA líquido e óleo diesel como fonte de carbono	135
Tabela 42: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. utilizando o indicador DCPIP, meio INPA líquido e querosene como fonte de carbono	136
Tabela 43: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. utilizando o indicador DCPIP, meio INPA líquido e óleo lubrificante como fonte de carbono	137
Tabela 44: Avaliação do pH durante o teste de avaliação do potencial de emulsificação – Meio BH e/ou INPA com petróleo e inóculo.	141
Tabela 45: Espessura da camada emulsificante (CE), de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. usando duas soluções de sais diferentes e petróleo como fonte de carbono	141
Tabela 46: Densidade Óptica - Atividade emulsificante de estirpes de <i>Trichoderma</i> spp. usando duas soluções de sais diferentes e petróleo como fonte de carbono.....	142
Tabela 47: Índice de Emulsão de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	143

SUMÁRIO

RESUMO	16
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 JUSTIFICATIVA	20
2. OBJETIVOS	22
2.1.1 Objetivo geral	22
2.1.2 Objetivos específicos	22
2.2 REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.2.1 Petróleo e seus derivados e impactos causados pela deposição de seus compostos no meio ambiente.	23
2.2.2 Biorremediação de ambientes impactados por petróleo e seus derivados.....	26
2.2.3 Biossurfactantes.....	30
2.2.4 Micro-organismos de Solo	31
RESUMO	38
3 METODOLOGIA.....	41
3.1 REATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS	41
3.2 COLETA DE NÓDULOS PARA OBTENÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS	42
3.3 COLORAÇÃO DE GRAM	45
3.4 MORFOLOGIA DAS RIZOBACTÉRIAS	46
3.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE MICRO-ORGANISMOS	46
3.6 TESTE DE DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO POR ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS.	47
3.7 BIODEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO, UTILIZANDO A TÉCNICA DO INDICADOR REDOX 2,6 DICLOROFENOL-INDOFENOL - DCPIP	49
3.8 PREPARO DE MICRO-ORGANISMOS PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE	49
3.8.1 Montagem e avaliação do teste.....	49
3.9 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELOS ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS E CONSÓRCIOS FORMADOS ATRAVÉS DESTES	50
3.10 FORMAÇÃO DOS CONSÓRCIOS	50
3.10.1 Avaliação da atividade de emulsificação.....	51
3.11 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM DIFERENTES MEIOS NUTRICIONAIS.....	52
3.12 ANÁLISE DE ÓLEO E GRAXA RESIDUAL	53
3.12.1 Procedimentos analíticos	53
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 MORFOLOGIAS DAS RIZÓBACTÉRIAS	55
4.2 TESTE DE DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO EM MEIO SÓLIDO	61
4.2.1 Fonte de carbono - Óleo Diesel	65
4.2.2 Fonte de carbono – Gasolina	69
4.2.3 Fonte de carbono – Nafta.....	73
4.2.4 Fonte de carbono – Querosene	77
4.2.5 Fonte de carbono – Óleo Lubrificante.....	81

4.3	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO, UTILIZANDO O INDICADOR REDOX – DCPIP.....	87
4.3.1	Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em óleo diesel.....	90
4.3.2	Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em gasolina.....	91
4.3.3	Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em querosene.....	93
4.3.4	Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em nafta.....	94
4.3.5	Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em óleo lubrificante...	95
4.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS SELECIONADOS NO TESTE DO DCPIP.....	110
4.5	PRODUÇÃO DE BISSURFACTANTES PELOS CONSÓRCIOS FORMADOS	110
4.6	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE SOLO.....	116
5	CONCLUSÕES.....	123
6	INTRODUÇÃO.....	127
7	OBJETIVOS.....	129
7.1	Objetivo Geral.....	129
7.2	Objetivos Específicos.....	129
8.	METODOLOGIA.....	130
8.1	REATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS.....	130
8.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS.....	130
8.3	PRODUÇÃO DE BISSURFACTANTES.....	131
8.3.1	Avaliação da atividade de emulsificação.....	132
8.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	132
9.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	133
9.1	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO, UTILIZANDO O INDICADOR REDOX – DCPIP.....	133
9.1.1	Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em gasolina.....	133
9.1.2	Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em nafta.....	134
9.1.3	Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em óleo diesel.....	135
9.1.4	Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em querosene.....	136
9.1.5	Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em óleo lubrificante.....	137
9.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO.....	140
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146
	ANEXOS.....	167

RESUMO

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros compostos. A contaminação ambiental por esta substância e por seus derivados causa impacto ecológico, que vêm sendo minimizado por técnicas de remediação. A biorremediação é uma dessas técnicas que emprega micro-organismos ou suas enzimas para destoxificar ambientes contaminados. Rizóbios fazem parte da população microbiana do solo e seu estudo poderá ter grande valor econômico para a biorremediação. Estudos já realizados com esse grupo de bactérias mostraram que apresentam a habilidade de usarem petróleo como fonte de carbono e, por serem não patogênicos a animais e plantas, apresentam potencial de uso na descontaminação de ambientes contaminados com esse produto. Este trabalho tem como objetivo testar a capacidade de isolados de rizóbios em degradar petróleo e seus derivados, adquirir informações sobre as enzimas atuantes suas preferências metabólicas, indicando os mais aptos para serem utilizados no processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo. Através dos testes de degradação em meio sólido foram selecionadas 53 bactérias que atingiram notas elevadas no sexto dia de crescimento demonstrando com isso, que essas mesmas são potenciais degradadores de hidrocarbonetos. Após os testes em meio líquido utilizando o indicador Diclorofenol Indofenol – DCPIP foram selecionados um total de 41 isolados que apresentaram descoloração total durante seis dias de incubação com os derivados, mostrando-se bastante eficazes na degradação de hidrocarbonetos.

Palavras-chave – Biodegradação, rizóbio, petróleo, enzimas.

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO

O petróleo bruto e produtos do petróleo são misturas complexas de estruturas variáveis que exibem uma ampla variedade de propriedades físicas, compreendendo os compostos de hidrocarbonetos, responsável por 50-98% do total da composição, e os compostos sem hidrocarbonetos, contendo enxofre, nitrogênio, oxigênio e vários metais (TYAGI et al., 2011)

A presença desses compostos no solo e sedimentos, causado principalmente por derrame acidental ou descarte irregular, despertou grande preocupação em autoridades ambientais e pesquisadores, uma vez que, comprometem a sobrevivência de muitas espécies, e ainda estão associados com o aumento de incidência de diversos tipos de cânceres no homem (WEBER e SANTOS, 2013). Esses compostos podem causar uma gama de ameaças para a saúde humana e ambiental, alterando o equilíbrio ecológico (COHEN et al., 2013)

Na tentativa de fazer reparo adequado em áreas contaminadas, utiliza-se uma técnica muito explorada nas últimas décadas conhecida como biorremediação. Essa tecnologia compreende o processo de transformação e/ou degradação de compostos tóxicos para torná-lo ecologicamente inofensivo. Esse processo é feito através do emprego de micro-organismos inerentes ao próprio meio ambiente e adaptáveis ao produto contaminante. A eficiência da biorremediação é limitada se as condições físico-química não forem favoráveis à sobrevivência e à atividade de micro-organismos degradadores. É portanto, necessário um rigoroso controle e definição de parâmetros para aplicação dessa técnica (JACQUES, 2010).

Trabalhos realizados, constataram que os diferentes compostos de hidrocarbonetos nem sempre são degradados em igual proporção pelo mesmo micro-organismo, defendendo assim, a ideia de que cada espécie é responsável por degradar um tipo de componente do óleo fazendo-se necessário o uso de consórcios para melhorar a eficiência da biorremediação (WEBER e SANTOS, 2013).

Rizaobactérias podem ser simbióticas e de vida livre, e são considerados essenciais ao ecossistema de plantas por meio de vários mecanismos tais como a biodisponibilidade de elementos de crescimento como o nitrogênio, fosforo e possivelmente ferro, degradação de matéria orgânica, indução de crescimento via síntese de fitormônios, e controle biológico (VESSEY, 2003; LUDWIG et al. 2013). Por fazerem parte da população microbiana do solo, seu estudo pode conduzir à descoberta de estirpes de grande valor econômico para serem usadas na biorremediação de ambientes contaminados com compostos de petróleo, visto que são adaptadas ao ambiente local, bem como podem mostrar maior eficiência, habilidade

competitiva e tolerância às condições de estresse. Esses micro-organismos empregados no processo de biorremediação despertam interesse em pesquisas por fazerem parte da população microbiana do próprio solo contaminado, e por possuírem enzimas também capazes de degradar componentes do óleo. Estudos já realizados com rizobactérias mostraram que apresentam a habilidade de usarem petróleo como fonte de carbono e, por possuírem classes que não são patogênicas a animais e plantas, apresentam potencial de uso na descontaminação de ambientes impactados com esse contaminante ou seus derivados, o que poderá ter grande valor econômico e ambiental.

A habilidade dos micro-organismos, como os fungos, de adaptar rapidamente o seu metabolismo a diversas fontes de carbono e energia é um fator essencial para sua sobrevivência. Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por sintetizarem diversos metabólitos secundários, como inibidores de fitopatógenos antimicrobianos, produtores de fitohormônios e enzimas como a celulase e a amilase (PANDEY et al. 2000; CHANDRA et al. 2009). Estes vivem livremente no meio ambiente ou parasitando outras espécies de fungos, sendo colonizadores de sucesso de seus habitats. Esta característica deve-se à sua potente maquinaria de degradação do substrato, que é realizada através de suas enzimas extracelulares (DA SILVA PATEKOSKI e PIRES-ZOTTARELLI, 2016), tornando-os de grande interesse econômico.

1.1 JUSTIFICATIVA

A contaminação ambiental por petróleo e seus derivados causa grande impacto ecológico e as técnicas para sua remediação têm recebido destaque nas últimas décadas. A maior parte dos compostos de petróleo é passível de biodegradação; no entanto, trata-se de um processo lento, podendo levar décadas até a total descontaminação do ambiente (TONINI et al., 2010). O mundo atual está cada vez mais dependente do petróleo, sendo que as técnicas para o manuseio deste (exploração, refino, transporte e operações de armazenamento) podem causar acidentalmente derramamentos e contaminações de solos, rios e outros, sendo necessário recorrer a estudos e pesquisas de técnicas relacionadas à remediação de sítios contaminados (ANDRADE et al., 2010).

A biodegradação de um composto químico no meio ambiente depende, sobretudo, da presença de uma população de micro-organismos capazes de metabolizar a molécula original e seus produtos de degradação. Não existem, na biosfera atual, rotas enzimáticas catabólicas capazes de degradar todos os compostos novos que a cultura humana sintetizou durante os últimos 100 anos. Alguns xenobióticos podem ser biodegradados por micro-organismos que possuam enzimas capazes de catabolizar moléculas específicas, ou mesmo pela ação conjunta de consórcios microbianos, em que cada micro-organismo atua individualmente sobre diferentes etapas do processo de biodegradação (GAYLARDE et al., 2005). A maior parte dos compostos de petróleo (de 60% a 90%) é biodegradável, entretanto, o restante (de 10% a 40%), em estado bruto ou refinado, é recalcitrante. O destino destes compostos, após um derrame, irá depender da interação, entre vários fatores, podendo se destacar a degradação microbiana (CRAPEZ et al., 2002).

Isso demonstra a importância de recorrer a técnicas ou estudos que ofereçam subsídios para a montagem de operações de remediação dos danos causados, com menor custo e menor dano ambiental, uma vez que estamos lidando com organismos fundamentais para o perfeito funcionamento dos ecossistemas aquáticos e terrestres, pois alguns micro-organismos possuem características peculiares para degradar componentes do petróleo.

Muitas espécies de bactérias e fungos, isoladas do solo, da água do mar, de sedimentos marinhos e de áreas contaminadas por óleos, vêm sendo estudadas para aplicações ambientais como a biorremediação, dispersão de efluentes oleosos, otimização da recuperação de óleos e transferência de óleo cru, pois são produtoras de compostos conhecidos como biossurfactantes. Estes compostos exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a

tensão superficial e consistem em produtos metabólicos de micro-organismos, podendo substituir os surfactantes sintéticos no futuro, especialmente em indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica, bem como, produtos de limpeza industriais, produtos químicos agroindustriais e em processos de biorremediação, já que são biodegradáveis, possuem baixa toxicidade e apresentam estabilidade em valores extremos de pH, temperatura e salinidade (PINTO et al., 2009; CHANDRA et al. 2009).

Como todas as bactérias que foram utilizadas neste trabalho são descritas como biodegradadoras de HCs, faz-se necessário investigar se elas possuem enzimas que caracterizam as atividades envolvidas no processo de biodegradação do petróleo, pois informações sobre o perfil enzimático de comunidades microbianas são importantes para se obter um melhor entendimento sobre suas preferências metabólicas. E a utilização dessas bactérias pertencentes ao grupo de rizóbios pode tornar-se uma alternativa viável e segura para a biorremediação de solos contaminados, uma vez que não são patogênicos às plantas e/ou animais, inclusive ao homem e ainda, são fundamentais no manejo agrícola sustentável na Amazônia, fixam nitrogênio e solubilizam fosfatos pouco solúveis do solo promovendo o crescimento das plantas.

A utilização de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* também pode tornar-se uma alternativa viável e segura para a biorremediação de solos contaminados, uma vez que raramente são patogênicos às plantas e/ou animais, inclusive ao homem, sintetizam enzimas com elevado potencial biotecnológico (DA SILVA PATEKOSKI e PIRES-ZOTTARELLI, 2016), e ainda, são fundamentais no manejo agrícola sustentável na Amazônia.

2. OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Avaliar a degradação e mineralização de hidrocarbonetos do petróleo por isolados de Rizobactérias e Trichodermas spp. ou consórcios resultantes da inoculação conjunta destes micro-organismos depositadas na coleção de micro-organismos do INPA.

2.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a capacidade de degradação de derivados de petróleo por isolados de Rizobactérias Trichodermas spp.
- Obter consórcios dos micro-organismos estudados, a partir de isolados de Rizobactérias Trichodermas spp. que apresentarem capacidade de utilizar petróleo e seus derivados como fonte de carbono, através de enriquecimentos sob condições aeróbias;
- Avaliar o potencial de produção de biossurfactantes pelos consórcios de Rizobactérias Trichodermas spp. obtidos, tendo o petróleo como única fonte de carbono;
- Testar em amostras de solos contaminados, os consórcios de Rizobactérias que apresentarem maior eficiência em utilizar o petróleo como fonte de carbono.

2.2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.2.1 Petróleo e seus derivados e impactos causados pela deposição de seus compostos no meio ambiente.

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

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

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

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

Então, o petróleo é constituído por uma mistura complexa de substâncias inorgânicas e orgânicas, extremamente influenciadas por condições físico-químicas, biológicas e geológicas

do ambiente em que ele foi formado. Alterações na qualidade do solo ocorre devido, principalmente a vazamento durante o processo de exploração ou até a fase de refinamento e/ou armazenamento. Dentre as substâncias mais comuns na composição do petróleo, encontramos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). São gerados naturalmente, e de forma contínua, pela combustão incompleta de substâncias orgânicas, como resíduos vegetais, madeira, matéria orgânica etc. Porém, a contaminação do solo é um típico efeito da atividade antropogênica, devido à produção industrial dos HAPs (para fabricação de corantes, de fibras sintéticas, de preservantes de madeira, etc), à produção de carvão vegetal, à extração e gaseificação do carvão mineral e aos processos de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e de seus derivados (BANFORTH; SINGLETON, 2005).

Os compostos que exigem maior preocupação ambiental e que, normalmente, são os principais a serem identificados e quantificados antes e durante um processo de remediação são: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, que são hidrocarbonetos aromáticos mais abundantes nas frações leves do petróleo, como a gasolina e o óleo diesel. Esses compostos podem ser transportados em locais distantes do ponto de origem (SOUZA et al., 2016). Podendo observar que substâncias poluentes e cancerígenas presentes no petróleo e seus derivados merecem atenção por parte das autoridades dos órgãos ambientais e de saúde (ANDRADE et al. 2010).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (International Agency for Research on Câncer - IARC), órgão da Organização Mundial da Saúde, o benzeno se classifica no Grupo I, ou seja, é uma substância comprovadamente cancerígena e que também pode causar leucemia em seres humanos (IARC, 2006).

A existência de uma área contaminada pode gerar problemas, como danos à saúde, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e danos ao patrimônio público e privado, com a desvalorização das propriedades, além de outros danos ao meio ambiente (CETESB, 2018). Contaminações oriundas dessas substâncias merecem atenção, pois seu contato direto provoca a inalação de vapores tóxicos, como pela disposição desses compostos nos solos, mas também quanto a sua presença em águas utilizadas pelo consumo humano.

Com o desenvolvimento das cidades, aumentaram-se os estoques de petróleo, bem como o seu transporte mundial, sendo potencial o risco de acidentes envolvendo derrames de óleo no meio ambiente (HARAYAMA et al., 1999; PEREIRA et al., 2009; BASTOS ;

FREITAS, 2010; SANTOS et al., 2011). A poluição causada por hidrocarbonetos constitui séria preocupação ambiental e de saúde, merecendo maior investimento em tecnologias compatíveis para sua remediação e os maiores problemas são os danos ambientais causados por derrames acidentais e descarga de petróleo ou de resíduos oleosos intencionalmente descartados (LAI et al., 2009). A crescente atividade industrial nos dias de hoje traz consigo alguns riscos para o meio ambiente. Normalmente as contaminações de solos e do ambiente hídrico por hidrocarbonetos ocorrem desde o processo de extração, transporte, refino, até o consumo, com a produção de gases poluentes. Tais acidentes têm um grande efeito sobre as propriedades do ambiente contaminado. Observam-se com muita preocupação, os casos de contaminação do solo e água por hidrocarbonetos derivados de petróleo, que mesmo em pequenas concentrações, podem constituir um grande perigo à saúde humana e ao meio ambiente (SOUZA et al., 2010).

Os produtos petrolíferos são considerados recalcitrantes à degradação microbiana e persistem nos ecossistemas devido à sua natureza hidrofóbica e baixa volatilidade, representando assim uma ameaça significativa para o meio ambiente (SAWADOGO et al., 2015).

De acordo com Baker ; Herson (1994) sete principais subprodutos são extraídos por fração destilada da composição básica do petróleo: Gás natural composto por alcanos de cadeia normal ou ramificada, com um a cinco átomos de carbono, por exemplo o etano, propano e butano; Gasolina formada por hidrocarbonetos de cadeia normal ou ramificada, com 6 e 10 átomos de carbono. Ciclanos e alquibenzenos estanos presentes; Querosene (óleo diesel n.º1) composto por hidrocarbonetos com 11 a 12 átomos de carbono. N-alcanos ramificados, ciclo-alcanos, aromáticos, e misturas de ciclanos com aromáticos. Baixos níveis de benzeno. Poucos poliaromáticos; Óleo Diesel leve é um produto formado por hidrocarbonetos com 12 a 18 átomos de carbono. Percentual de n-alcanos maior do que o do querosene. Ciclanos, oleofinas, oleofinas aromáticas mistas estão presentes; Óleo Diesel pesado formado por hidrocarbonetos com 18 a 25 átomos de carbono; Lubrificantes composto por hidrocarbonetos com 26 a 28 átomos de carbono; Asfálticos que são compostos policíclicos pesados.

De acordo com os dados estatísticos mensais publicados pela Agencia Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2016) no ano de 2015 foram produzidos um total de 2.189.081m³ de derivados de petróleo nas refinarias do Estado do Amazonas. Deste

total, o óleo diesel com 35% foi o derivado com maior percentual, sendo seguido por seguido pela nafta com 23% (Figura 1).

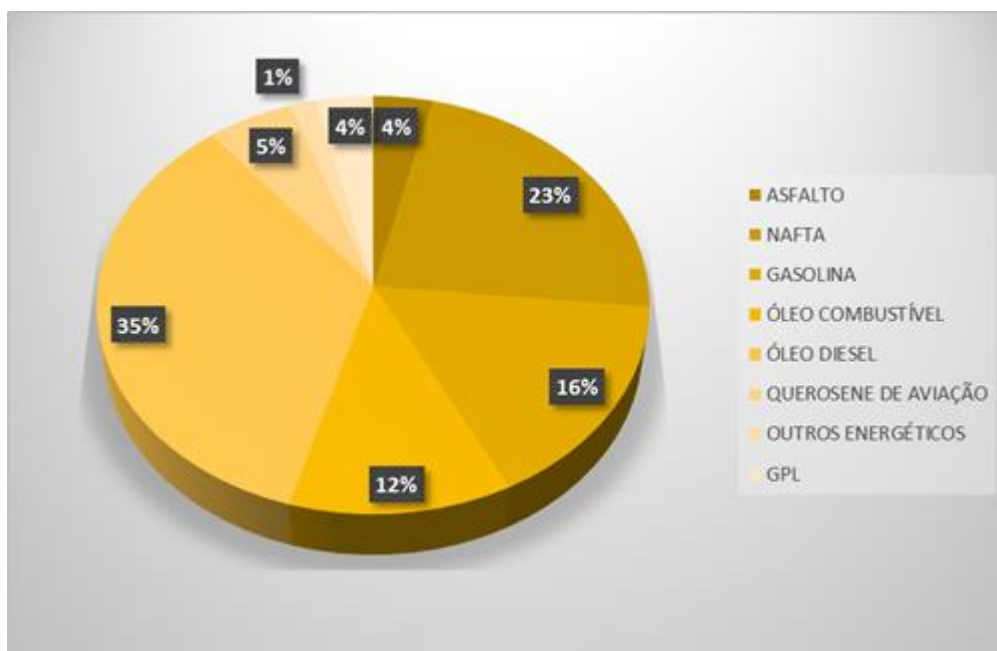


Figura 1: Produção de derivados de petróleo nas refinarias do Estado do Amazonas – 2015

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

2.2.2 Biorremediação de ambientes impactados por petróleo e seus derivados

Varias técnicas têm sido desenvolvidas para a limpeza de áreas impactadas com contaminantes tóxicos, tendo como exemplo entre elas, a biorremediação, que é definida como a transformação e/ou degradação de compostos tóxicos para torná-los inofensivos: Pode envolver o emprego de micro-organismos inerentes ao produto contaminante e ao meio ambiente, ou ainda pode lançar mão de micro-organismos exógenos (BENNET ; FAISON,

1997). Estes micro-organismos, muitas vezes, são considerados nocivos para os seres humanos. Para que seja aplicada a biorremediação em determinada área afetada por contaminante, várias definições e parâmetros devem ser esclarecidos. Para a descontaminação dos locais, a biorremediação utiliza micro-organismos autóctones ou alóctones, podendo ser realizada através de bioaumentação, bioestimulação ou atenuação natural monitorada (ANDRADE et al., 2010).

Para que seja implantada a biorremediação em determinada área afetada por contaminantes, tem que haver definições para que seja implantado todo o processo (Figura 2). A biorremediação utiliza, para a descontaminação dos locais, microrganismos autóctones ou alóctones, podendo ser realizada através de bioaumentação, bioestimulação ou atenuação natural monitorada (ANDRADE et al., 2010). O emprego de microrganismos na remediação de ambientes impactados requer mecanismos para estimular e desenvolver a atividade microbiana na degradação de compostos de petróleo.

Gaylarde et al. (2005), citaram que a implementação de um processo de remediação em um ambiente contaminado requer a condução de um estudo detalhado, com uma visão interdisciplinar, envolvendo profissionais de diferentes áreas de conhecimento, como microbiologia, bioquímica, biologia molecular, química orgânica e analítica e engenharia, sendo necessário um conhecimento aprofundado das características químicas da molécula xenobiótica que se pretende eliminar, uma vez que a estrutura química influencia vários aspectos do metabolismo biológico. Afirmaram ainda que, a extraordinária diversidade metabólica se deve à combinação do potencial genético individual das diferentes espécies microbiana em um sistema natural, com enzimas e vias metabólicas que evoluíram ao longo de bilhões de anos, e a capacidade de metabolismo integrado apresentada pela comunidade microbiana em conjunto: produtos do metabolismo de um microrganismo pode ser substrato para outros.

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

sença de aceptores de elétrons e nutrientes adequados para manter ativos micro-organismos de diferentes espécies (Figura 3).

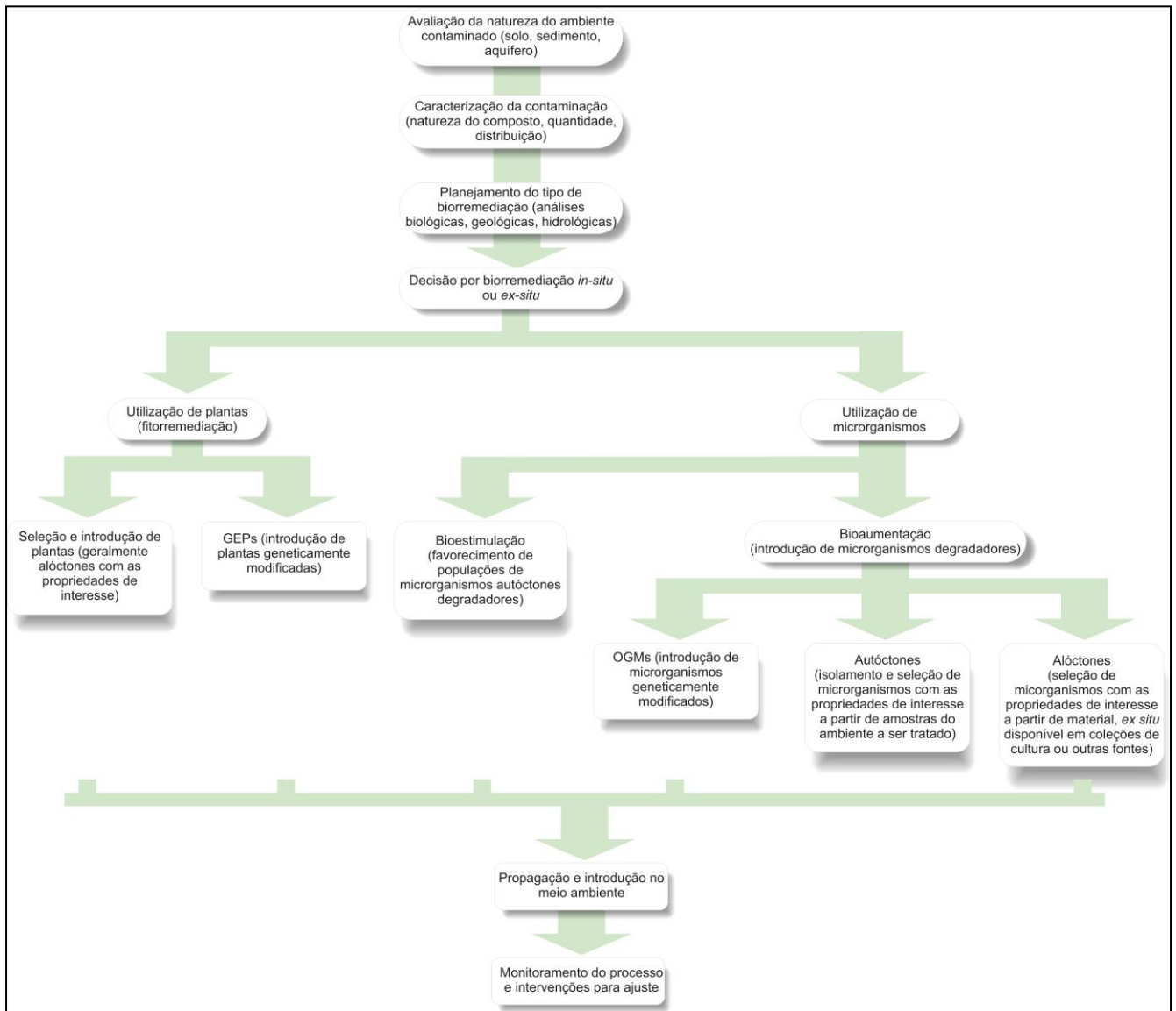


Figura 2: Esquema geral das etapas para definição e implementação de um processo de biorremediação (Adaptado de Gaylarde, 2005).

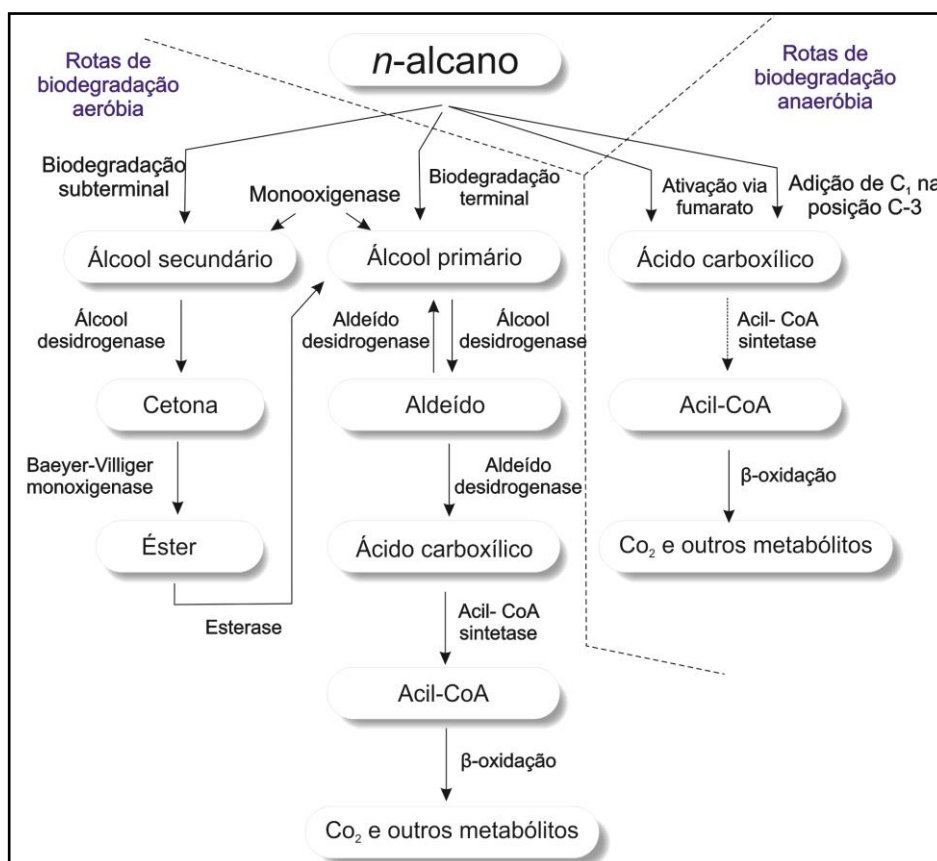


Figura 3: Rotas de biodegradação de alcanos para micro-organismos aeróbios e anaeróbios (adaptado de WENTZEL et al., 2007).

Micro-organismos que possuem a capacidade de degradar, adaptar, crescer e até proliferar em ambientes contaminados por hidrocarbonetos tem notória importância no uso da biorremediação. Assim, a grande motivação de pesquisas e estudos de biodegradação é, sem dúvida, a busca de micro-organismos versáteis capazes de degradar, de maneira eficiente, uma grande variedade de poluentes a baixo custo operacional, utilizando micro-organismos que não prejudiquem a vida existente nas áreas contaminadas.

Segundo De Noronha (2018) o princípio da precaução ambiental se apresenta como um instrumento essencial a ser observado nos processos decisórios relacionados a empreendimentos sujeitos a Estudo Prévio de Impacto Ambiental e sua aplicação envolve a possibilidade de participação pública e democrática nesses processos, introduzindo cautela e cuidado antecipados, com vistas a salvaguardar os interesses das presentes e futuras gerações.

2.2.3 Biossurfactantes

Biossurfactantes são compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, podendo realizar misturas de hidrocarbonetos em água (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Podem ser produzidos por uma diversidade de micro-organismos, sendo a maioria por bactérias e leveduras, e em menor quantidade, por fungos filamentosos (AL-WAHAIBI et al., 2014). As principais classes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas que são derivados do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras (TAMBOURGI et al., 2008). Isto pode ser demonstrado através do aumento significativo da degradação dos hidrocarbonetos presentes no meio, onde a dinâmica desse processo é baseada na habilidade dos biossurfactantes reduzirem a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo de compostos insolúveis em superfícies, influenciando as ligações de hidrogênio e interações hidrofílicas-hidrofóbicas. Isto faz com que a área superficial aumente, proporcionando uma maior biodisponibilidade e conseqüente aumento da biodegradabilidade (CASTIGLIONI et al., 2009). Os biossurfactantes são mais eficientes do que os surfactantes sintéticos existentes, e apresentam propriedades que estes não possuem, tais como a maior seletividade e atividade específica sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade. Os biossurfactantes produzidos por micro-organismos podem ser obtidos utilizando-se procedimentos relativamente simples e substratos baratos, através de processos de fermentação. Açúcares e óleos são fontes de carbono adequadas para a obtenção de tensoativos ecologicamente seguros (BUENO et al., 2010); no entanto, sua entrada no mercado em larga escala ainda está limitada, devido ao seu alto custo de produção quando comparado aos sintéticos (MARQUEZ et al., 2009).

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

2.2.4 Micro-organismos de Solo

Os solos possuem, naturalmente, diversos micro-organismos com atividades metabólicas variadas e que são capazes de degradar eficientemente diferentes contaminantes, como o petróleo e seus derivados. Contudo, em alguns casos, a contaminação de solos por estas substâncias tem se tornado uma problemática mundial, principalmente, devido à dificuldade de reabilitar a área contaminada. Estes problemas têm ocorrido, pois uma das principais dificuldades envolvendo a descontaminação dessas matrizes está relacionada, entre outros fatores, à presença de materiais argilominerais, que quando presentes em quantidades elevadas no solo contaminado, podem reduzir consideravelmente a eficiência do processo de biorremediação. Os solos argilosos, de modo geral, apresentam baixa permeabilidade, o que pode comprometer significativamente tanto a difusão de oxigênio, que é elemento fundamental para o processo aeróbico de degradação, bem como a incorporação de nutrientes. É evidente que a estrutura dos solos também exerce influências significativas sobre as características físico-químicas. Dependendo da estrutura, mesmo que os solos sejam argilosos, eles podem ter permeabilidades elevadas. Os latossolos argilosos, por exemplo, que ocupam extensas áreas no Brasil, apresentam, comumente estrutura granular e, desta forma, elevada permeabilidade (ANDRADE et al., 2010).

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

Quando o combustível atinge o solo, seus componentes separam-se em três fases: dissolvida, líquida e gasosa. Uma pequena fração dos componentes da mistura se dissolve na água do lençol freático, uma segunda porção é retida nos espaços porosos do solo na sua forma líquida pura como saturação residual e outra parte dos contaminantes passíveis de evaporação dão origem à contaminação atmosférica (NADIM et al., 1999).

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

Nos últimos tempos, a demanda por micro-organismos degradadores de compostos de petróleo tem aumentado, levando com isso a um crescente aumento nos estudos de micro-organismos capazes ou com potencial para serem utilizados na degradação desses poluentes.

É importante o reconhecimento da diversidade de micro-organismos existente em diferentes ecossistemas e sua ação metabólica para cada composto específico, uma vez que um só micro-organismo isolado pode não ter a capacidade de degradar todos os componentes do petróleo.

2.2.5 Rizobactérias e sua utilização no processo de biorrediação de petróleo e derivados

As bactérias são os micro-organismos mais abundantes presentes em solos, devido ao seu rápido crescimento e sua habilidade de utilizar ampla gama de compostos como fonte de carbono e nitrogênio (GLICK, 1995). Estima que em um grama de solo superficial exista uma densidade de bactérias entre 10^4 e 10^8 (HUGHES et al., 2001), o que reflete em elevada diversidade de micro-organismos ainda pouco explorados responsáveis por atividades metabólicas variadas, nos mais diferentes habitats terrestres (MARCHIORO, 2005; FERREIRA, 2008; OLIVEIRA, 2009).

Apesar de vários trabalhos com diversas espécies de micro-organismos degradadores, existe a necessidade de maior conhecimento dos potenciais existentes de bactérias. Algumas dessas bactérias podem apresentar intensa capacidade para colonização radicular, sendo, portanto denominadas de rizobactérias (ZEHNDER et al., 2001).

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

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

Segundo Kuykendall e Dazzo (2005), Chen et al. (2005), Kuykendall et al. (2005), a ordem Rhizobiales é classificada em dez famílias: Aurantimonadaceae, Bartonellaceae, Beijerinckiaceae, Bradirhizobiaceae, Brucellaceae, Hypomicrobiaceae, Methylobacteriaceae,

Methylocystaceae, Phyllobacteraceae, Rhizobiaceae. Nesta última, encontram os seguintes gêneros: *Agrobacterium* (SETUBAL, 2009), *Allorhizobium* (SESSITSCH et al., 2002), *Carbophilus* (EUZÉBY e KUDO, 2001), *Chelatobacter* (KAMPFER et al., 2002), *Kaistia* (WEON et al., 2008), *Rhizobium* (SAWADA et al., 2003), *Sinorhizobium/Ensifer* (MARTENS et al., 2008), *Candidatus* (DE VOS et al., 2005).

Da família Rhizobiaceae, dois gêneros são considerados principais, pela capacidade de nodulação de plantas leguminosas, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. Bactérias do gênero *Rhizobium* são caracterizadas pelo crescimento rápido em meio YMA (pH 6-7), temperatura 25-30 °C, e tempo 3-5 de incubação, apresentam tamanho de colônias entre 2-4 mm de diâmetro e produção de ácido. Enquanto que as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são caracterizadas pelo crescimento lento, entre 5-7 dias de incubação, as colônias são menores que 1 mm, além de produzirem reação alcalina (OLIVEIRA et al., 2007).

A diversidade genética dentro da população de rizóbio no ambiente natural é alta devido à rápida reprodução, variações, mutações e aos processos naturais de transferência genética (WEIR, 2012). Esta diversidade é apresentada em trabalhos de levantamento de estirpes de rizóbio em diferentes ecossistemas no Brasil (HUNGRIA et al., 1997; CHAGAS JÚNIOR et al., 2009).

Estes micro-organismos são bactérias Gram negativas, têm forma de bastonete, são aeróbicas e não esporulantes, pertencentes ao filo alpha-Proteobactéria, os quais são genericamente identificados como rizóbio (ZAKHIA; LAUJUDIE, 2001; ALVES et al., 2014). Estas bactérias apresentam grande capacidade simbiótica e fixadora de nitrogênio e são eficientes na produção de biopolímeros que apresentam aplicação na agricultura como inoculante. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo bioquímico natural e essencial, realizado por bactérias que possuem a enzima nitrogenase. Estes organismos são encontrados em vários ambientes, vivendo livremente, associados ou em simbiose com outros seres vivos. As bactérias fixadoras de nitrogênio possuem um papel ecológico importante, atuando na conversão do nitrogênio atmosférico (N₂), não utilizável pelas plantas e por outros grupos de organismos, em amônia (NH₄⁺), forma utilizável por estes (SOUZA; MOREIRA, 2011). Apresentam características adequadas para serem utilizadas num processo de biorremediação, pois além de apresentarem todas as características citadas, é um grupo de micro-organismos que não possui patogenicidade, não prejudicando assim o homem, a fauna e a flora existentes no meio ambiente.

As bactérias do gênero *Paenibacillus* (ASH; PRIEST; COLLINS, 1994) pertencem ao Reino Bacteria, Filo Firmicutes, Classe Bacilli, ordem Bacillales e família Paenibacillaceae. São bactérias gram-positivas, em forma de bastonete, dotadas de mobilidade, formadoras de esporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas. São abundantes em solos rizosféricos e tem boa capacidade em colonizar as raízes de plantas, podendo produzir naturalmente hormônio de crescimento vegetal e várias enzimas hidrolíticas, além das funções típicas das rizobactérias (GOVINDASAMY et al., 2011; KO et al., 2010; HOON et al., 2005; BERGE; GUINEBRETIERE; ACHOUAK; NORMAND; HEULIN, 2002).

Bactérias do gênero *Paenibacillus* podem ser isoladas do solo, fontes vegetais, água, larvas de insetos, sedimentos marinhos contaminados com petróleo, etc. Produzem enzimas extracelulares e compostos antimicrobianos e antifúngicos inibidores de vários patógenos animais e vegetais (LORENTZ, 2005).

Em geral, essas bactérias não são patogênicas para plantas ou animais e têm grande potencial para aplicações agrícolas, médicas e industriais. Estudos têm demonstrado inúmeras funções biológicas desempenhadas por esses micro-organismos com alto padrão biotecnológico (GU et al., 2010; HWANG et al., 2010; LU et al., 2010; NONG; RICE; CHOW; PRESTON, 2009). Várias estirpes dessa espécie são capazes de produzir inúmeras enzimas hidrolíticas que desempenham um papel importante no controle biológico de patógenos de plantas. Porém, além dessas enzimas muitos outros compostos ainda são indefinidos estruturalmente ou desconhecidos (LAL; TABACCHIONI, 2009).

Essas Rizobactérias podem possuir potencial como biodegradadores de petróleo ou derivados, uma vez que possuem uma significativa diversidade genética e podem ser encontrados em ambientes contaminados com hidrocarbonetos, necessitando desse modo da realização de estudos que indiquem ou comprovem esse potencial.

1.3.6 Utilização de *Trichodermas* spp. no processo de biorremediação de petróleo e derivados

Os fungos do gênero *Trichoderma* são fungos de vida livre, encontrados principalmente na rizosfera de plantas ou em material vegetal em decomposição. Pertencem ao filo Ascomycota, ordem Hypocrales, família Hypocreaceae (SRAVASTAVA, 2014). Atualmente existem 256 espécies de *Trichoderma* registradas na Subcomissão Internacional de Taxonomia de *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH) (<http://www.isth.info/trichoderma/>).

O gênero *Trichoderma* foi descrito pela primeira vez em 1794, por Persoon e Gray, possuindo quatro espécies. Em 1969 Rifai fez a primeira revisão taxonômica do gênero. Desde então, inúmeras espécies foram agregadas ao gênero, no entanto, sua taxonomia torna-se bastante complexa por possuir pleomorfismo sexual (SRAVASTAVA, 2014; DELABONA, 2015).

A fase sexual (telemórfica) é classificada como ascomiceto de ordem Hypocrales, conhecida como *Hypocrea*. Nesta fase, muitas espécies produzem características da fase anamórfica *Trichoderma*, enquanto outras, apresentam dicotonização de conidióforos irregulares, característicos de outros gêneros. A fase assexual (anamórfica ou mitospórica) chamada de *Trichoderma*, é independente da fase telemórfica e tende a produzir dois ou mais tipos de esporos (BISSET, 1991; HARMAN et al., 2004).

Estes fungos apresentam alta capacidade adaptativa, pois além de serem saprobios também podem ser encontrados parasitando outros fungos. Colonizam principalmente solos ácidos, embora possam habitar em solos levemente básicos, utilizando diversas fontes de carbono e nitrogênio, além de secretarem diversas enzimas de interesse biotecnológico (DELADONA, 2015).

As colônias crescem rapidamente em meio de cultura, apresentando como características macroscópicas, colônias de superfície lisa e translúcida, nos primeiros estágios de crescimento, seguida por uma aparência flocosa. Os esporos geralmente apresentam coloração verde, mas podem variar de incolor à cinza, dependendo da pigmentação e quantidade de conídios, além da influência do pH do meio (DELADONA, 2015).

Várias espécies são conhecidas por atuarem como agentes de biocontrole e micoparasitismo, além de auxiliarem na supressão de patógenos, na resistência e crescimento de plantas. O *Trichoderma* produz diversas enzimas extracelulares capazes de degradar parede celular, como também uma variedade de metabólitos secundários (ISAIAS et al. 2014; VINALE et al., 2014).

Muitos trabalhos relatam a atividade antifúngica de *Trichoderma* contra os fitopatógenos *R. solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. ampelinum*, *Rhizopus* sp., *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*, entre outros (ISAIAS et al., 2014; LEELAVATHI; VANI; REENA, 2014; SHENTU et al., 2014).

Porém, além da conhecida atividade antifúngica, também é utilizado na biorremediação. Em muitos países diversos trabalhos vem sendo realizados utilizando o

Trichoderma na biorremediação de metais pesados e derivados de petróleo (HAMZAH et al., 2012; COCAIGN et al., 2013; KATA et al., 2014; SHUKLA et al., 2014; FONTES, 2015; ADEBIYI, 2017).

Pesántez e Castro (2016) verificaram que a inoculação de cepas de *Trichoderma* em solos contaminados por hidrocarbonetos, reduziu em até 47% a concentração total destes compostos.

No Brasil, Lima et al. (2006) avaliaram o potencial de fungos filamentosos na degradação de óleo diesel, gasolina e óleo de soja, sendo que os os isolados dos gêneros *Penicillium* e *Trichoderma* obtiveram as maiores velocidades de crescimento

Azevedo (2010) quando submeteu fungos isolados do manguezal, ao teste de oxidação com o indicador DCPIP, percebeu a mudança de cor do indicador ocorreu em diferentes tempos, dependendo da espécie, variando de 10h a 68h, sendo que o *Trichoderma* apresentou descoloração total em aproximadamente 50h indicando a capacidade de degradar o substrato.

Farias et al. (2012) estudaram a degradação de compostos fenólicos em efluente de postos de gasolina pela ação dos fungos *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp. em um reator em batelada. Observaram, grande quantidade de espuma e o crescimento dos fungos comprovando que as espécies testadas conseguem sobreviver e degradar o resíduo avaliado.

Otsuka (2015) estava avaliando a biodegradação de tolueno por 50 fungos isolados de ambientes associados ao petróleo. Onde, percebeu que todos os fungos apresentaram resultados positivos demonstrando que assimilavam o composto e possuíam tolerância a toxicidade da molécula, inclusive o *Trichoderma koningii* apresentou o maior crescimento e maior halo, com 6 cm, possuindo assim alta tolerância ao tolueno.

Com todos esses resultados fica evidente o potencial do *Trichoderma* em degradar e mineralizar hidrocarbonetos do petróleo. Devendo, portanto, serem estudos com mais frequência a fim de obter produtos capazes de atuar na biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e/ou seus derivados.

CAPÍTULO I

Análise da biodegradabilidade de petróleo e seus derivados por isolados de rizóbactérias.

RESUMO

A biorremediação é um processo de tratamento que utiliza micro-organismos que degradam e transformam compostos orgânicos, como o petróleo, existentes nos solos contaminados, aquíferos, lodos e resíduos sólidos, em compostos menos complexos e geralmente mais facilmente degradáveis. Rizobactérias que colonizam as raízes e promovem o crescimento vegetal têm sido associadas à biorremediação de solos e seu estudo poderá ter grande valor econômico para a biorremediação de ambientes impactados por petróleo e seus derivados. Diante disso, este trabalho teve como objetivo testar a capacidade de isolados de rizobactérias em degradar petróleo e seus derivados, adquirir informações sobre suas preferências metabólicas, indicando os mais aptos para serem utilizados no processo de biorremediação de solos contaminados. Através dos testes de degradação em meio sólido, onde foram utilizados derivados de petróleo (óleo diesel, querosene, nafta, gasolina e óleo lubrificante) como fontes de carbono e foram selecionadas 53 bactérias que atingiram notas elevadas no sexto dia de crescimento. Esses isolados foram testados em meio líquido, utilizando o indicador Diclorofenol Indofenol – DCPIP, onde foram selecionados 04 isolados que apresentaram descoloração total até durante seis dias de incubação com todos os derivados testados. Foram formados 05 consórcios destes e verificado a capacidade de produção de biossurfactantes, observando-se que todos os isolados e seus consórcios apresentaram alta espessura da Camada emulsificante água em óleo (A/O), nos dois melhor testados (SYM, variando entre 4,97cm a 12,23cm e INPA, variando entre 3,66cm a 11,15cm). Na avaliação do crescimento microbiano em diferentes condições de solo (estéril e não estéril), contendo petróleo como fonte de carbono, verificou-se que ao adicionar as rizobactérias isoladas ou seus consórcios ao solo não estéril, contendo micro-organismos autóctones, houve um aumento significativo em todos os tratamentos, demonstrando que esses micro-organismos são potenciais degradadores de hidrocarbonetos.

Palavras-chave – Biodegradação, rizobactérias, petróleo.

1 INTRODUÇÃO

A poluição causada por hidrocarbonetos constitui séria preocupação ambiental e de saúde, merecendo maior investimento em tecnologias compatíveis para sua remediação. Os

maiores problemas são os danos ambientais causados por derrames acidentais e descarga de petróleo ou de resíduos oleosos intencionalmente descartados (LAI et al., 2009).

A biorremediação é um processo de tratamento que utiliza micro-organismos que degradam e transformam compostos orgânicos, como o petróleo, existentes nos solos contaminados, aquíferos, lodos e resíduos sólidos, em compostos menos complexos e geralmente mais facilmente degradáveis (WETLER-TONINI et al., 2010). A adição de micro-organismos estranhos ao ambiente poluído se faz necessário quando as populações autóctones dos mesmos não têm a capacidade de degradar os constituintes do petróleo (MISHRA et al., 2001). Dessa maneira, a biodegradação dos hidrocarbonetos pode ser aumentada se a biomassa microbiana conseguir sobreviver às condições do novo ambiente após competir com esses micro-organismos autóctones (DE MORAIS, 2005)

Biosurfactantes são metabólitos produzidos por uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos e pode aumentar a disponibilidade dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) a estes microrganismos degradadores, auxiliando na solubilização do poluente, além de apresentarem vantagens, como baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficácia em amplas variações de temperatura, pH e salinidade (TABATABAEE et al., 2005; MANIASSO et al., 2001). A pesquisa por biosurfactantes produzidos por micro-organismos é uma importante demanda por novos produtos de baixo impacto para o meio ambiente, uma vez que atende aos anseios por uma postura de responsabilidade em relação aos problemas ambientais causados pela poluição por meio de acidentes com derramamento, e diferentes utilidades do petróleo na sociedade atual (LIMA, 2016).

Rizobactérias que colonizam as raízes e promovem o crescimento vegetal têm sido associadas à biorremediação de solos (HUANG et al., 2005; ZHUANG et al., 2007). Esses micro-organismos podem melhorar diretamente a extensão ou qualidade do crescimento da planta aumentando a ciclagem de nutrientes, tais como, a fixação biológica de nitrogênio (AHMAD et al., 2008) e produção de hormônios, além de promover a supressão de patógenos (CUMMINGS, 2009).

Bactérias do Gênero *Rhizobium* possuem potencial uso como supridoras de nitrogênio às plantas (SPRENT, 2001). Além da capacidade de fixar nitrogênio, algumas estirpes são capazes de solubilizar fosfatos pouco solúveis do solo, e disponibilizam o fósforo tanto para si como para a planta hospedeira, promovendo o crescimento das mesmas (HARA; OLIVEIRA, 2005). E os *Paenibacillus* possuem uma ampla distribuição, podendo ser isoladas das mais

variadas fontes incluindo solo, água, rizosfera de plantas, materiais vegetais, forragem e fezes. Sabe-se que esse gênero possui espécies que promovem a interação entre fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e as raízes de plantas (HILDEBRANDT et al., 2006).

Outros estudos apontam espécies desse mesmo gênero como bons produtores de biossurfactantes, geralmente lipopeptídeos com grandes propriedades tensoativas. Além dessas características apresentadas, essas bactérias não são patogênicas, podendo possuir aplicabilidade para serem utilizadas na limpeza de áreas contaminadas com compostos de petróleo, uma vez que não são prejudiciais ao meio ambiente e ao homem.

Diante disso, torna-se fundamental testar microrganismos com capacidade para degradar ou que auxiliem na solubilização do petróleo e seus derivados como forma de minimizar os danos causados por derrames desse poluente. Portanto, esse trabalho teve como objetivo testar a capacidade de isolados de rizóbios e consórcios obtidos através destes quanto à eficiência em utilizar petróleo e seus derivados como fonte de carbono e em produzir biossurfactantes, baseando-se na redução da tensão superficial e aumento da atividade emulsificante.

3 METODOLOGIA

3.1 REATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

Para início das atividades práticas desse projeto, foram utilizados 46 isolados de rizobactérias (Tabela 1) que estão depositados na Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, que em testes anteriores 13 (INPA R560, 564, 565, 566, 569, 571, 572, 573, 583, 598, 614, 634, 666 e 672) desses isolados, apresentaram capacidade de utilizar o petróleo como fonte de carbono (BRITO, 2013). As rizobactérias foram reativadas através de riscagem em placas de petri contendo meio YMA (Yeast Manitol Agar) como fonte de carbono.

Tabela 1: Rizobactérias reativados e capazes de utilizar petróleo como fonte de carbono e seus respectivos locais de coleta

<i>Rizóbio</i>	<i>Local</i>	<i>Planta</i>
INPA R264, INPA R265, INPA R267, INPA R273, INPA R300, INPA R302	Rio Preto da Eva S 2°40'13" W 59°43'20,7"	<i>Rhynchosia phaseoloides</i> (Tento)
INPA R270, INPA R341	Rio Preto da Eva S 2°39'35,5" W 59°43'25,5"	<i>Mimosa pudica</i> (Dorme-dorme)
INPA R274, INPA R278, INPA R293	Rio Preto da Eva S 2°44'15,9" W 59°46'50,1"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R281, INPA R325	Rio Preto da Eva S 2°40'13" W 59°43'20,7"	<i>Desmodium triflorum</i> (Amor-do-campo)
INPA R283, INPA R287, INPA R307	Rio Preto da Eva S 2°40'13" W 59°43'20,7"	<i>Oxalis acetosella</i> (Trevinho)
INPA R313, INPA R314, INPA R315, INPA R316, INPA R317, INPA R318	Rio Preto da Eva S 2°40'13" W 59°43'20,7"	<i>Indigofera</i> sp. (Timbó)
INPA R332	Rio Preto da Eva S 2°44'10,1" W 59°46'2,3"	<i>Tephrosia cinera</i> (Anil bravo)
INPA R401	Irاندuba; Comunidade Jandira, Várzea	<i>Inga heterophylla</i>

Tabela 1: Rizobactérias reativados e capazes de utilizar petróleo como fonte de carbono e seus respectivos locais de coleta

<i>Rizóbio</i>	<i>Local</i>	<i>Planta</i>
	S 3°15'20,7" W 60°15'15,5"	
INPA R546, INPA R547, INPA R548, INPA R549, INPA R552, INPA R555	Ramal do Caldeirão km3 S 3° 12' 26,9" W 60° 12' 2,5"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R557	Ramal do Caldeirão km3 S 3° 13' 41,9" W 60° 13' 27,8"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R560, INPA R564, INPA R565, INPA R566, INPA R569, INPA R571, INPA R572, INPA R573, INPA R583	Ramal do Caldeirão km3 S 3° 13' 41,9" W 60° 13' 27,8"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R598, INPA R614	Estrada para Jandira; Beira do Rio Solimões, Várzea S 03° 15' 21,3" W 060° 15' 17,2"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R613	Jandira; Propriedade São João S 03° 15' 20,3" W 060° 15' 33,1"	<i>Vigna unguiculata</i> (Feijão Caupi)
INPA R634	Jandira S 03° 15' 20,0" W 060° 15' 33,1"	<i>Vigna unguiculata</i> (Feijão Caupi)
INPA R666	INPA, campus V8 S 03° 05' 28,6" W 059° 59' 36,7"	<i>Swartzia polyphylla</i> (Arabá)
INPA R672	Viveiro de Urucu S 04° 53' 15,1" W 065° 13' 31,5"	<i>Cedrelinga catenaeformis</i> (Cedrorana)

3.2 COLETA DE NÓDULOS PARA OBTENÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS

Logo após a reativação dos micro-organismos foram realizadas coletas de nódulos presentes nas raízes de plantas leguminosas, para a obtenção de rizobactérias, conforme locais descritos (Tabela 2). Após a obtenção dos nódulos, o trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Micro-organismos do INPA, Manaus, AM onde foram isoladas as estirpes de rizóbios usando a metodologia descrita por Vincent (1970) e

Somasegaran e Hoben (1985). Os nódulos foram lavados com etanol (92% por 3 minutos), seguindo uma desinfecção superficial com hipoclorito de sódio (4 minutos) e dez lavagens com água estéril.

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

No total foram isolados 123 rizobactérias que foram utilizadas para a realização dos testes metodológicos propostos por esse trabalho.

Tabela 2: Rizobactérias adquiridas através do isolamento de nódulos de leguminosas e seus respectivos locais de coleta

Rizóbio	Local	Planta
INPA R685, INPA R686, INPA R692, INPA R695	Manacapuru; Estrada do Acajatuba S 3°13'36,1" W 60°34'20,5"	<i>Desmodium ovalifolium</i> (Desmódio)
INPA R689, INPA R720, INPA R721, INPA R722, INPA R723, INPA R727, INPA R729	Manacapuru; Lago do Paru S 3°15'24,7" W 60°32'3,4"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R699, INPA R731, INPA R733, INPA R734, INPA R735, INPA R738, INPA R739, INPA R740, INPA R741, INPA R742, INPA R743, INPA R746, INPA R751, INPA R752, INPA R754, INPA R757, INPA R758, INPA R759, INPA R761, INPA R762, INPA R763, INPA R764, INPA R765, INPA R770, INPA R774, INPA R779	Manacapuru; Estrada do Acajatuba S 3°13'36,1" W 60°34'20,5"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R701, INPA R702, INPA R710, INPA R713, INPA R715, INPA R717, INPA R719	Manacapuru; Ramal do Laranjal S 3°15'24,7" W 60°31'0,5"	<i>Tephrosia cinera</i> (Anil bravo)
INPA R781, INPA R782, INPA	Balbina, Km 2	<i>Desmodium triflorum</i>

Tabela 2: Rizobactérias adquiridas através do isolamento de nódulos de leguminosas e seus respectivos locais de coleta

R783, INPA R784, INPA R785, INPA R786, INPA R787	S 2°4'3,7" W 60°0'7,7"	(Amor-do-campo)
INPA R790, INPA R791, INPA R792, INPA R793, INPA R795, INPA R796, INPA R798, INPA R799	Balbina; Km 42 Sítio Marisa S 2°3'5,2" W 59°40'11,1"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R800, INPA R801, INPA R802, INPA R803, INPA R804, INPA R805, INPA R806, INPA R807	Balbina; AM 240 Km 1 S 2°4'38,8" W 60°0'21,4"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R969, INPA R970, INPA R971, INPA R972, INPA R1077	Itacoatiara; Novo Remanso; Ramal do Macaco Cego S 03° 11' 7,5" W 059° 00' 0,1"	<i>Inga cinnamomea</i> (Ingá chinelo)
INPA R974	Itacoatiara; Novo Remanso S 03° 10' 43,2" W 059° 00' 21,9"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R976	Itacoatiara; Novo Remanso S 03° 38,8" W 058° 58' 31,9"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R977, INPA R979	Itacoatiara; Novo Remanso S 03° 38,8" W 058° 58' 31,9"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R980	Itacoatiara; Novo Remanso S 03° 8' 18,6" W 058° 58' 7,7"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R986, INPA R988, INPA R989, INPA R990, INPA R991	Itacoatiara; Novo Remanso S 03° 7' 37,5" W 059° 00' 42,5"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R994, INPA R995	Itacoatiara; Novo Remanso S 03° 7' 37,5" W 059° 00' 42,5"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R997	Itacoatiara; Novo Remanso S 3°6'22,5" W 59°2'3,1"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R998	Itacoatiara; Novo Remanso S 03° 6' 22,5" W 059° 2' 3,1"	<i>Inga pendula</i> (Ingá)
INPA R1011, INPA R1015	Presidente Figueiredo; BR 174 S 2° 18' 35,1" W 60° 2' 48,1"	<i>Acacia dealbata</i> (Mimosa)
INPA R1018, INPA R1020, INPA R1022, INPA R1023, INPA	Presidente Figueiredo; AM 240, Km 1	<i>Inga edulis</i> (Ingá)

Tabela 2: Rizobactérias adquiridas através do isolamento de nódulos de leguminosas e seus respectivos locais de coleta

R1024	S 2° 4' 38,8" W 60° 0' 21,4"	
INPA R1037, INPA R1038, INPA R1041, INPA R1042, INPA R1043, INPA R1044, INPA R1045, INPA R1046, INPA R1072, INPA R1074, INPA R1076	Irاندوبا; Estrada do Caldeirão Km 1 S 3° 12' 3,1" W 60° 11' 11"	<i>Indigofera</i> sp. (Timbó)
INPA R1047, INPA R1050, INPA R1051, INPA R1052, INPA R1054, INPA R1057, INPA R1073, INPA R1075	Irاندوبا; Estrada do Caldeirão Km 1 S 3° 12' 3,1" W 60° 11' 11"	<i>Mimosa pudica</i> (Dorme-dorme)
INPA R1058, INPA R1059, INPA R1067, INPA R1068, INPA R1069, INPA R1071	Manacapuru; Ramal do Laranjal S 3° 16' 35,6" W 60° 30' 6,9"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA R1062, INPA R1063, INPA R1065,	Manacapuru; Lago do Paru S 3° 15' 24,7" W 60° 32' 3,4"	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R1064	Manacapuru; Lago do Paru S 3° 15' 24,7" W 60° 32' 3,4"	<i>Mimosa pudica</i> (Dorme-dorme)
INPA R1078	Manacapuru; Estrada do Acajatuba S 3° 13' 36,1" W 60° 34' 20,5"	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)

3.3 COLORAÇÃO DE GRAM

As culturas foram crescidas a 28°C, por sete dias, em placas de Petri com meio de cultura YMA (VINCENT, 1970; SOMASEGARAN e HOBEN, 1985). O procedimento consistiu em retirar uma pequena amostra da cultura, com alça de platina e depositá-la em uma gota de água em lâmina de microscopia, onde esse material foi espalhado em movimentos circulares em um só sentido, obtendo-se assim um esfregaço de forma oval, uniforme e fino. Após, fixou-se o esfregaço passando a lâmina na chama do bico de Bunsen. Em seguida, a lâmina foi tratada com o reagente Cristal Violeta, deixando agir por um minuto e lavada com água esterilizada de forma corrente dos dois lados. Cobriu-se com Lugol por um minuto e novamente lavada conforme procedimento anterior. Foi descorada com álcool-cetona, lavada e, adicionado sob a lâmina Fucsina por 30 segundos, e, novamente lavou-se em água corrente (DETONI; GILMARA, 2011).

Por fim, após estarem secas, as lâminas foram visualizadas ao microscópio utilizando a lente objetiva de 100 x sob óleo de imersão em microscópio óptico com aumento de 2.000 vezes. Culturas que apresentaram células de cor roxa foram assumidas como sendo Gram positivas e aquelas de coloração rósea como Gram negativas.

3.4 MORFOLOGIA DAS RIZOBACTÉRIAS

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

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

Morfologia das Bactérias	Característica
Forma da Colônia	Circular/ Irregular
Borda	Regular/ Irregular
Elevação	Plana/ Elevada
Tranparência	Sim/ Não
Aparência da Colônia	Homogênea/ Heterogênea
Cor da colônia	Branca/ Amarela
Muco	Pouco/ Moderado/ Abundante
Aparência do muco	Homogêneo/ Heterogêneo

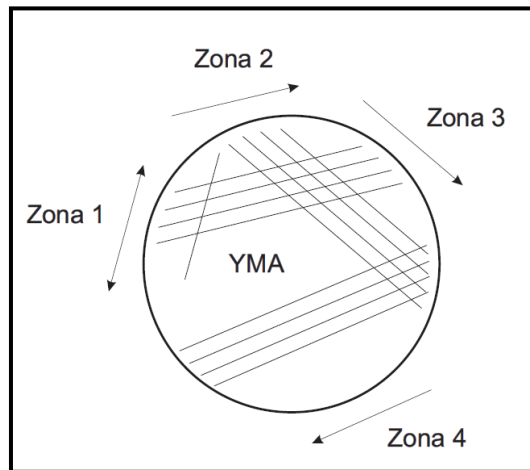
3.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE MICRO-ORGANISMOS

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit de extração *Purelink Invitrogen*. Foi amplificada a região 16S rRNA seguindo o procedimento do Borneman e Triplett (1997) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: 530F (5' - TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG - 3') e 1492R (5' - TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT - 3'). Como controle de teste, foi utilizado o DNA bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922. O sistema de amplificação foi realizado em termociclador Biocycle, e o perfil térmico do PCR foi: um ciclo inicial a 95°C/2 minutos, 35 ciclos a 95°C/40s, 60°C/40s e 72°C/2 e finalmente um ciclo de extensão a 72°C/5 min. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% para a verificação dos fragmentos. O produto do PCR foi

purificado utilizando polietilenglicol 20% (NaCl 2,5M, PEG 20%) e quantificado em gel de agarose 0,8%. A amostra foi sequenciada (ABI 3130- Applied Biosystems DNA sequence) e a sequência obtida foi editada e avaliada utilizando o programa PHRED disponível no endereço (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>). Após a obtenção das sequências F(forward) e R (reverse) foi realizado alinhamento comparativo no banco de dados de genomas bacterianos depositados no “GeneBank” utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool) (SHAEFFER *et al.* 2001) do “National Center for Biotechnology Information”(NCBI) e também foram comparadas com o banco de dados do “Ribossomal Database Project”(RDP).

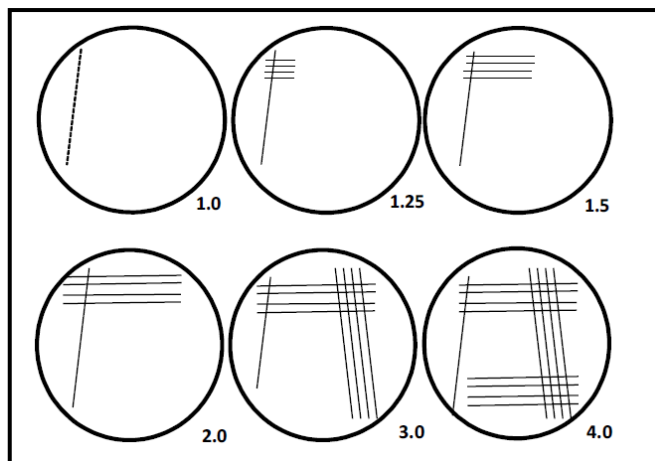
3.6 TESTE DE DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO POR ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS.

Para a realização desse teste foram utilizados derivados de petróleo (Óleo Diesel, Gasolina, Querosene e Nafta) provenientes da Refinaria de Manaus – REMAN (S 3° 08' 26,99 e W 59° 57'26,49”), localizada no município de Manaus/AM e Óleo lubrificante para motor SAE 40. Foi avaliada a capacidade de degradação desses derivados e o crescimento bacteriano dos 154 isolados, através do método de riscagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999) modificado (BRITO, 2013), realizado em placas de Petri contendo meio de cultura YMA, onde o manitol foi substituído por 0,1 mL de derivados de petróleo como fonte de carbono. Como controle foi utilizado o meio YMA. Esse teste foi realizado em quadruplicata. As avaliações foram feitas a cada três dias, no período de 15 dias, no qual as bactérias foram mantidas em laboratório a uma temperatura de 23 – 28 °C. De acordo com o desenvolvimento das colônias nas quatro zonas da placa (Figura 4), foram atribuídos valores para o crescimento para cada isolado variando de 1 (sem crescimento visível na placa) a 4 (máximo crescimento em todas as zonas), segundo escala em faixa apresentada na Figura 5. Com base no crescimento em placas de Petri, os isolados foram classificados como pouco, moderado ou elevado (Tabela 4). Para fins de seleção, foram escolhidos os isolados que apresentaram nota mínima de 3,06 ao sexto dia de teste. Os isolados selecionados foram utilizados em testes posteriores, onde foram avaliados o potencial de degradação em meio líquido utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP).



Fonte: Oliveira e Magalhães (1999)

Figura 4: Ilustração do Método de riscagem para avaliação do crescimento de bactérias



Fonte: Oliveira e Magalhães (1999)

Figura 5: Valores para crescimento de bactérias

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

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

Fonte: Oliveira e Magalhães (1999)

3.7 BIODEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO, UTILIZANDO A TÉCNICA DO INDICADOR REDOX 2,6 DICLOROFENOL-INDOFENOL - DCPIP

A avaliação do potencial de degradação de derivados de petróleo em meio líquido pelos isolados, foi realizada através da técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), segundo Hanson et al. (1993). O princípio deste teste é que durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores (como oxigênio e nitrato) e ao incorporar um 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) (MARIANO et al., 2007).

3.8 PREPARO DE MICRO-ORGANISMOS PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE

Esse teste foi realizado através da transferência de 2 mL de suspensão bacteriana contida em placa de petri para erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio YM líquido, onde ficou em mesa agitadora a 75 rpm a 30 °C por 48 horas e após o crescimento, houve a contagem de célula em câmara de Neubauer para padronização das bactérias a 10^5 UFC.mL⁻¹.

3.8.1 Montagem e avaliação do teste

O ensaio foi realizado em tubos de ensaio previamente estéreis, contendo 7,5mL de meio YM líquido (sem fonte de carbono), 400µL do DCPIP, 25µL de derivado de petróleo (diesel, querosene gasolina e nafta), fornecido pela REMAN e óleo lubrificante e 100µL de inóculo padronizado a 10^5 UFC.mL⁻¹ de isolados de rizóbios/mL, sendo determinado o número de células em Câmara de Neubauer. O experimento foi realizado em triplicata, com três tratamentos controle: dois controles negativos, um contendo meio mineral YM, indicador DCPIP e derivado de petróleo (óleo diesel, querosene gasolina, nafta óleo lubrificante) o outro com meio YM e DCPIP. O controle positivo, continha meio mineral YM, indicador DCPIP e inóculo de isolados de rizóbios/mL. Os tubos de ensaio foram incubados a 30°C e a cada 24 horas foi observado o desaparecimento da coloração azul do indicador DCPIP (forma oxidada) para a incolor (forma reduzida) Mariano et al. (2007). A leitura positiva foi dada com a atribuição de notas após estes tempos, pela descoloração do DCPIP, onde:

- Nota 1 – Coloração Total
- Nota 2 – Início da Descoloração
- Nota 3 – Descoloração Parcial
- Nota4 – Descoloração Quase Total
- Nota 5 – Descoloração Total.

Também foram retiradas a cada 24 horas, por um período de seis dias, para análise quantitativa, alíquotas, onde foram determinadas o número de células em Câmara de Neubauer. Com os isolados selecionados foram formados consórcios em meio líquido e utilizados em outros testes.

3.9 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELOS ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS E CONSÓRCIOS FORMADOS ATRAVÉS DESTES

Em testes anteriores realizados com 169 isolados de rizobactérias, utilizando derivados de petróleo como fontes de carbono em meios sólido e líquido foram selecionadas quatro isolados que demonstraram capacidade de degradação em todos os derivados testados (nafta, gasolina, óleo diesel, óleo lubrificante e querosene).

3.10 FORMAÇÃO DOS CONSÓRCIOS

Dos isolados bacterianos INPA R302, R332, R555 e R713, foram formados cinco consórcios para os testes de produção de biossurfactantes (Tabela 5). Para cada isolado e consórcio formado foram utilizados 100 mL de meio mineral YM e meio mineral INPA líquido, acrescido de 0,1 mL de petróleo de Urucu em erlenmeyers de 250 mL (BRITO, 2013). Foram utilizados como controles frascos contendo meio de cultura (YM ou INPA) e petróleo. Os frascos foram incubados a 30° C em agitador rotatório a 65 rpm, por nove dias. Foi medido o pH inicial e final de cada amostra para verificar se houve interferência neste parâmetro químico.

Tabela 5: Consórcios de microrganismos utilizados nos testes de produção de biossurfactantes.

Consórcio	Microrganismos
C01	INPA R302, R332, R555 e R713
C02	INPA R302, R332 e R555

Consórcio	Microrganismos
C03	INPA R302, R332 e R713
C04	INPA R302, R555 e R713
C05	INPA R332, R555 e R713

3.10.1 Avaliação da atividade de emulsificação

Para a realização desse experimento foram utilizadas suspensões dos consórcios de rizobactérias nos meio mineral SYM (sais do meio YMA – VINCENT, 1970; SOMASEGARAN; HOBEN, 1985) e INPA, acrescidos de petróleo. Para cada 3,5 mL da suspensão de bactérias, foram adicionados 3,5 mL de petróleo de urucu em tubos de ensaio que foram agitados durante 2 minutos em vórtex e deixados por 48 horas em repouso. Após esse tempo, foram efetuadas medidas da altura da camada de emulsão (CE), água em óleo (AO) e da Altura Total (AT) dos líquidos no tubo expressa em cm. O índice de emulsificação foi obtido através da fórmula: $IE(\%) = (CE/AT) \cdot 100$, descrita por Cooper e Goldenberg (1987). A atividade de emulsificação óleo em água foi medida pela densidade óptica em espectrofotômetro a 610 nm de absorbância, medida em unidade (JOHNSON, 1992), figura 6. A qualificação da atividade emulsificante foi realizada de acordo com a convenção adotada por (MATSUURA, 2004), tabela 6.

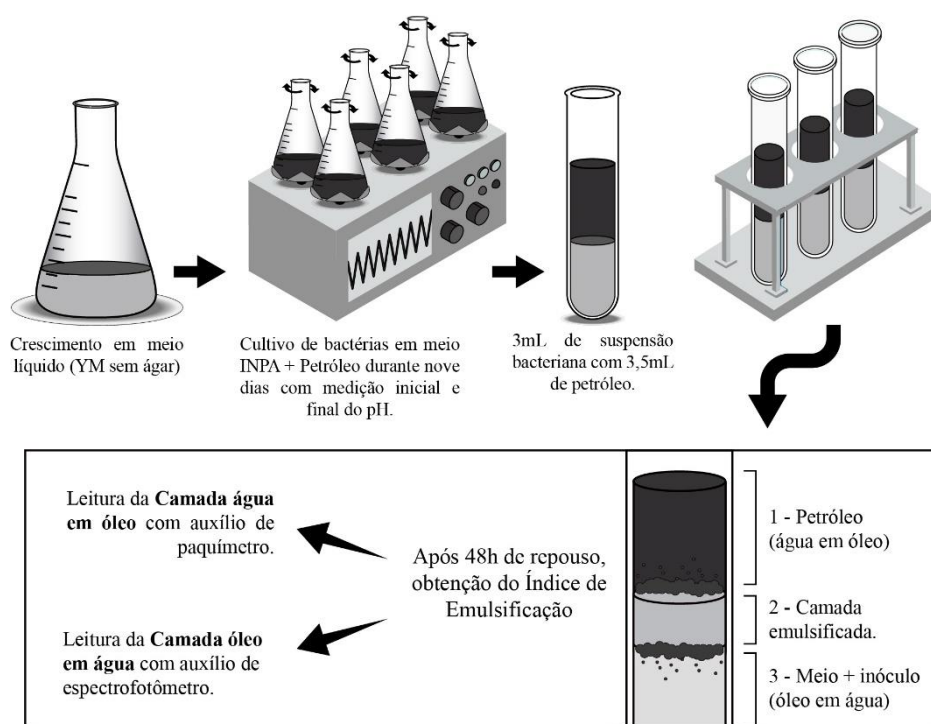


Figura 6 - Esquema ilustrativo da atividade de emulsificação.

Tabela 6 - Convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante.

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

Fonte: Matsuura, 2004.

3.11 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM DIFERENTES MEIOS NUTRICIONAIS

Foi coletado solo proveniente do Ramal do Brasileirinho, localizado no Km 12, da AM 010 (S 3° 00' 43,9" e W 59° 51' 01,9") no município de Manaus/AM. Logo após, a amostra foi levada para o laboratório. No primeiro experimento, foram usadas 5g das amostras de solo estéril em erlenmeyer de 125 mL, com 47,5 mL de água destilada estéril (testemunha), 47,5 mL de meio BH e 47,5 mL de meio INPA, com 0,5 mL de petróleo por frasco como fonte de carbono em adição à já presente matéria orgânica de cada solo e 0,1 mL solução bacteriana (consórcios) padronizada 10^5 UFC/mL⁻¹. Esse experimento foi repetido utilizando-se solo não estéril, para verificar se a interação dos micro-organismos selecionados

com a microbiota do solo pode alterar na degradação do petróleo. Todas as amostras foram submetidas a agitação (125 rpm) à temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, realizando diluições seriadas a cada 7 dias (com início no dia da inoculação das amostras nos frascos), no prazo de 21 dias, analisando o desenvolvimento microbiano sob as mesmas condições com as amostras. E as amostras enriquecidas com meio BH líquido, foram inoculadas (em triplicatas) em meio BH sólido e as enriquecidas com meio INPA líquido, foram inoculadas em meio INPA sólido, e adição de 0,1 mL de petróleo na superfície do Agar por placa.

As amostras sem enriquecimentos – com adição apenas de água destilada estéril – foram inoculadas em meio INPA. Nas primeiras horas (dia 0) foram realizadas diluições em série, retirando 1 mL da suspensão de micro-organismos do solo, adicionando 9 mL de solução salina de MgSO_4 a 2% m/v (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5) para verificar qual meio apresentou maior número de bactérias, pelo método de semeadura por espalhamento, onde foi semeada 0,5 mL de suspensão de solo diluída por toda a superfície do Agar, observando após 7 dias qual meio apresentou maior quantidade de bactérias. Ao fim do experimento foram retirados os sobrenadantes e determinados o teor de óleo e graxa residual, onde foram quantificados em qual dos tratamentos houve maior persistência do xenobiótico no meio.

3.12 ANÁLISE DE ÓLEO E GRAXA RESIDUAL

Foi realizada extração com n-hexano no aparelho *Soxhlet* e o resíduo remanescente no balão de destilação foi pesado, determinando-se assim o conteúdo de óleos e graxas na amostra.

3.12.1 Procedimentos analíticos

Após o período de bioestimulação, onde as amostras com solos contaminadas por petróleo passaram 21 dias sob agitação com meio nutricional BH e INPA líquidos e sem enriquecimento, foram retirados os sobrenadantes, submetidos à análise de óleos e graxas remanescentes em cada amostra e adaptando o método descrito em APHA (1995). As amostras foram acidificadas com HCl 1:1 até um pH <2. A análise procederá fazendo uma marca no frasco de coleta, no menisco da água, para posterior determinação do volume da amostra. Foi colocado o papel de filtro no funil *Buchner* o mesmo foi umedecido pressionando as bordas para uma completa vedação. Com a bomba de vácuo em funcionamento, foram filtrados 100 mL da suspensão de terra de infusórios. As amostras

acidificadas foram filtradas, aplicando vácuo até não passar mais água. O papel de filtro foi dobrado e introduzido no cartucho de extração de cada amostra. Quando necessário, foi embebido um chumaço de algodão com n-hexano para limpar a parede interna do frasco armazenagem da amostra para retirar os resíduos de óleos e graxas aderidos no recipiente; e esse chumaço foi colocado dentro do papel de filtro ou no cartucho de extração. O cartucho de extração foi seco em estufa a 103°C por 30 minutos. Foi pesado balão de destilação (seco a 103°C e guardado no dessecador), acrescentando-se 200 mL de n-hexano, conectando ao aparelho de *Soxhlet*, com bateria de extração Sebelin – Marca Lucadema 145/6 – E – Temperatura até 320° com o cartucho de extração previamente colocado em seu interior. Os óleos e graxas foram extraídos na razão de 20 ciclos/h durante 4 horas. Esse tempo foi medido a partir da primeira sifonação. Após a destilação, os produtos foram direcionados para um evaporador rotativo, da marca Lucadema, modelo 001, série 1258608, sendo necessária a utilização de uma bomba a vácuo, da marca Metrológica e modelo 131 e 132 tipo 2VC para finalizar o processo de eliminação do solvente. Após a evaporação do solvente do balão, o mesmo foi levado à estufa a 103°C por 30 min., esfriado no dessecador por mais 30 min. Após este período o balão foi pesado.

O cálculo do rendimento foi feito utilizando a equação 1.

$$\text{Óleo extraído (g)} = \frac{\text{óleo extraído} \times 100}{\text{massa alimentada}} = \frac{\text{óleo}}{100} \text{ (I)}$$

Em que óleo extraído é a quantidade de óleo obtido após a eliminação do solvente e massa alimentada é a massa de matéria-prima utilizada na extração do óleo essencial.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos seguiram delineamento completamente aleatorizado, com 3 repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), pelo teste F. Quando significativo, as comparações de médias foram realizadas pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT 7.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MORFOLOGIAS DAS RIZÓBACTÉRIAS

Os 169 isolados de rizobactérias, 46 reativados e 123 isolados e purificados, foram submetidos à análise morfológica (Tabela 7). Os resultados mostram que: 28 colônias apresentaram forma circular e 131 irregular; 106 exibiram borda regular e 53 irregular; elevação da colônia 104 planas e 55 elevadas; 13 isolados apresentaram transparência e 146 não; cerca de 148 colônias são de cor branca e 11 amarelas; quanto à aparência, 57 colônias são heterogêneas e 102 homogêneas. No que concerne ao muco 46 exibiram pouca quantidade, 40 moderada e 73 abundante; a aparência do muco 102 são homogêneas e 57 heterogêneas (Figura 7a).

De acordo com a coloração de Gram, com exceção do isolado INPA R302 que apresentou coloração roxa (Gram-positiva), todas as demais rizobactérias apresentaram coloração rósea, sendo portanto, Gram-negativas. O tipo morfológico de bactérias observadas foi: bastonete, sendo possível verificar arranjos de: diplobacilos e estreptobacilos (Figura 7b).

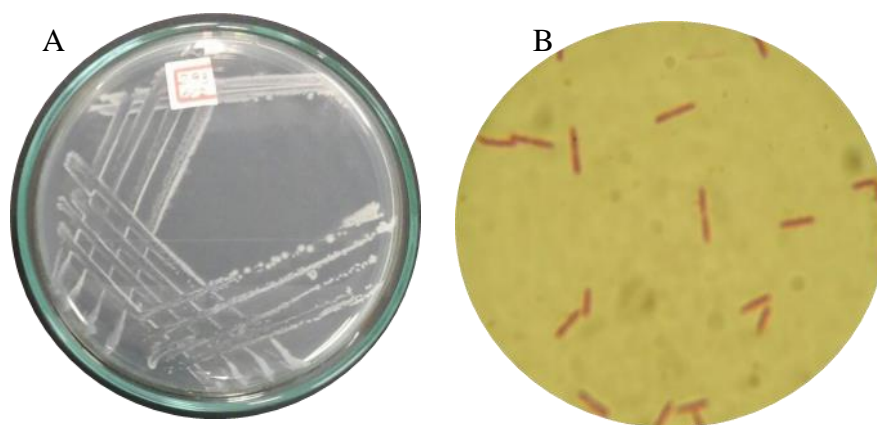


Figura 7: (a) colônia de rizóbio (estirpe INPA R293) em meio YMA, a esquerda, e (b) bactéria Gram-negativa em forma de bastonete, a direita

Tabela 7: Morfologia de estirpes de rizobactérias

Isolados	Forma da Colônia	Borda da Colônia	Elevação	Transparência	Cor	Aparência da Colônia	Muco	Aparência do Muco
INPA R264	Irregular	irregular	plana	sim	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R265	Circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R267	Irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R270	Irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R273	Irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R274	Irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R278	Irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R281	Irregular	irregular	plana	sim	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R283	Irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R287	Circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R293	Irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R300	Irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R302	Circular	irregular	plana	não	Amarela	homogênea	pouco	heterogênea
INPA R307	Irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	moderado	heterogênea
INPA R313	Irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R314	Irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R315	Circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R316	Irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R317	Irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R318	Irregular	regular	elevada	sim	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R325	Irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R332	Irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R341	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R401	irregular	regular	elevada	sim	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R546	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R547	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R548	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R549	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R552	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R555	irregular	regular	plana	não	Amarela	heterogênea	moderado	heterogênea
INPA R557	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R560	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R564	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R565	irregular	irregular	elevada	sim	Branca	homogênea	abundante	homogênea

Tabela 7: Morfologia de estirpes de rizobactérias

Isolados	Forma da Colônia	Borda da Colônia	Elevação	Transparência	Cor	Aparência da Colônia	Muco	Aparência do Muco
INPA R566	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R569	circular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	moderado	heterogênea
INPA R571	irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R572	irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R573	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R583	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R598	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R613	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R614	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R634	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R666	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R672	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R685	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R686	irregular	irregular	plana	não	Amarela	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R689	irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R692	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R695	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R699	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R701	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R702	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R710	irregular	regular	elevada	sim	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R713	irregular	regular	plana	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R715	irregular	regular	elevada	sim	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R717	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R719	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R720	irregular	regular	elevada	sim	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R721	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R722	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R723	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R727	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R729	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R731	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R733	irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R734	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R735	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea

Tabela 7: Morfologia de estirpes de rizobactérias

Isolados	Forma da Colônia	Borda da Colônia	Elevação	Transparência	Cor	Aparência da Colônia	Muco	Aparência do Muco
INPA R738	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R739	irregular	regular	plana	sim	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R740	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R741	irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R742	irregular	regular	elevada	sim	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R743	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R746	irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R751	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R752	irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R754	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R757	irregular	irregular	plana	não	Amarela	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R758	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R759	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R761	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R762	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R763	irregular	regular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R764	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R765	irregular	irregular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R770	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R774	irregular	irregular	plana	sim	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R779	irregular	regular	plana	não	Branca	heterogênea	moderado	heterogênea
INPA R781	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R782	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R783	irregular	regular	plana	sim	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R784	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R785	irregular	irregular	plana	não	Amarela	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R786	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R787	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R790	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R791	irregular	regular	plana	não	Branca	heterogênea	moderado	heterogênea
INPA R792	irregular	irregular	plana	não	Amarela	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R793	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R795	irregular	irregular	plana	não	Amarela	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R796	irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R798	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea

Tabela 7: Morfologia de estirpes de rizobactérias

Isolados	Forma da Colônia	Borda da Colônia	Elevação	Transparência	Cor	Aparência da Colônia	Muco	Aparência do Muco
INPA R799	irregular	regular	plana	não	Amarela	homogênea	pouco	homogênea
INPA R800	circular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R801	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R802	irregular	regular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R803	circular	regular	plana	não	Branca	heterogênea	moderado	heterogênea
INPA R804	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R805	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R806	irregular	regular	plana	não	Branca	heterogênea	moderado	heterogênea
INPA R807	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R969	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R970	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R971	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R972	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R974	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R976	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R977	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R979	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R980	irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R986	irregular	regular	plana	não	Branca	heterogênea	moderado	heterogênea
INPA R988	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R989	irregular	irregular	elevada	sim	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R990	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R991	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R994	irregular	irregular	plana	não	Amarela	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R995	irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R997	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R998	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1011	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R1015	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R1018	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1020	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R1022	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R1023	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R1024	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R1037	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea

Tabela 7: Morfologia de estirpes de rizobactérias

Isolados	Forma da Colônia	Borda da Colônia	Elevação	Transparência	Cor	Aparência da Colônia	Muco	Aparência do Muco
INPA R1038	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1041	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R1042	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1043	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1044	irregular	irregular	plana	não	Amarela	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R1045	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R1046	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R1047	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R1048	irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	abundante	heterogênea
INPA R1051	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1052	irregular	regular	elevada	não	Branca	heterogênea	moderado	heterogênea
INPA R1053	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R1055	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1058	circular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1060	irregular	irregular	plana	não	Amarela	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R1061	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1062	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R1063	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	pouco	homogênea
INPA R1064	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1065	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1067	irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R1068	circular	regular	plana	não	Branca	homogênea	moderado	homogênea
INPA R1069	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1071	irregular	regular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1077	irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1078	irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1079	Irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1080	Irregular	regular	elevada	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea
INPA R1081	Irregular	irregular	plana	não	Branca	heterogênea	pouco	heterogênea
INPA R1082	Irregular	irregular	plana	não	Branca	homogênea	abundante	homogênea

Esses dados corroboram com os resultados de Medeiros et al. (2009) que obtiveram um total de 304 isolados de rizóbio, por meio de nódulos de espécies de *Vigna unguiculata* (Feijão Caupi), em que cerca de 80% dos isolados formaram colônias em até dois dias de crescimento. Estes autores também descreveram a morfologia das colônias e observaram maior variação entre os isolados para as características de quantidade e elasticidade do muco produzido, bem como para tamanho, embora a maior parte tenha apresentado colônias de tamanho classificado como puntiforme. Santos et al. (2007), ao isolarem um total de 433 de rizóbios, de nódulos de espécies de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, também obtiveram resultados satisfatórios quando observaram que 90% dos isolados cresceram em dois dias. Em relação à morfologia, estes concluíram que existe elevada diversidade morfológica da população nativa de rizóbio no semiárido do Rio Grande do Norte. Florentino et al. (2014) analisaram a diversidade morfológica, fenotípica e simbiótica de rizóbios oriundos de nódulos radiculares da leguminosa *Gliricidia sepium*, e relataram que, em seus testes, os isolados de rizóbios apresentaram crescimento rápido, produção de exopolissacarídeos variando de média a alta e a grande maioria produziu reação ácida no meio de cultura.

A avaliação das populações de rizóbio é facilitada com a utilização de plantas iscas e isolamento dos nódulos formados. Além disso, as características morfológicas de rizóbios fornecem informações importantes para a identificação e agrupamento de estirpes. Assim, uma vez que se torna limitante trabalhar com todos os isolados obtidos dos nódulos das leguminosas, avaliar o tempo de crescimento, reação de pH, consistência do muco produzido, características das colônias formadas, são características importantes no agrupamento destes isolados, (CHAGAS JUNIOR, 2007; JARAMILLO ET AL., 2013). Brunetta et al. (2010) visando aumentar o crescimento e a qualidade de mudas de *P. taeda* L., obtiveram 196 isolados de rizobactérias que apresentaram grande variação quanto à morfologia da colônia, incluindo consistência, elevação, cor, velocidade e forma de crescimento.

4.2 TESTE DE DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO EM MEIO SÓLIDO

As tabelas 8, 9, 10, 11, 12 e 13, mostram o crescimento de estirpes de rizóbios com as fontes de carbono manitol (M), óleo diesel (OD), gasolina (G), nafta (N), querosene (Q) e

óleo lubrificante (OL), nos cinco períodos avaliados (3, 6, 9, 12 e 15 dias), testados com os 169 isolados, onde foram adquiridos os seguintes resultados:

Quando utilizado o meio YMA, contendo a fonte de carbono manitol, 103 isolados atingiram nota 3,06 (crescimento elevado), ou acima desta com três dias de incubação e com seis dias, esse número subiu para 118 e com 15 dias de incubação 161 (Figura 8). Apenas os isolados INPA R287, 666, 977, 991, 997, 998, 1041 e 1045 não apresentaram nota satisfatória até o fim do período de 15 dias (Tabela 8).

Tabela 8: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o manitol como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R264	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R265	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R267	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R270	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R273	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R274	3,75	3,88	4,00	4,00	4,00
INPA R278	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R281	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R283	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R287	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R293	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R300	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R302	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R307	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R313	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R314	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R315	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R316	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R317	3,19	3,50	3,56	3,63	3,63
INPA R318	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R325	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R332	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R341	3,38	3,69	3,88	4,00	4,00
INPA R401	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R546	3,63	3,88	4,00	4,00	4,00
INPA R547	1,19	2,38	4,00	4,00	4,00
INPA R548	1,00	1,38	4,00	4,00	4,00
INPA R549	1,00	1,38	4,00	4,00	4,00
INPA R552	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R555	1,25	2,31	4,00	4,00	4,00
INPA R557	1,00	1,50	4,00	4,00	4,00
INPA R560	1,13	2,25	3,06	4,00	4,00
INPA R564	1,00	1,75	4,00	4,00	4,00
INPA R565	1,00	1,50	4,00	4,00	4,00
INPA R566	1,00	1,31	4,00	4,00	4,00
INPA R569	1,00	1,38	4,00	4,00	4,00
INPA R571	1,06	1,38	4,00	4,00	4,00
INPA R572	1,00	1,56	3,69	4,00	4,00
INPA R573	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R583	1,06	2,31	4,00	4,00	4,00
INPA R598	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R613	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R614	1,00	1,50	3,94	4,00	4,00

Tabela 8: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o manitol como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R634	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R666	2,06	2,56	2,44	256	2,63
INPA R672	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R685	1,00	3,13	4,00	4,00	4,00
INPA R686	1,00	3,00	3,69	4,00	4,00
INPA R689	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R692	1,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R695	3,88	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R699	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R701	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R702	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R710	3,38	3,75	4,00	4,00	4,00
INPA R713	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R715	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R717	3,75	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R719	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R720	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R721	3,38	3,63	4,00	4,00	4,00
INPA R722	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R723	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R727	1,00	2,25	4,00	4,00	4,00
INPA R729	3,56	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R731	3,88	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R733	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R734	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R735	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R738	1,00	3,75	4,00	4,00	4,00
INPA R739	1,00	3,13	3,88	4,00	4,00
INPA R740	1,00	3,38	4,00	4,00	4,00
INPA R741	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R742	3,56	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R743	3,75	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R746	1,00	2,56	3,94	4,00	4,00
INPA R751	1,00	2,50	4,00	4,00	4,00
INPA R752	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R754	1,00	2,94	3,31	4,00	4,00
INPA R757	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R758	1,13	1,69	4,00	4,00	4,00
INPA R759	1,00	2,00	4,00	4,00	4,00
INPA R761	1,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R762	1,13	2,81	3,81	3,94	3,94
INPA R763	1,63	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R764	1,00	3,50	4,00	4,00	4,00
INPA R765	2,44	2,88	3,75	3,88	3,88
INPA R770	3,88	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R774	3,19	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R779	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R781	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R782	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R783	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R784	3,94	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R785	1,00	2,75	4,00	4,00	4,00
INPA R786	1,06	2,75	4,00	4,00	4,00
INPA R787	1,06	3,13	4,00	4,00	4,00
INPA R790	3,88	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R791	1,25	1,75	2,69	3,00	3,00
INPA R792	3,44	3,44	3,81	4,00	4,00

Tabela 8: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o manitol como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R793	1,00	3,88	4,00	4,00	4,00
INPA R795	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R796	3,38	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R798	1,69	3,13	3,88	4,00	4,00
INPA R799	1,06	2,75	4,00	4,00	4,00
INPA R800	1,00	2,25	3,88	4,00	4,00
INPA R801	1,00	1,13	3,25	3,44	3,56
INPA R802	1,06	3,19	3,75	4,00	4,00
INPA R803	1,00	3,00	2,56	4,00	4,00
INPA R804	1,06	2,44	3,44	3,75	3,81
INPA R805	1,00	2,56	3,25	3,44	3,50
INPA R806	1,00	2,13	3,19	3,50	3,56
INPA R807	1,00	2,44	4,00	4,00	4,00
INPA R969	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R970	3,25	3,94	3,94	4,00	4,00
INPA R971	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R972	2,31	3,75	4,00	4,00	4,00
INPA R974	3,75	3,94	4,00	4,00	4,00
INPA R976	3,19	3,63	3,63	4,00	4,00
INPA R977	1,13	1,25	1,25	1,25	1,31
INPA R979	2,56	2,81	3,81	4,00	4,00
INPA R980	3,94	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R986	3,13	3,25	3,25	3,50	4,00
INPA R988	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R989	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R990	2,50	2,69	3,06	3,69	3,94
INPA R991	1,31	1,31	1,31	1,50	1,56
INPA R994	2,00	2,13	2,13	3,00	3,00
INPA R995	3,50	3,81	3,81	3,94	4,00
INPA R997	1,31	1,31	1,31	1,50	1,56
INPA R998	1,69	2,19	2,25	2,25	2,25
INPA R1011	3,75	3,88	4,00	4,00	4,00
INPA R1015	3,63	3,75	4,00	4,00	4,00
INPA R1018	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1020	3,69	3,69	3,75	4,00	4,00
INPA R1022	3,00	3,25	3,38	4,00	4,00
INPA R1023	3,31	3,38	3,75	4,00	4,00
INPA R1024	3,75	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1037	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1038	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1041	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
INPA R1042	1,75	2,75	3,13	4,00	4,00
INPA R1043	3,31	3,81	3,81	3,81	4,00
INPA R1044	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1045	1,31	1,31	1,31	1,50	1,56
INPA R1046	3,38	3,56	3,63	3,75	3,75
INPA R1047	3,81	3,81	3,88	3,88	4,00
INPA R1048	4,00	4,00	3,75	4,00	4,00
INPA R1051	1,13	1,69	2,13	3,19	4,00
INPA R1052	3,13	3,38	4,00	4,00	4,00
INPA R1053	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1055	3,06	3,19	3,44	3,50	4,00
INPA R1058	1,00	1,75	2,38	3,25	3,56
INPA R1060	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1061	1,00	2,13	3,19	3,44	3,50
INPA R1062	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1063	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

Tabela 8: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o manitol como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R1064	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1065	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1067	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1068	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1069	3,19	3,88	3,19	3,88	4,00
INPA R1071	3,00	3,00	3,50	3,50	3,50
INPA R1077	3,19	3,88	4,00	4,00	4,00
INPA R1078	2,81	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1079	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1080	3,88	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1081	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1082	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

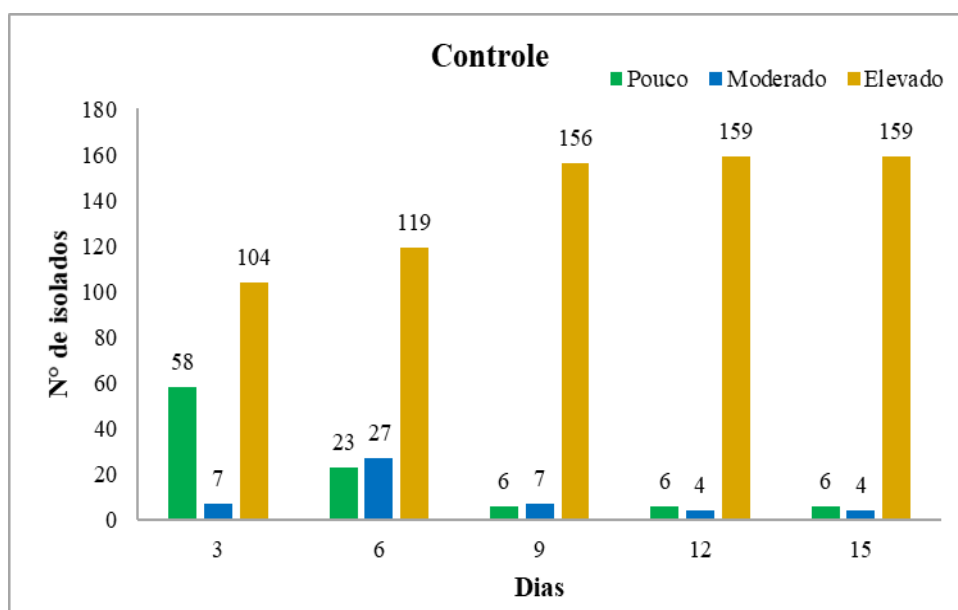


Figura 8: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA com manitol como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.

4.2.1 Fonte de carbono - Óleo Diesel

Quando utilizada a fonte de carbono óleo diesel, com três dias de incubação, 116 isolados apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), 28 isolados apresentaram médio crescimento (nota 2,06 a 3,00) e 25 isolados apresentaram crescimento elevado (3,06 a 4,00). E após seis dias de incubação 64 isolados apresentaram pouco crescimento, 76 crescimento moderado e 29 crescimento elevado (Figura 9).

Notas de crescimento acima 3,06 a partir do sexto dia foi o critério de seleção dos melhores micro-organismos. Foram selecionados 29 micro-organismos – INPA R267, 281, 293, 302, 307, 315, 316, 318, 325, 332, 555, 689, 713, 720, 729, 733, 734, 741, 751, 770, 779, 781, 782, 783, 796, 1048, 1053, 1062 e 1063.

Com 15 dias de incubação, 15 isolados apresentaram pouco crescimento, 32 moderado e 122 elevado. Mostrando que a maioria desses micro-organismo necessitaram de um tempo maior para se adaptar a fonte de carbono (Tabela 9).

Alguns micro-organismos já apresentavam notas 3,06 ou acima desta com 24 horas de incubação com a fonte de carbono óleo diesel (INPA R 672, INPA R710, INPA R734, INPA R796) e com 3 dias atingiram nota 4.

Tabela 9: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo diesel como fonte de carbono

Isolados	3º Dia	6º Dia	9º Dia	12º Dia	15º Dia
INPA R264	2,64	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R265	2,31	2,56	4,00	4,00	4,00
INPA R267	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R270	1,94	2,44	4,00	4,00	4,00
INPA R273	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R274	2,50	3,00	3,00	3,00	3,00
INPA R278	2,63	2,94	4,00	4,00	4,00
INPA R281	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R283	2,00	2,25	2,63	3,00	3,00
INPA R287	1,19	1,25	1,25	1,25	1,25
INPA R293	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R300	2,75	2,94	4,00	4,00	4,00
INPA R302	3,88	3,94	4,00	4,00	4,00
INPA R307	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R313	1,50	2,44	4,00	4,00	4,00
INPA R314	3,00	3,00	3,25	3,25	3,25
INPA R315	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R316	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R317	1,75	2,25	4,00	4,00	4,00
INPA R318	3,88	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R325	3,56	3,63	4,00	4,00	4,00
INPA R332	3,88	3,94	4,00	4,00	4,00
INPA R341	2,56	2,56	2,63	2,75	2,88
INPA R401	2,31	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R546	1,06	2,94	4,00	4,00	4,00
INPA R547	1,00	2,63	3,25	3,69	4,00
INPA R548	1,00	2,38	3,06	3,81	4,00
INPA R549	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50
INPA R552	1,00	2,13	3,50	3,88	4,00
INPA R555	1,06	3,81	3,94	4,00	4,00
INPA R557	1,00	1,50	1,75	2,13	3,75
INPA R560	1,63	2,63	2,63	3,00	3,00
INPA R564	1,06	2,31	2,69	3,56	3,81
INPA R565	1,00	3,00	3,69	4,00	4,00
INPA R566	1,00	2,94	3,06	3,50	3,69
INPA R569	1,13	2,25	2,31	2,63	2,69
INPA R571	1,00	3,00	3,69	3,88	3,94
INPA R572	1,00	2,38	4,00	4,00	4,00
INPA R573	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50

Tabela 9: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo diesel como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R583	1,00	1,75	2,25	2,50	2,75
INPA R598	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R613	1,63	2,63	4,00	4,00	4,00
INPA R614	1,00	2,69	2,81	3,63	3,88
INPA R634	1,00	2,50	3,63	3,81	3,94
INPA R666	1,00	2,19	2,19	2,25	2,25
INPA R672	1,00	2,38	4,00	4,00	4,00
INPA R685	1,38	1,56	1,69	1,69	1,94
INPA R686	1,13	2,44	4,00	4,00	4,00
INPA R689	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R692	1,25	1,94	4,00	4,00	4,00
INPA R695	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R699	1,00	1,19	1,19	1,25	1,31
INPA R701	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50
INPA R702	1,00	1,13	1,06	1,13	1,13
INPA R710	3,00	3,00	3,50	4,00	4,00
INPA R713	2,81	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R715	1,00	2,13	3,50	4,00	4,00
INPA R717	2,00	2,50	4,00	4,00	4,00
INPA R719	2,75	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R720	3,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R721	1,00	2,94	4,00	4,00	4,00
INPA R722	1,88	3,00	3,94	4,00	4,00
INPA R723	2,13	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R727	2,50	2,88	4,00	4,00	4,00
INPA R729	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R731	1,00	1,63	1,75	2,25	2,19
INPA R733	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R734	3,50	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R735	2,19	2,94	3,94	4,00	4,00
INPA R738	1,00	1,75	4,00	4,00	4,00
INPA R739	1,00	2,13	3,25	4,00	4,00
INPA R740	1,06	1,13	4,00	4,00	4,00
INPA R741	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R742	2,50	2,75	4,00	4,00	4,00
INPA R743	2,44	2,88	3,81	4,00	4,00
INPA R746	1,00	1,00	3,00	3,56	3,56
INPA R751	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R752	2,38	2,81	4,00	4,00	4,00
INPA R754	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50
INPA R757	1,00	1,75	3,00	3,69	3,81
INPA R758	1,00	2,25	3,00	4,00	4,00
INPA R759	1,00	2,69	4,00	4,00	4,00
INPA R761	1,00	2,44	2,50	2,50	2,50
INPA R762	2,19	3,00	3,81	4,00	4,00
INPA R763	2,19	2,25	2,25	2,25	2,50
INPA R764	1,25	2,94	4,00	4,00	4,00
INPA R765	2,44	2,88	4,00	4,00	4,00
INPA R770	3,06	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R774	1,56	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R779	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R781	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R782	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R783	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R784	1,44	2,44	4,00	4,00	4,00
INPA R785	1,25	2,56	4,00	4,00	4,00
INPA R786	1,06	2,31	4,00	4,00	4,00

Tabela 9: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo diesel como fonte de carbono

Isolados	3º Dia	6º Dia	9º Dia	12º Dia	15º Dia
INPA R787	2,00	2,88	4,00	4,00	4,00
INPA R790	2,88	2,88	4,00	4,00	4,00
INPA R791	1,13	2,56	2,94	3,38	3,44
INPA R792	1,00	1,69	4,00	4,00	4,00
INPA R793	1,00	1,19	1,94	2,50	2,50
INPA R795	2,00	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R796	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R798	1,00	1,50	2,94	4,00	4,00
INPA R799	1,00	1,25	3,00	4,00	4,00
INPA R800	1,00	1,00	2,94	3,00	3,13
INPA R801	1,25	2,81	3,00	4,00	4,00
INPA R802	1,00	3,00	3,81	4,00	4,00
INPA R803	1,00	1,13	3,00	3,63	3,69
INPA R804	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50
INPA R805	1,00	1,00	2,00	2,31	2,31
INPA R806	1,00	1,00	2,81	3,19	3,44
INPA R807	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50
INPA R969	1,00	2,06	3,13	3,69	4,00
INPA R970	2,00	2,25	2,25	2,25	2,38
INPA R971	1,00	1,00	1,50	2,56	3,06
INPA R972	2,25	2,38	2,63	2,56	2,81
INPA R974	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R976	2,00	2,06	2,06	2,06	2,06
INPA R977	1,00	1,81	2,00	2,25	2,69
INPA R979	1,94	2,69	3,13	3,88	4,00
INPA R980	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50
INPA R986	2,00	2,50	2,50	3,81	3,88
INPA R988	2,19	2,63	2,94	3,44	4,00
INPA R989	2,00	2,00	2,00	2,13	2,13
INPA R990	2,19	2,19	2,19	2,19	2,19
INPA R991	2,00	2,06	3,13	4,00	4,00
INPA R994	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R995	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50
INPA R997	2,00	2,00	2,00	2,13	2,13
INPA R998	1,13	1,63	1,69	1,81	2,06
INPA R1011	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1015	1,00	1,69	1,75	1,88	2,25
INPA R1018	2,00	2,00	2,00	2,13	2,13
INPA R1020	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1022	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R1023	2,00	2,00	2,00	2,13	2,13
INPA R1024	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50
INPA R1037	2,00	2,00	2,00	2,13	2,13
INPA R1038	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1041	1,00	1,88	2,06	2,25	2,44
INPA R1042	1,50	2,13	2,50	3,81	4,00
INPA R1043	2,00	2,00	2,00	3,25	3,38
INPA R1044	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R1045	2,00	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1046	2,00	2,00	2,00	2,13	2,13
INPA R1047	2,56	2,56	2,56	2,75	2,75
INPA R1048	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1051	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50
INPA R1052	1,00	2,19	2,13	2,25	2,56
INPA R1053	2,38	3,56	3,81	4,13	4,00
INPA R1055	2,31	2,44	3,25	3,75	3,88
INPA R1058	2,00	2,50	2,50	2,50	2,50

Tabela 9: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo diesel como fonte de carbono

Isolados	3º Dia	6º Dia	9º Dia	12º Dia	15º Dia
INPA R1060	1,00	1,00	1,00	1,88	3,00
INPA R1061	1,00	1,75	2,75	3,44	3,63
INPA R1062	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1063	3,75	3,81	3,81	3,94	4,00
INPA R1064	1,00	2,19	3,56	3,81	3,81
INPA R1065	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50
INPA R1067	1,00	1,00	3,44	4,00	4,00
INPA R1068	1,00	1,06	2,56	4,00	4,00
INPA R1069	1,00	1,00	3,06	3,25	3,38
INPA R1071	1,00	2,25	3,13	4,00	4,00
INPA R1077	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50
INPA R1078	2,00	2,00	2,00	2,13	2,13
INPA R1079	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R1080	2,00	2,00	2,00	2,13	2,13
INPA R1081	1,00	1,25	3,00	3,50	3,50
INPA R1082	1,00	1,00	2,56	3,38	3,50

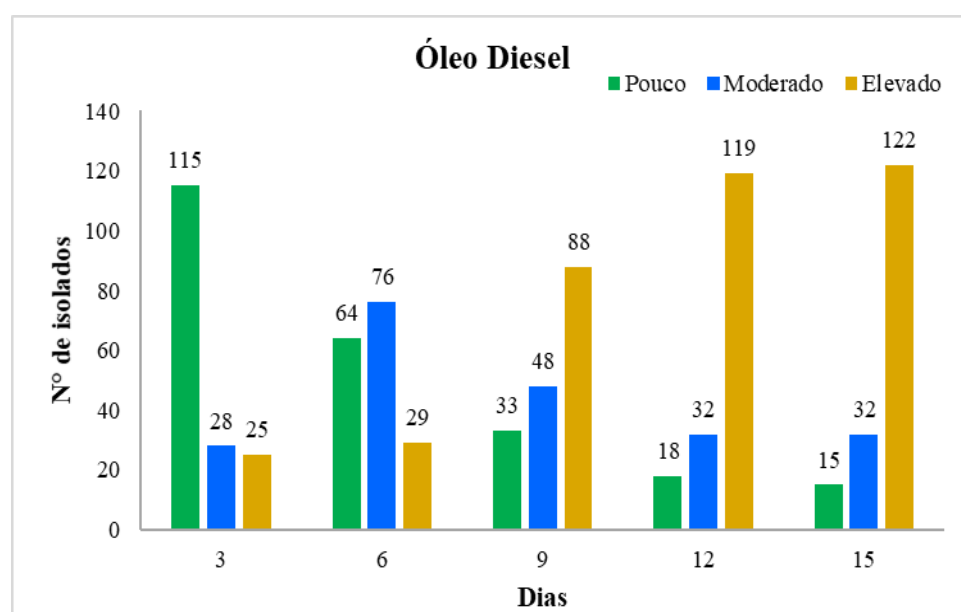


Figura 9: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo óleo diesel como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.

4.2.2 Fonte de carbono – Gasolina

Ao se utilizar essa fonte de carbono, 117 isolados apresentaram pouco crescimento após três dias de incubação, 35 médio crescimento e 17 crescimento elevado. E após o sexto dia incubação 77 isolados apresentaram pouco crescimento, 70 crescimento moderado e 22 crescimento elevado (Figura 10).

O mesmo critério de notas de crescimento acima de 3,06 após o sexto dia, foi mantido em todos os testes dos com os demais derivados de petróleo. Foram selecionados 22 micro-

organismos – INPA R 267, 281, 293, 302, 307, 315, 316, 325, 672, 689, 710, 733, 781, 791, 798, 970, 980, 986, 995, 1052, 1053, 1062.

Com 15 dias de incubação, 38 isolados apresentaram pouco crescimento, 28 moderado e 103 elevado. Mostrando que a maioria desses micro-organismo necessitaram de um tempo maior para se adaptar a fonte de carbono (Tabela 10).

Tabela 10: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o gasolina como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R264	2,38	2,38	2,50	2,81	2,81
INPA R265	2,38	3,94	4,00	4,00	4,00
INPA R267	3,94	3,94	3,94	3,94	3,94
INPA R270	2,00	2,88	3,69	3,69	3,69
INPA R273	1,80	1,94	2,69	3,00	3,00
INPA R274	2,00	2,19	5,00	2,81	2,63
INPA R278	2,00	2,00	3,00	4,00	4,00
INPA R281	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R283	2,00	2,00	3,00	3,00	3,00
INPA R287	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R293	3,75	3,88	3,94	3,94	3,94
INPA R300	1,00	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R302	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R307	3,94	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R313	2,00	2,00	3,00	4,00	4,00
INPA R314	1,00	2,25	4,00	4,00	4,00
INPA R315	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R316	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R317	1,88	2,00	2,06	2,06	2,38
INPA R318	1,75	2,00	3,00	4,00	4,00
INPA R325	3,94	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R332	2,75	3,00	3,31	3,38	3,50
INPA R341	1,63	1,69	1,69	1,75	1,75
INPA R401	2,00	2,13	2,19	2,25	3,13
INPA R546	1,06	1,31	1,56	1,69	1,81
INPA R547	1,50	2,50	3,75	3,88	3,88
INPA R548	1,00	1,00	1,06	1,13	1,13
INPA R549	1,25	1,44	1,94	2,00	2,19
INPA R552	1,44	2,38	3,63	3,63	3,88
INPA R555	1,00	1,31	1,38	1,50	2,25
INPA R557	1,44	2,00	3,19	3,38	3,81
INPA R560	1,94	2,13	2,31	2,75	2,75
INPA R564	1,50	2,75	3,19	3,81	4,00
INPA R565	1,25	2,06	2,94	3,50	3,69
INPA R566	1,00	1,31	1,56	1,81	2,19
INPA R569	1,19	1,75	2,13	2,50	2,50
INPA R571	1,31	2,13	2,75	2,94	3,25
INPA R572	1,31	2,25	2,38	3,19	3,31
INPA R573	1,25	2,13	3,75	3,88	3,94
INPA R583	1,88	2,00	2,00	2,75	2,75
INPA R598	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R613	2,00	2,06	4,00	4,00	4,00
INPA R614	1,31	2,88	3,63	3,88	3,88
INPA R634	2,00	2,00	4,00	4,00	4,00
INPA R666	1,38	2,00	2,13	2,13	2,25
INPA R672	3,94	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R685	1,50	1,75	1,94	1,94	1,94

Tabela 10: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o gasolina como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R686	1,00	2,88	3,00	3,19	3,25
INPA R689	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R692	1,00	1,00	2,31	3,19	3,56
INPA R695	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R699	3,00	3,00	3,00	4,00	4,00
INPA R701	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R702	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R710	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R713	2,75	2,88	4,00	4,00	4,00
INPA R715	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R717	2,75	2,75	3,50	4,00	4,00
INPA R719	2,31	2,81	3,81	4,00	4,00
INPA R720	2,00	2,50	3,75	4,00	4,00
INPA R721	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R722	1,25	2,00	2,75	3,50	3,50
INPA R723	2,38	2,88	4,00	4,00	4,00
INPA R727	1,00	1,19	2,38	2,50	4,00
INPA R729	2,63	3,00	3,94	3,94	3,94
INPA R731	1,00	2,00	2,13	2,13	2,13
INPA R733	3,00	3,25	4,00	4,00	4,00
INPA R734	2,31	2,94	3,00	4,00	4,00
INPA R735	1,06	1,25	3,25	3,44	3,69
INPA R738	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R739	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R740	1,00	1,88	1,88	2,88	3,00
INPA R741	1,00	1,13	1,56	2,38	3,13
INPA R742	2,13	3,00	3,19	3,63	3,63
INPA R743	1,94	2,88	3,19	3,31	3,38
INPA R746	1,00	1,13	1,13	1,63	1,63
INPA R751	1,00	1,13	1,13	1,63	1,63
INPA R752	3,00	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R754	1,50	2,81	3,00	4,00	4,00
INPA R757	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R758	1,00	2,00	3,00	3,75	3,75
INPA R759	1,00	2,00	3,00	3,75	4,00
INPA R761	1,00	2,00	2,69	3,00	3,00
INPA R762	1,00	1,13	1,50	1,75	1,75
INPA R763	1,75	2,25	2,50	2,50	2,50
INPA R764	2,75	2,75	3,50	4,00	4,00
INPA R765	2,55	3,00	3,00	3,00	3,00
INPA R770	2,56	3,00	3,00	3,00	3,00
INPA R774	2,69	3,00	3,00	3,13	3,88
INPA R779	2,00	2,06	2,50	2,81	3,13
INPA R781	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R782	2,63	2,63	3,13	4,00	4,00
INPA R783	2,31	2,81	3,00	4,00	4,00
INPA R784	2,25	2,63	3,00	4,00	4,00
INPA R785	3,00	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R786	2,31	2,81	4,00	4,00	4,00
INPA R787	1,00	1,00	1,94	2,13	2,25
INPA R790	1,00	2,81	4,00	4,00	4,00
INPA R791	3,00	3,25	4,00	4,00	4,00
INPA R792	3,00	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R793	1,81	2,25	2,25	2,31	2,56
INPA R795	1,00	1,00	1,00	1,13	1,13
INPA R796	1,13	1,88	3,06	3,25	3,44
INPA R798	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

Tabela 10: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o gasolina como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R799	1,00	1,75	2,13	3,00	3,00
INPA R800	1,00	1,75	2,13	3,00	3,00
INPA R801	1,00	1,00	3,56	3,63	3,63
INPA R802	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R803	1,00	1,25	1,25	1,69	1,69
INPA R804	1,00	2,00	2,63	2,88	3,00
INPA R805	1,25	2,94	3,13	3,13	3,25
INPA R806	1,00	1,31	1,31	1,81	1,81
INPA R807	1,00	1,81	2,63	3,63	3,75
INPA R969	2,50	2,69	3,31	3,56	3,88
INPA R970	3,31	3,81	3,94	3,94	4,00
INPA R971	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R972	1,25	1,44	1,50	1,63	1,75
INPA R974	3,00	3,00	3,75	3,81	3,88
INPA R976	1,00	1,38	2,75	3,31	3,50
INPA R977	1,13	1,75	2,25	2,50	2,69
INPA R979	2,00	2,88	4,00	4,00	4,00
INPA R980	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R986	3,63	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R988	2,00	2,25	2,56	3,13	3,63
INPA R989	1,81	2,56	2,88	3,75	3,88
INPA R990	2,00	2,19	2,81	3,75	3,88
INPA R991	2,25	2,63	3,31	3,31	3,38
INPA R994	1,00	1,00	2,06	2,13	2,31
INPA R995	1,75	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R997	2,50	2,75	3,81	3,94	3,94
INPA R998	1,00	1,00	1,19	1,19	1,31
INPA R1011	1,75	2,19	2,88	3,00	3,00
INPA R1015	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1018	1,31	1,50	1,50	1,50	1,50
INPA R1020	2,00	2,44	2,63	2,69	3,13
INPA R1022	2,13	2,88	3,75	3,75	3,88
INPA R1023	2,00	2,31	2,56	3,63	3,75
INPA R1024	3,00	3,00	3,25	4,00	4,00
INPA R1037	2,00	2,38	2,69	3,75	3,81
INPA R1038	2,00	2,06	2,56	4,00	4,00
INPA R1041	1,38	1,13	2,44	2,81	2,88
INPA R1042	1,50	2,56	2,63	3,00	3,19
INPA R1043	1,00	1,56	2,75	3,81	3,88
INPA R1044	1,63	2,44	3,63	4,00	4,00
INPA R1045	1,81	2,50	3,31	3,38	3,81
INPA R1046	1,69	2,00	2,88	3,25	3,38
INPA R1047	2,50	2,56	2,69	2,88	3,06
INPA R1048	1,25	2,00	3,13	3,63	3,81
INPA R1051	2,56	2,75	3,50	3,75	3,81
INPA R1052	2,25	3,94	4,00	4,00	4,00
INPA R1053	2,13	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1055	1,00	1,00	1,13	1,38	1,50
INPA R1058	2,69	2,75	3,19	3,75	3,94
INPA R1060	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1061	1,00	2,00	2,50	3,06	3,50
INPA R1062	3,19	3,19	3,19	3,31	3,50
INPA R1063	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1064	1,00	1,00	1,06	1,25	1,31
INPA R1065	1,19	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1067	1,00	2,31	2,56	2,56	2,88
INPA R1068	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

Tabela 10: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o gasolina como fonte de carbono

Isolados	3º Dia	6º Dia	9º Dia	12º Dia	15º Dia
INPA R1069	1,00	1,00	1,06	1,56	1,75
INPA R1071	1,00	1,00	1,50	1,50	1,63
INPA R1077	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1078	1,75	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1079	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1080	1,00	1,00	1,31	1,81	2,00
INPA R1081	1,00	2,19	3,00	3,13	3,19
INPA R1082	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

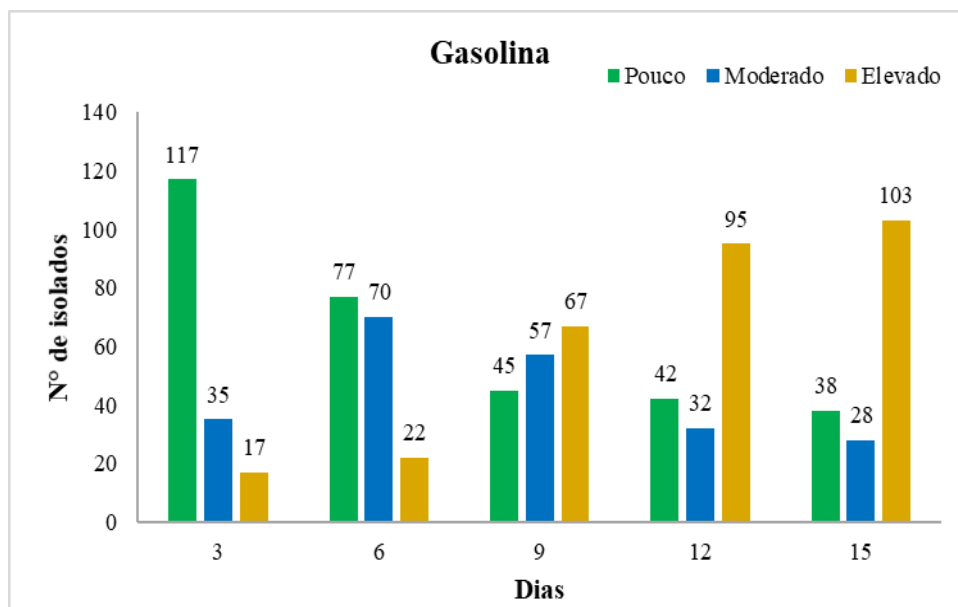


Figura 10: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo gasolina como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação

4.2.3 Fonte de carbono – Nafta

Ao se utilizar essa fonte de carbono, 110 isolados apresentaram pouco crescimento após três dias de incubação, 44 médio crescimento e 15 crescimento elevado (Figura 11). E após o sexto dia incubação 69 isolados apresentaram pouco crescimento, 78 crescimento moderado e 22 crescimento elevado. Foram selecionados 22 micro-organismos – INPA R281, 293, 302, 307, 315, 316, 318, 325, 332, 689, 710, 713, 729, 734, 751, 770, 779, 781, 782, 783, 1051 e 1062.

Com 15 dias de incubação, 40 isolados apresentaram pouco crescimento, 22 moderado e 107 elevado. Mostrando que a maioria desses micro-organismo necessitaram de um tempo maior para se adaptar a fonte de carbono (Tabela 11).

Alguns micro-organismos já apresentavam nota 4,00 com 24 horas de incubação com a fonte de carbono nafta (INPA R281, INPA R293, INPA R302, INPA R307, INPA R689, INPA R781, INPA R783).

Tabela 11: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o nafta como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R264	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R265	1,00	1,75	1,50	2,00	2,25
INPA R267	1,00	1,06	1,50	2,31	3,00
INPA R270	1,31	3,00	3,81	4,00	4,00
INPA R273	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R274	1,75	1,75	2,13	2,19	2,19
INPA R278	2,00	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R281	3,50	3,88	3,88	3,88	3,88
INPA R283	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R287	1,00	1,88	2,50	2,50	2,63
INPA R293	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R300	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R302	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R307	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R313	3,00	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R314	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R315	1,75	3,56	3,94	3,94	4,00
INPA R316	3,56	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R317	1,19	1,75	2,13	2,25	2,63
INPA R318	3,38	3,69	3,81	3,88	3,88
INPA R325	3,25	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R332	3,56	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R341	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R401	2,31	2,31	2,50	2,81	2,88
INPA R546	1,19	1,19	1,31	1,38	1,88
INPA R547	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R548	1,00	2,44	3,06	3,13	3,50
INPA R549	1,00	2,00	4,00	4,00	4,00
INPA R552	2,00	2,19	2,44	2,75	2,88
INPA R555	1,19	1,19	1,31	1,38	1,88
INPA R557	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R560	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R564	1,19	1,19	1,31	1,38	1,88
INPA R565	1,31	1,31	1,38	1,44	1,88
INPA R566	2,00	2,13	2,50	3,06	3,19
INPA R569	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R571	1,19	1,19	1,31	1,38	1,88
INPA R572	2,75	2,81	3,50	3,69	3,75
INPA R573	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R583	1,31	1,31	1,38	1,44	1,88
INPA R598	1,19	1,19	1,31	1,38	1,88
INPA R613	1,94	2,38	3,88	3,88	4,00
INPA R614	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R634	1,00	3,00	3,69	3,88	3,94
INPA R666	1,19	1,19	1,31	1,38	1,88
INPA R672	2,50	2,94	3,50	3,94	3,94
INPA R685	1,00	2,25	3,75	3,81	3,81
INPA R686	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R689	3,63	3,75	3,88	3,88	3,88
INPA R692	1,00	2,31	3,56	3,81	3,88
INPA R695	1,31	1,31	1,38	1,44	1,88

Tabela 11: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o nafta como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R699	1,19	1,19	1,31	1,38	1,88
INPA R701	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R702	1,00	2,13	3,88	4,00	4,00
INPA R710	2,25	3,06	3,81	3,81	3,88
INPA R713	1,88	3,19	3,53	3,81	3,88
INPA R715	2,81	2,88	2,94	3,38	3,56
INPA R717	1,38	2,00	4,00	4,00	4,00
INPA R719	2,00	2,00	2,13	2,38	2,88
INPA R720	2,25	2,88	2,94	2,88	3,25
INPA R721	2,50	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R722	2,50	2,63	2,75	4,00	4,00
INPA R723	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R727	1,00	2,75	3,75	3,81	3,88
INPA R729	1,13	3,25	3,38	3,50	3,50
INPA R731	1,00	2,00	3,31	3,81	3,81
INPA R733	2,44	2,81	3,06	3,19	3,25
INPA R734	3,50	3,50	3,94	3,94	4,00
INPA R735	1,81	2,56	4,00	4,00	4,00
INPA R738	1,00	2,94	4,00	4,00	4,00
INPA R739	1,00	1,06	1,44	3,06	3,19
INPA R740	1,00	2,75	3,06	3,25	3,38
INPA R741	1,06	2,88	3,13	3,19	3,25
INPA R742	1,25	2,81	3,06	3,13	3,13
INPA R743	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R746	2,00	2,13	2,19	2,75	2,88
INPA R751	3,75	3,94	4,00	4,00	4,00
INPA R752	2,50	2,88	4,00	4,00	4,00
INPA R754	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R757	2,00	2,75	4,00	4,00	4,00
INPA R758	1,00	2,94	3,50	3,63	3,75
INPA R759	1,00	3,00	3,69	3,69	3,75
INPA R761	1,00	2,56	4,00	4,00	4,00
INPA R762	1,00	1,63	2,75	2,81	3,13
INPA R763	1,13	2,38	2,38	2,81	3,00
INPA R764	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R765	1,50	2,75	4,00	4,00	4,00
INPA R770	2,19	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R774	2,00	2,38	2,69	2,75	2,94
INPA R779	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R781	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R782	2,38	3,19	3,94	4,00	4,00
INPA R783	2,88	3,31	3,81	3,88	3,94
INPA R784	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R785	1,00	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R786	1,00	1,50	2,88	3,44	3,63
INPA R787	1,00	1,44	3,06	3,50	3,63
INPA R790	1,38	2,63	4,00	4,00	4,00
INPA R791	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R792	2,31	2,94	4,00	4,00	4,00
INPA R793	1,00	2,25	2,88	3,13	3,50
INPA R795	2,56	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R796	1,38	2,44	2,56	2,75	3,00
INPA R798	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R799	2,38	2,63	2,81	3,13	3,19
INPA R800	1,06	1,75	3,13	3,31	3,38
INPA R801	2,75	3,00	3,06	3,06	3,19
INPA R802	2,25	2,13	2,56	2,88	2,94

Tabela 11: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o nafta como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R803	1,00	3,00	3,75	4,00	4,00
INPA R804	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R805	3,00	3,00	3,56	3,63	3,69
INPA R806	2,63	2,63	2,81	3,19	3,25
INPA R807	1,00	2,31	3,19	3,25	3,31
INPA R969	2,94	2,94	3,25	3,31	3,38
INPA R970	2,31	2,63	3,13	3,63	3,69
INPA R971	1,50	2,50	3,44	3,56	3,81
INPA R972	2,69	2,75	2,88	3,06	3,06
INPA R974	1,00	2,25	2,56	3,19	3,25
INPA R976	3,00	3,00	3,31	3,38	3,50
INPA R977	1,25	1,38	1,75	1,88	2,06
INPA R979	2,94	3,00	3,50	3,81	3,88
INPA R980	1,94	2,94	4,00	4,00	4,00
INPA R986	2,00	2,00	3,00	4,00	4,00
INPA R988	2,88	2,88	3,63	3,63	3,69
INPA R989	2,44	2,63	2,75	3,31	3,44
INPA R990	1,00	1,25	1,75	2,13	2,44
INPA R991	2,00	2,88	3,31	3,75	3,94
INPA R994	1,00	1,56	2,94	3,13	3,19
INPA R995	1,63	2,63	3,69	3,75	3,88
INPA R997	2,88	2,94	3,13	3,50	3,56
INPA R998	1,13	1,25	1,50	1,50	1,63
INPA R1011	1,50	2,19	2,75	2,75	2,88
INPA R1015	1,75	1,94	2,31	2,44	3,00
INPA R1018	2,63	2,88	3,06	3,06	3,44
INPA R1020	1,00	1,38	3,25	3,31	3,44
INPA R1022	2,25	2,31	3,56	3,75	3,88
INPA R1023	2,13	3,00	3,00	3,38	3,50
INPA R1024	2,56	2,75	2,94	2,94	3,06
INPA R1037	2,50	2,56	2,63	2,75	2,75
INPA R1038	1,25	1,75	3,50	3,69	3,75
INPA R1041	2,31	2,31	2,38	2,38	2,38
INPA R1042	2,94	3,00	3,31	3,38	3,56
INPA R1043	2,81	2,94	3,31	3,63	3,81
INPA R1044	2,31	2,38	3,94	3,94	4,00
INPA R1045	2,13	2,13	2,13	2,31	2,31
INPA R1046	2,19	2,19	2,19	2,38	2,44
INPA R1047	1,63	1,94	2,31	2,38	2,69
INPA R1048	2,69	2,88	3,56	3,69	3,75
INPA R1051	3,88	3,94	4,00	4,00	4,00
INPA R1052	2,75	2,88	3,50	3,56	3,81
INPA R1053	3,00	3,00	3,75	3,94	4,00
INPA R1055	2,88	2,94	3,06	3,19	3,25
INPA R1058	1,25	1,75	3,50	3,94	4,00
INPA R1060	1,88	1,94	2,13	2,19	2,38
INPA R1061	1,00	1,88	3,69	3,88	4,00
INPA R1062	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1063	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1064	1,00	1,56	1,81	2,81	3,38
INPA R1065	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1067	1,00	2,50	2,94	3,06	3,13
INPA R1068	1,00	2,94	3,19	3,38	3,44
INPA R1069	1,00	1,19	1,25	2,38	2,94
INPA R1071	1,00	1,50	1,56	2,63	2,88
INPA R1077	1,25	2,00	2,69	3,63	4,00
INPA R1078	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

Tabela 11: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o nafta como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R1079	1,19	1,19	1,31	1,38	1,88
INPA R1080	1,75	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1081	1,44	1,44	1,56	1,63	1,88
INPA R1082	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

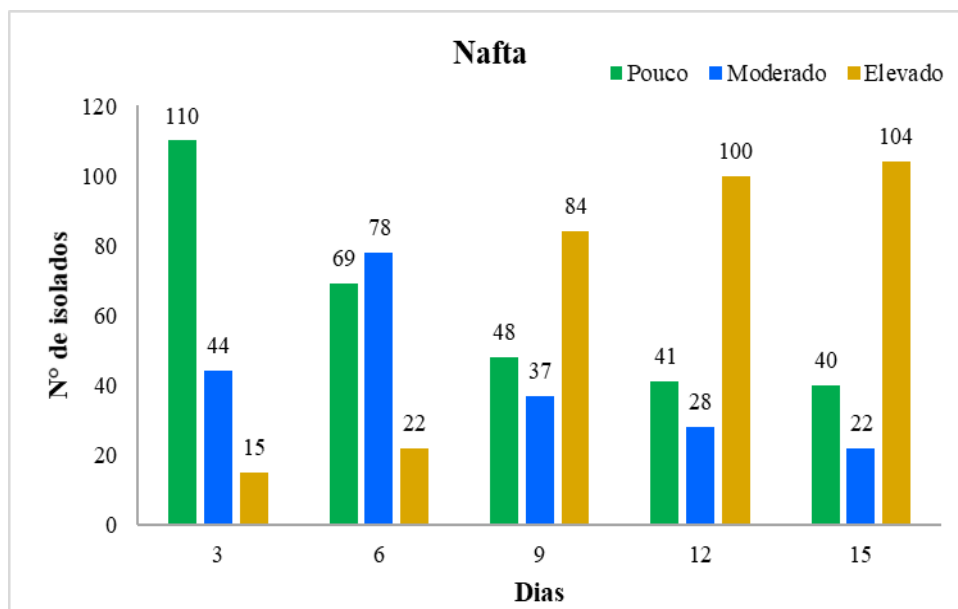


Figura 11: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo nafta como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação

4.2.4 Fonte de carbono – Querosene

Ao se utilizar essa fonte de carbono, 108 isolados apresentaram pouco crescimento após três dias de incubação, 26 médio crescimento e 35 crescimento elevado (Figura 12). E após o sexto dia incubação 84 isolados apresentaram pouco crescimento, 45 crescimento moderado e 40 crescimento elevado. Foram selecionados 40 micro-organismos – INPA R 267, 281, 302, 307, 316, 318, 325, 332, 555, 672, 710, 713, 733, 734, 741, 751, 770, 781, 782, 783, 784, 803, 969, 970, 972, 974, 976, 980, 986, 989, 995, 997, 1037, 1043, 1044, 1048, 1052, 1053, 1077 e 1081.

Com 15 dias de incubação, 62 isolados apresentaram pouco crescimento, 13 moderado e 94 elevado. Mostrando que a maioria desses micro-organismo necessitaram de um tempo maior para se adaptar a fonte de carbono (Tabela 12).

O isolado INPA R672 atingiu nota 4,00 com 24 horas de incubação e alterou a cor do meio de cultura para roxo.

Tabela 12: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o querosene como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R264	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R265	1,00	1,06	1,50	1,50	1,50
INPA R267	1,00	3,19	4,00	4,00	4,00
INPA R270	1,25	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R273	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R274	1,00	1,06	1,50	1,50	1,50
INPA R278	3,00	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R281	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R283	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R287	1,00	1,06	1,50	1,50	1,50
INPA R293	2,25	2,50	2,50	2,56	2,75
INPA R300	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R302	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R307	3,63	3,75	3,88	4,00	4,00
INPA R313	1,90	2,56	4,00	4,00	4,00
INPA R314	1,00	1,06	1,50	1,50	1,50
INPA R315	2,63	3,00	3,94	4,00	4,00
INPA R316	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R317	1,00	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R318	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R325	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R332	3,81	3,81	3,88	4,00	4,00
INPA R341	1,00	1,06	1,50	1,50	1,50
INPA R401	1,00	2,00	2,13	3,81	3,88
INPA R546	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R547	1,00	1,06	1,50	1,50	1,50
INPA R548	1,00	1,00	1,00	1,00	1,06
INPA R549	1,00	1,06	1,75	2,06	2,06
INPA R552	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R555	3,00	3,25	3,25	3,31	3,38
INPA R557	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R560	1,00	1,06	1,50	1,75	1,75
INPA R564	1,00	1,06	1,50	1,50	1,50
INPA R565	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R566	1,00	1,63	1,75	2,56	2,56
INPA R569	1,00	1,06	1,50	1,50	1,50
INPA R571	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R572	1,63	2,94	3,81	3,81	3,88
INPA R573	1,00	1,06	1,50	1,75	1,75
INPA R583	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R598	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R613	3,63	2,75	3,69	3,75	3,81
INPA R614	1,00	1,06	1,50	1,50	1,50
INPA R634	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R666	1,00	1,06	1,50	1,75	1,75
INPA R672	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R685	1,63	1,63	1,75	3,56	3,69
INPA R686	1,00	1,06	1,50	1,50	1,50
INPA R689	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R692	1,00	2,13	3,25	3,25	3,50
INPA R695	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R699	1,00	1,06	1,50	1,75	1,75
INPA R701	1,00	1,06	1,50	1,50	1,50
INPA R702	2,38	2,50	2,63	2,69	2,94
INPA R710	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R713	3,44	3,75	4,00	4,00	4,00

Tabela 12: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o querosene como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R715	1,75	2,50	4,00	4,00	4,00
INPA R717	1,00	1,06	1,50	1,75	1,75
INPA R719	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R720	1,00	1,06	1,50	1,75	1,75
INPA R721	1,00	1,94	3,31	3,38	3,63
INPA R722	2,75	2,94	4,00	4,00	4,00
INPA R723	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R727	1,31	2,25	2,63	2,81	2,94
INPA R729	1,00	1,94	2,00	2,88	2,88
INPA R731	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R733	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R734	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R735	2,13	2,69	3,38	3,75	3,75
INPA R738	1,00	3,00	3,31	3,38	3,50
INPA R739	1,00	1,13	2,44	3,38	3,81
INPA R740	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R741	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R742	2,44	2,56	3,06	3,19	3,67
INPA R743	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R746	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R751	3,44	3,63	3,63	3,63	3,75
INPA R752	2,94	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R754	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R757	2,00	2,13	4,00	4,00	4,00
INPA R758	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R759	1,00	1,00	2,63	3,00	3,13
INPA R761	1,25	1,50	1,63	1,88	2,06
INPA R762	1,00	1,00	2,25	2,25	2,38
INPA R763	2,13	2,88	3,44	4,00	4,00
INPA R764	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R765	1,94	2,38	4,00	4,00	4,00
INPA R770	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R774	1,00	1,88	2,06	3,19	3,56
INPA R779	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R781	2,75	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R782	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R783	3,63	3,75	3,94	4,00	4,00
INPA R784	3,81	3,88	4,00	4,00	4,00
INPA R785	1,00	1,44	2,19	2,38	2,63
INPA R786	1,00	1,13	3,44	3,88	3,94
INPA R787	1,00	2,00	3,63	3,81	3,88
INPA R790	3,00	3,00	3,88	4,00	4,00
INPA R791	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R792	3,00	3,00	3,44	3,63	3,75
INPA R793	3,00	3,00	3,06	3,13	3,19
INPA R795	2,50	2,63	4,00	4,00	4,00
INPA R796	1,06	1,75	2,50	2,88	2,94
INPA R798	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R799	1,00	1,94	2,44	3,19	3,31
INPA R800	1,88	3,00	3,31	3,38	3,50
INPA R801	2,00	2,50	3,81	3,81	3,88
INPA R802	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R803	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R804	2,00	2,31	2,56	2,88	3,00
INPA R805	1,06	1,94	2,50	3,25	3,25
INPA R806	1,56	2,38	3,06	3,81	4,00
INPA R807	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Tabela 12: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o querosene como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R969	3,81	3,81	3,81	4,00	4,00
INPA R970	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R971	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R972	2,06	3,13	3,44	3,63	3,63
INPA R974	3,81	3,81	3,88	4,00	4,00
INPA R976	3,44	3,63	3,75	3,88	3,88
INPA R977	1,00	1,19	1,19	1,25	1,25
INPA R979	2,38	2,88	3,88	3,88	4,00
INPA R980	3,56	3,63	3,63	3,63	3,63
INPA R986	3,75	3,75	3,81	4,00	4,00
INPA R988	1,25	1,88	2,94	3,69	4,00
INPA R989	3,06	3,25	3,31	3,31	3,31
INPA R990	2,00	2,50	3,06	3,88	4,00
INPA R991	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R994	1,94	2,06	2,50	3,00	3,00
INPA R995	3,56	3,63	3,75	3,75	3,94
INPA R997	3,38	3,44	3,44	3,50	3,50
INPA R998	1,00	1,00	1,06	1,06	1,31
INPA R1011	2,00	2,56	2,63	2,75	3,25
INPA R1015	1,94	2,31	2,50	3,19	3,25
INPA R1018	2,56	2,94	3,13	3,13	3,13
INPA R1020	2,31	2,56	2,69	2,75	3,00
INPA R1022	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R1023	2,50	3,00	3,25	3,75	3,75
INPA R1024	3,00	3,00	3,69	3,69	3,69
INPA R1037	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1038	2,94	3,00	3,44	3,44	3,50
INPA R1041	1,00	1,00	1,00	1,06	1,06
INPA R1042	1,38	2,13	3,13	3,88	4,00
INPA R1043	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1044	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1045	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13
INPA R1046	1,50	1,56	1,63	1,63	1,75
INPA R1047	1,50	1,94	2,81	3,31	3,75
INPA R1048	3,38	3,63	3,63	3,69	3,75
INPA R1051	2,56	2,63	3,69	3,94	3,94
INPA R1052	2,63	3,06	3,19	3,19	3,19
INPA R1053	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1055	2,75	2,88	2,88	3,13	3,13
INPA R1058	1,00	1,06	1,50	1,75	2,00
INPA R1060	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R1061	1,00	1,56	2,88	3,31	3,38
INPA R1062	2,00	2,88	3,69	3,69	4,00
INPA R1063	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R1064	1,00	2,75	3,69	3,88	3,88
INPA R1065	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R1067	1,13	2,00	3,63	3,81	4,00
INPA R1068	1,06	1,75	3,44	4,00	4,00
INPA R1069	1,00	2,19	2,81	3,56	3,69
INPA R1071	1,00	2,94	3,94	4,00	4,00
INPA R1077	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88
INPA R1078	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R1079	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R1080	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1081	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1082	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

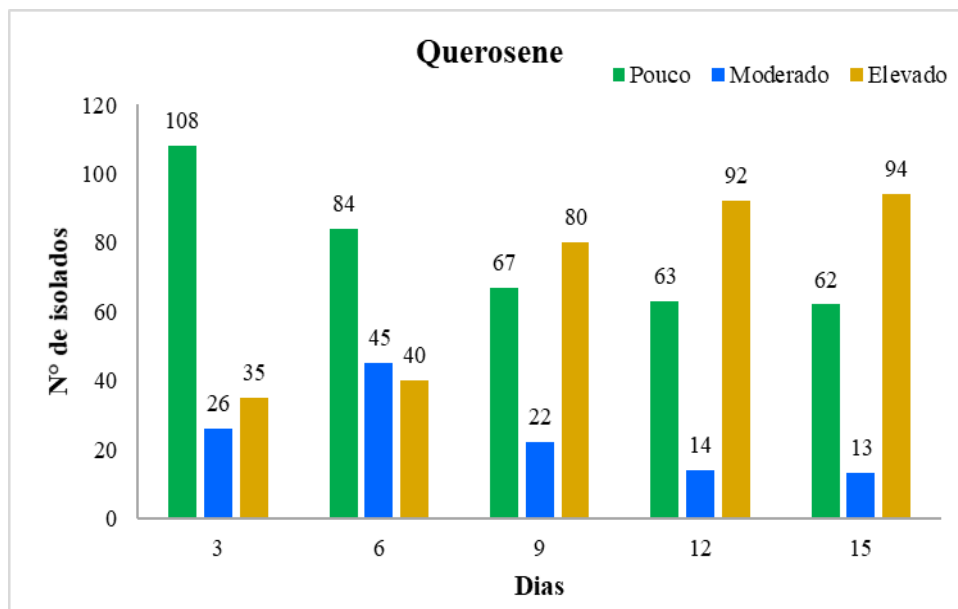


Figura 12: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo querosene como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação

4.2.5 Fonte de carbono – Óleo Lubrificante

Quando utilizada essa fonte de carbono, com três dias de incubação, 116 isolados apresentaram pouco crescimento, 31 isolados crescimento moderado e 22 apresentaram crescimento elevado (Figura 13 e 14). E após seis dias de incubação 84 isolados apresentaram pouco crescimento, 58 médio crescimento e 27 crescimento elevado. Foram selecionados 27 micro-organismos – INPA R 281, 307, 315, 316, 318, 332, 699, 710, 713, 729, 734, 741, 770, 781, 782, 783, 784, 969, 970, 974, 980, 989, 995, 997, 1043, 1044 e 1063.

Com 15 dias de incubação, 62 isolados apresentaram pouco crescimento, 13 moderado e 94 elevado. Mostrando que a maioria desses micro-organismo necessitaram de um tempo maior para se adaptar a fonte de carbono (Tabela 13).

Tabela 13: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo lubrificante como fonte de carbono

Isolados	3º Dia	6º Dia	9º Dia	12º Dia	15º Dia
INPA R264	1,00	1,00	1,00	1,50	1,50
INPA R265	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R267	1,94	2,50	3,00	2,88	3,19
INPA R270	1,06	1,13	1,31	1,31	1,31
INPA R273	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R274	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R278	1,19	1,19	1,19	1,19	1,25
INPA R281	3,38	3,44	3,56	3,63	3,63
INPA R283	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R287	1,00	1,00	1,00	1,06	1,06

Tabela 13: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo lubrificante como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R293	1,00	1,00	1,06	1,06	1,06
INPA R300	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R302	1,13	1,25	1,44	1,44	1,44
INPA R307	2,94	3,19	3,19	3,25	3,38
INPA R313	1,13	2,88	3,94	3,94	3,94
INPA R314	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R315	3,25	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R316	3,75	3,88	3,94	3,94	4,00
INPA R317	1,00	1,63	3,81	3,88	3,88
INPA R318	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R325	2,06	3,00	3,38	3,38	3,94
INPA R332	3,19	3,25	3,38	3,56	3,69
INPA R341	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R401	1,00	1,25	1,25	1,75	2,00
INPA R546	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R547	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R548	1,75	2,06	2,31	2,50	2,63
INPA R549	1,00	2,44	3,56	3,56	3,56
INPA R552	1,06	1,31	1,50	1,81	1,81
INPA R555	1,06	1,63	2,56	2,88	2,88
INPA R557	1,63	2,50	3,06	3,19	3,25
INPA R560	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R564	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R565	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R566	1,94	2,06	2,31	2,50	2,63
INPA R569	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R571	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R572	2,31	2,56	2,50	2,94	3,00
INPA R573	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R583	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R598	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R613	2,94	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R614	1,00	1,75	2,06	3,44	3,75
INPA R634	1,00	2,88	3,69	3,75	3,81
INPA R666	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R672	2,88	3,00	3,13	3,13	3,25
INPA R685	1,38	1,75	1,94	1,94	2,06
INPA R686	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R689	1,38	2,44	3,19	3,19	3,19
INPA R692	1,00	1,75	2,94	3,31	3,44
INPA R695	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R699	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R701	1,00	1,00	1,00	1,75	2,00
INPA R702	2,50	2,75	4,00	4,00	4,00
INPA R710	2,00	3,63	3,88	3,88	3,88
INPA R713	3,56	3,75	3,81	3,88	3,88
INPA R715	1,00	1,00	1,25	1,25	1,38
INPA R717	3,00	3,00	3,69	3,56	3,75
INPA R719	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R720	1,31	2,56	3,00	3,31	3,38
INPA R721	2,31	2,88	3,50	3,56	3,69
INPA R722	1,25	3,00	3,88	3,88	3,94
INPA R723	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R727	1,00	1,13	2,00	2,75	2,94
INPA R729	2,75	3,25	3,56	3,56	3,69
INPA R731	1,00	1,31	1,81	2,13	2,94
INPA R733	1,63	2,81	3,19	3,19	3,44

Tabela 13: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo lubrificante como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R734	3,19	3,63	4,00	4,00	4,00
INPA R735	2,81	2,94	3,44	3,75	3,88
INPA R738	1,00	2,81	3,63	3,63	3,63
INPA R739	1,00	1,63	3,06	3,19	3,19
INPA R740	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R741	3,19	3,50	3,63	3,75	3,81
INPA R742	1,88	2,31	2,63	2,69	2,75
INPA R743	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R746	1,19	1,44	1,63	2,81	3,13
INPA R751	1,00	1,00	1,13	1,13	1,13
INPA R752	1,88	3,00	3,63	3,63	3,63
INPA R754	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R757	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R758	1,44	2,69	3,94	3,94	4,00
INPA R759	1,00	2,63	3,69	3,75	3,75
INPA R761	2,19	2,25	3,88	3,88	3,88
INPA R762	1,00	2,13	3,00	3,31	3,38
INPA R763	1,00	2,13	3,31	3,50	3,50
INPA R764	1,75	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R765	1,88	2,25	4,00	4,00	4,00
INPA R770	3,06	3,25	3,38	3,50	3,63
INPA R774	1,50	1,56	1,69	2,06	2,19
INPA R779	2,81	2,69	3,50	3,69	3,75
INPA R781	3,50	3,81	3,88	3,88	3,88
INPA R782	2,94	3,19	3,44	3,44	3,50
INPA R783	3,63	3,75	4,00	4,00	4,00
INPA R784	3,06	3,19	3,63	3,63	3,63
INPA R785	1,50	1,69	3,75	3,88	4,00
INPA R786	1,50	3,00	3,50	3,75	3,75
INPA R787	1,13	3,00	3,94	4,00	4,00
INPA R790	2,19	3,00	3,94	4,00	4,00
INPA R791	1,63	1,69	1,94	2,13	2,19
INPA R792	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R793	1,38	2,38	3,75	3,75	3,75
INPA R795	1,38	1,44	1,88	1,88	1,88
INPA R796	1,00	1,19	1,38	1,75	1,81
INPA R798	1,00	1,00	1,00	1,50	1,56
INPA R799	1,75	2,13	2,25	3,00	3,13
INPA R800	1,25	1,63	2,25	2,56	2,75
INPA R801	1,44	1,94	2,25	2,69	3,13
INPA R802	1,00	2,13	2,56	3,50	3,63
INPA R803	1,00	1,63	2,06	2,38	2,44
INPA R804	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R805	1,63	1,63	2,13	2,25	2,31
INPA R806	1,13	1,44	1,56	2,25	2,63
INPA R807	1,00	1,25	1,81	2,25	2,50
INPA R969	3,69	3,81	3,88	3,88	3,94
INPA R970	3,88	3,94	3,94	3,94	3,94
INPA R971	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R972	1,25	1,75	1,94	2,06	2,13
INPA R974	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R976	2,63	2,94	2,69	2,94	3,19
INPA R977	1,25	1,31	1,44	1,50	1,63
INPA R979	2,06	2,63	3,56	3,94	3,94
INPA R980	3,75	3,81	3,88	3,94	3,94
INPA R986	2,38	2,44	3,31	3,56	3,63
INPA R988	2,94	3,00	3,56	3,75	3,75

Tabela 13: Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo lubrificante como fonte de carbono

Isolados	3° Dia	6° Dia	9° Dia	12° Dia	15° Dia
INPA R989	3,00	3,50	3,56	3,63	3,88
INPA R990	1,75	2,31	2,75	3,81	3,94
INPA R991	2,25	2,81	3,00	3,00	3,06
INPA R994	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R995	3,19	3,50	3,69	3,75	3,88
INPA R997	3,38	3,50	3,69	3,75	3,81
INPA R998	1,00	1,00	1,00	1,06	1,75
INPA R1011	2,06	2,50	2,75	3,38	3,56
INPA R1015	1,75	2,25	2,31	3,06	3,31
INPA R1018	2,50	2,75	2,81	3,94	4,00
INPA R1020	1,00	1,56	1,81	2,06	2,13
INPA R1022	2,38	3,00	3,31	3,81	3,88
INPA R1023	1,63	1,63	1,81	1,88	2,19
INPA R1024	2,56	3,00	3,56	3,75	3,81
INPA R1037	2,63	2,69	3,31	3,69	3,75
INPA R1038	2,00	2,00	2,19	2,19	2,25
INPA R1041	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
INPA R1042	2,19	2,50	3,81	3,81	3,88
INPA R1043	3,69	3,88	3,94	3,94	4,00
INPA R1044	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R1045	2,00	2,00	2,06	2,31	2,44
INPA R1046	2,06	2,31	2,31	2,69	2,75
INPA R1047	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R1048	2,50	2,88	2,94	3,00	3,13
INPA R1051	2,44	3,00	3,69	3,81	3,88
INPA R1052	2,63	2,81	3,00	3,06	3,25
INPA R1053	2,94	3,00	3,13	3,69	3,94
INPA R1055	1,00	1,75	1,75	2,19	2,25
INPA R1058	1,00	1,06	1,75	2,19	2,63
INPA R1060	1,25	1,88	2,50	2,75	2,81
INPA R1061	1,00	1,56	2,38	2,63	2,81
INPA R1062	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R1063	3,81	3,94	3,94	3,94	3,94
INPA R1064	1,00	1,00	1,00	1,06	1,13
INPA R1065	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R1067	1,00	3,00	3,44	3,69	3,88
INPA R1068	1,06	2,63	3,13	3,69	3,75
INPA R1069	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R1071	1,00	1,56	2,38	2,50	2,50
INPA R1077	2,44	2,75	3,38	3,44	3,50
INPA R1078	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R1079	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R1080	2,00	2,13	3,19	4,00	4,00
INPA R1081	1,00	1,00	1,00	1,75	1,88
INPA R1082	1,06	2,19	3,13	3,63	3,81

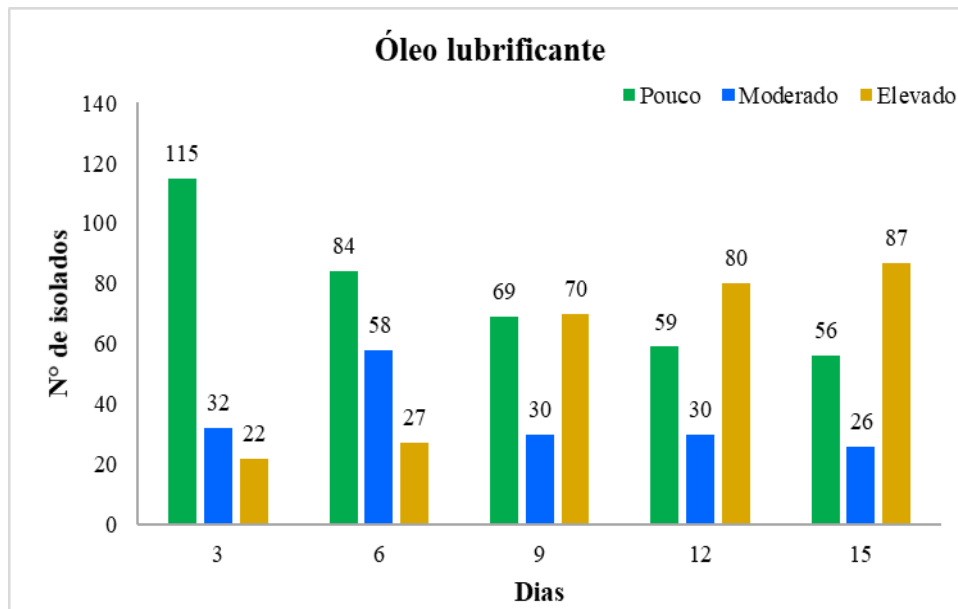


Figura 13: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo óleo lubrificante como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.

Com isso, foram selecionadas 53 bactérias que atingiram notas elevadas (3,06 a 4,00), no sexto dia de crescimento demonstrando com isso, que essas bactérias são potenciais degradadores de hidrocarbonetos. As demais, que não foram selecionadas, mas que apresentaram notas de crescimentos elevados e moderados após o sexto dia, podem ser utilizadas formando consórcios em testes de biodegradação, pois até o 15º dia apresentaram crescimento significativo tanto com a fonte de carbono manitol, quanto com os derivados de petróleo. Esses dados são mais satisfatórios quando comparados com os descritos por Cerqueira et. al., (2011) ao avaliarem a capacidade de biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos de borra oleosa petroquímica em meio líquido por um consórcio bacteriano e cinco culturas bacterianas. Esses autores descreveram que três bactérias isoladas a partir de lamas petroquímica oleosas, identificado como *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus cibi*, e duas bactérias isoladas de solo contaminado por resíduos petroquímicos, identificado como *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* demonstrado eficiência na degradação de borra oleosa quando cultivada durante 40 dias.

Outros estudos com diferentes micro-organismos também têm sido realizados na tentativa de se encontrar uma ou algumas espécies de bactéria com potencial de degradação para derivados de petróleo (BEAZELY et al., 2012). Kostka et. al. (2011) descreveram que membros da *Gammaproteobacteria* (*Alcanivorax*, *Marinobacter*) e *Alphaproteobacteria* (*Rhodobacteraceae*) como os principais micro-organismos responsáveis pela degradação do óleo em ecossistemas de praia contaminado por óleo no Golfo do México.

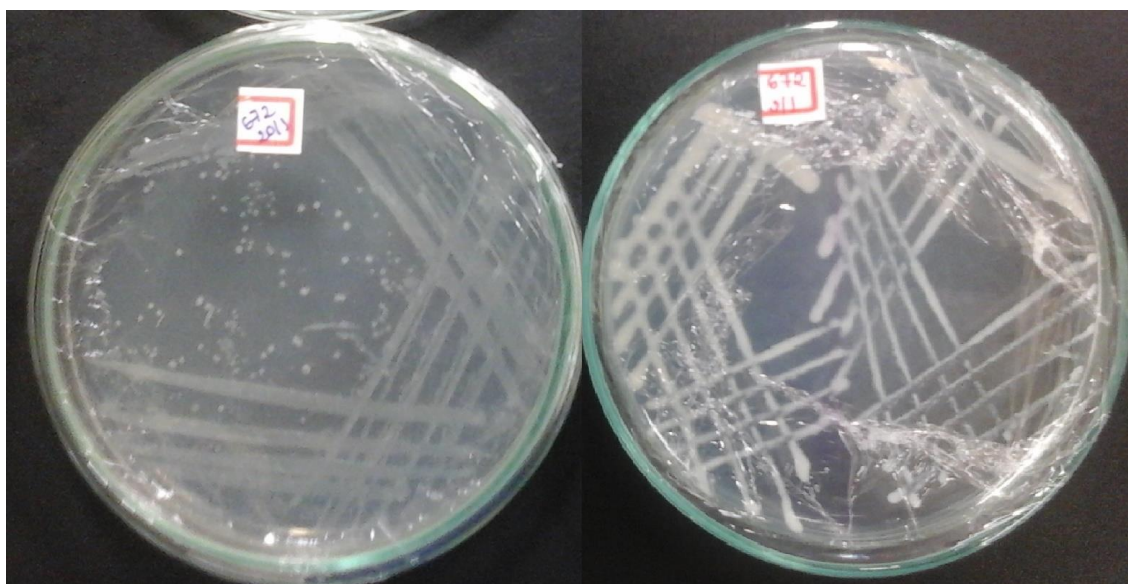


Figura 14: Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio (A) YMA sem manitol e contendo óleo lubrificante e (B) manitol como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação

Quando o critério de crescimento é observado, onde houve a seleção dos isolados que obtiveram notas acima de 3,06 até o 6º dia de incubação, pode ser feita uma comparação entre o controle (manitol) com os derivados. Nota-se que apesar de a quantidade de isolados se apresentar de forma mais abundante no controle, que é uma fonte de carbono propícia para essa bactéria, um bom percentual desses isolados conseguiram obter um crescimento elevado, mostrando adaptação a uma nova fonte de carbono. Destacando-se os micro-organismos testados em querosene, que obtiveram uma quantidade mais elevado do que os outros derivados. Também deve-se ressaltar que os isolados INPA R281, INPA R307, INPA R316 e INPA R781 conseguiram crescimento elevado até o 6º dia em todos os derivados testados, sugerindo que esses

micro-organismos são potencialmente viáveis para serem utilizados em testes posteriores de degradação.

Estes resultados indicam claramente que diferentes derivados do petróleo foram degradados e utilizados por todas as cepas em várias proporções. Todavia, dependendo da complexidade e natureza alifática e aromática da amostra derivado, podem haver variações nos índices de degradação. Os resultados encontrados nesta pesquisa corroboram com Dasgupta et al. (2013) que ao avaliarem a degradação do Petróleo Bruto por Espécies de *Pseudomonas sp.* observaram diferenças significativas entre o crescimento das três estirpes na presença petróleo bruto e hexadecano, porém diferentemente das amostras de rizobactérias, na presença de querosene os espécimes de *Pseudomonas sp.* não apresentaram significância de crescimento.

Em relação ao índice de degradação em meio líquido os resultados deste trabalho são superiores aos descritos por Ferradji et al. (2014), pois estes relatara que a biodegradação do naftaleno por *Streptomyces sp.* atingiu os melhores índices após 12 dias de incubação, pois alguns isolados testados nesse trabalho apresentaram bons índices de degradação com até seis dias de incubação.

4.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO, UTILIZANDO O INDICADOR REDOX – DCPIP

Esse teste mostra a capacidade de rizobactérias em utilizar hidrocarbonetos como substrato utilizando o indicador redox diclorofenol indofenol (DCPIP), observando a mudança de cor do azul (oxidado) para incolor (reduzido). Esta mudança oscila entre coloração total e descoloração total. A leitura desse teste foi realizada durante um período de seis dias em intervalos de 24 horas, onde foi observada a redução total do DCPIP. Com alguns isolados, nos diferentes derivados, essa redução ocorreu principalmente nos tempos de 24 e 48h. Segundo Cruz et al. (2014), após a oxidação total do DCPIP o meio volta a ficar azul novamente por ser um indicador reversível.

Para efeito ilustrativo, na figura 13 mostra o teste com a coloração total do indicador DCPIP contendo o isolado 302.

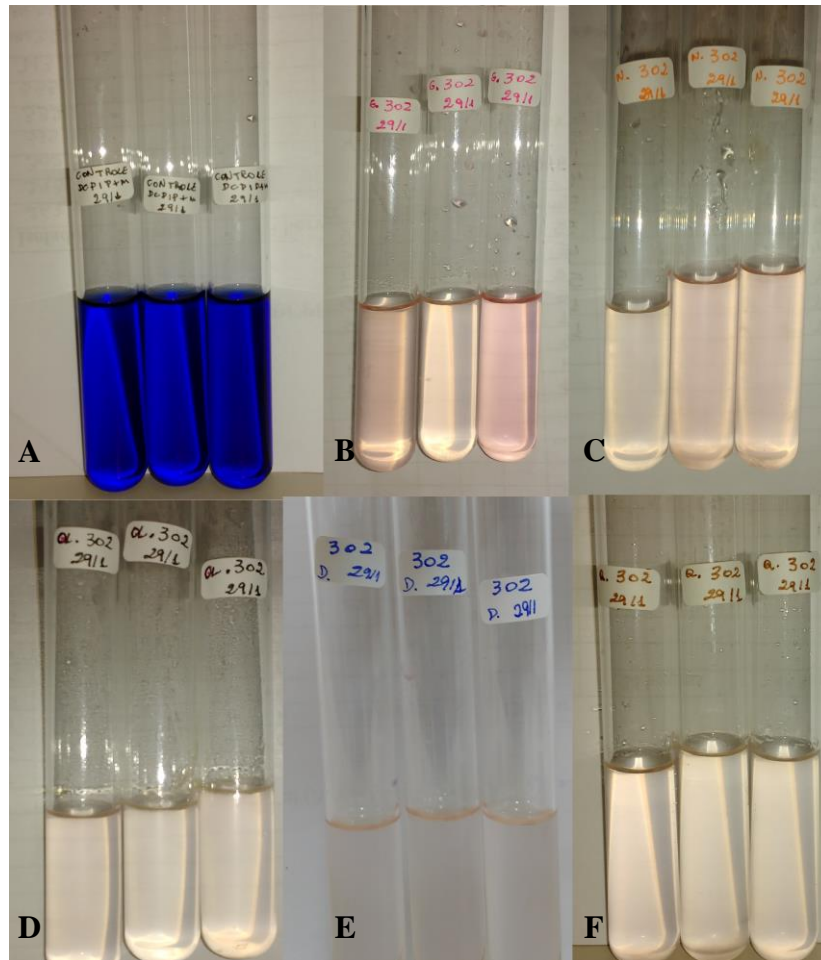


Figura 15: Demonstração do teste de biodegradação, utilizando o indicador DCPIP, onde A é o controle sem descoloração do indicador; B gasolina com 72 horas de incubação; C nafta com 72 horas; D óleo lubrificante com 72 horas; E diesel com 72 horas e F querosene

Para a realização desse teste, foram utilizadas distintas fontes de carbono como manitol, óleo diesel, gasolina, nafta, querosene e óleo lubrificante. A tabela 14 mostra os resultados de descoloração visual utilizando-se a fonte de carbono manitol, que com 24 horas de incubação ocorreu uma descoloração quase total na amostra contendo o isolado INPA R791 e descoloração total nas INPA R307, 316, 318, 672, 689, 710, 720, 733, 784, 803, 972, 976, 986, 989, 1037 1048, 1051, 1052, 1062 e 1063. Com 144 horas de incubação, três isolados apresentaram descoloração quase total e 43 amostras, descoloração total. Esse resultado é esperado, pois a fonte de carbono manitol é ideal para o crescimento desse micro-organismo em laboratório.

Tabela 14: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e o manitol como fonte de carbono em meio líquido

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R267	1	1	1	1	1	1
INPA R281	3	5	5	5	5	5
INPA R293	1	3	1	1	1	1
INPA R302	2	5	5	5	5	5
INPA R307	5	5	5	5	5	5
INPA R315	2	4	4	4	4	4
INPA R316	5	5	5	5	5	5
INPA R318	5	5	5	5	5	5
INPA R325	1	1	1	1	1	1
INPA R332	3	5	5	5	5	5
INPA R555	1	5	5	5	5	5
INPA R672	5	5	5	5	5	5
INPA R689	5	5	5	5	5	5
INPA R699	1	1	1	1	1	1
INPA R710	5	5	5	5	5	5
INPA R713	2	3	5	4	5	5
INPA R720	5	5	5	5	5	5
INPA R729	2	3	5	4	5	5
INPA R733	5	5	5	5	5	5
INPA R734	2	2	4	5	5	5
INPA R741	2	3	3	3	4	4
INPA R751	2	1	2	3	5	5
INPA R770	2	3	3	3	4	4
INPA R779	2	3	5	5	5	5
INPA R781	2	5	5	5	5	5
INPA R782	2	4	5	5	5	5
INPA R783	2	2	4	4	5	5
INPA R784	5	5	5	5	5	5
INPA R791	4	5	5	5	5	5
INPA R796	3	5	5	5	5	5
INPA R798	2	1	1	1	1	1
INPA R803	5	5	5	5	5	5
INPA R969	2	5	5	5	5	5
INPA R970	1	5	5	5	5	5
INPA R972	5	5	5	5	5	5
INPA R974	2	5	5	5	5	5
INPA R976	5	5	5	5	5	5
INPA R980	2	5	5	5	5	5
INPA R986	5	5	5	5	5	5
INPA R989	5	5	5	5	5	5
INPA R995	1	5	5	5	5	5
INPA R997	2	5	5	5	5	5
INPA R1037	5	4	5	5	5	5
INPA R1043	1	5	5	5	5	5
INPA R1044	2	5	5	5	5	5
INPA R1048	5	5	5	5	5	5
INPA R1051	5	5	5	5	5	5
INPA R1052	5	5	5	5	5	5
INPA R1053	1	5	5	5	5	5
INPA R1062	5	5	5	5	5	5
INPA R1063	5	5	5	5	5	5
INPA R1077	1	1	1	1	1	1
INPA R1081	1	1	1	1	1	1

4.3.1 Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em óleo diesel

Alguns micro-organismos, INPA R302, INPA R325, INPA R969 INPA R974, INPA R980, INPA R995, INPA R1062 e INPA R1063 já apresentaram a descoloração total após 24 hora de incubação e quatro apresentaram quase total descoloração, INPA R316, INPA R318, INPA R970 e INPA R1052. Um dado relevante foi que com 48 horas de incubação, os números de amostras com descoloração quase total ultrapassaram os do controle (INPA R281, INPA R315, INPA R734, INPA R784, INPA R972, INPA R986, INPA R989, INPA R997, INPA R1043, INPA R1044 e INPA R1081, assim como os números de amostras com descoloração total chegaram muito próximos ao controle (INPA R302, INPA R316, INPA R318, INPA R325, INPA R332, INPA R672, INPA R689, INPA R699, INPA R710, INPA R713, INPA R729, INPA R733, INPA R741, INPA R770, INPA R781, INPA R782, INPA R783, INPA R796, INPA R798, INPA R969, INPA R970, INPA R974, INPA R976, INPA R980, INPA R995, INPA R1037, INPA R1048, INPA R1051, INPA R1052, INPA R1062, INPA R1063 e INPA R1077).

Um total de 35 isolados foram selecionados pois atingiram, até seis dias, a nota máxima de descoloração (INPA R302, INPA R316, INPA R318, INPA R325, INPA R332, INPA R555, INPA R672, INPA R689, INPA R699, INPA R710, INPA R713, INPA R 720, INPA R729, INPA R733, INPA R734, INPA R741, INPA R770, INPA R781, INPA R782, INPA R783, INPA R796, INPA R798, INPA R969, INPA R970, INPA R974, INPA R976, INPA R980, INPA R995, INPA R1037, INPA R1048, INPA R1051, INPA R1052, INPA R1062, INPA R1063 e INPA R1077). Esses resultados confirmaram que esses isolados se adaptaram a fonte de carbono óleo diesel, quase da mesma forma como utilizam o manitol (Tabela 14).

Tabela 15: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e o óleo diesel como fonte de carbono em meio líquido

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R267	1	1	1	1	1	1
INPA R281	1	4	4	4	2	1
INPA R293	1	1	1	1	1	1
INPA R302	5	5	5	5	5	5
INPA R307	3	3	3	3	2	3
INPA R315	3	4	4	4	4	4
INPA R316	4	5	3	2	2	1
INPA R318	4	5	4	3	2	1
INPA R325	5	5	5	4	4	4
INPA R332	1	5	5	5	5	5

Tabela 15: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e o óleo diesel como fonte de carbono em meio líquido

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R555	1	1	1	5	5	5
INPA R672	1	5	5	3	3	4
INPA R689	2	5	3	2	2	1
INPA R699	1	5	5	5	4	1
INPA R710	3	5	3	2	2	1
INPA R713	2	5	5	5	5	5
INPA R720	1	3	4	4	4	5
INPA R729	1	5	5	4	4	5
INPA R733	3	5	3	3	3	3
INPA R734	1	4	5	4	4	4
INPA R741	2	5	5	5	4	4
INPA R751	1	1	1	1	1	1
INPA R770	1	5	5	4	3	4
INPA R779	3	3	4	2	1	1
INPA R781	1	5	5	4	4	4
INPA R782	1	5	5	4	3	4
INPA R783	2	5	5	4	4	4
INPA R784	2	4	2	2	2	1
INPA R791	1	3	4	3	3	4
INPA R796	2	5	5	4	4	4
INPA R798	1	5	5	4	3	4
INPA R803	2	3	4	3	1	1
INPA R969	5	5	5	5	3	3
INPA R970	4	5	5	4	3	3
INPA R972	2	4	4	4	2	1
INPA R974	5	5	5	5	5	3
INPA R976	2	5	4	2	2	1
INPA R980	5	5	5	5	4	3
INPA R986	2	4	4	3	2	1
INPA R989	3	4	4	2	2	1
INPA R995	5	5	5	4	4	3
INPA R997	3	4	4	2	2	2
INPA R1037	2	5	5	3	3	2
INPA R1043	2	4	3	3	2	2
INPA R1044	3	4	3	2	2	2
INPA R1048	2	5	3	3	2	2
INPA R1051	3	5	4	2	2	1
INPA R1052	4	5	4	3	3	2
INPA R1053	1	2	1	1	3	3
INPA R1062	5	5	5	5	5	5
INPA R1063	5	5	5	5	5	5
INPA R1077	3	5	4	2	3	3
INPA R1081	2	4	3	3	2	3

4.3.2 Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em gasolina

Com relação a descoloração com a fonte de carbono gasolina, com 24h incubação, seis isolados já apresentaram descoloração total. Com 72h de incubação mais oito isolados também atingiram a nota máxima de descoloração. Um total de 14 isolados foram selecionados pois atingiram, até seis dias, a nota máxima de

descoloração (INPA R302, INPA R307, INPA R332, INPA R555, INPA R713, INPA R720, INPA R751, INPA R779, INPA R798, INPA R969, INPA R970, INPA R980 e INPA R1043) conforme mostra a Tabela 15.

Tabela 16: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e gasolina como fonte de carbono em meio líquido

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R267	1	1	1	1	1	1
INPA R281	1	4	4	2	2	1
INPA R293	1	1	1	1	1	1
INPA R302	1	1	5	5	5	5
INPA R307	4	5	5	5	4	4
INPA R315	2	4	4	4	4	4
INPA R316	4	4	4	2	2	1
INPA R318	3	4	3	2	3	2
INPA R325	4	4	4	4	3	3
INPA R332	2	3	3	5	5	5
INPA R555	1	5	5	5	5	5
INPA R672	1	1	1	1	1	1
INPA R689	2	4	2	2	2	1
INPA R699	4	2	1	1	1	1
INPA R710	3	4	3	2	2	1
INPA R713	2	3	3	5	5	5
INPA R720	5	4	2	1	1	1
INPA R729	4	3	2	1	1	1
INPA R733	3	4	3	2	3	2
INPA R734	3	2	2	2	2	2
INPA R741	4	2	2	2	2	2
INPA R751	5	4	2	2	2	2
INPA R770	4	2	2	1	1	1
INPA R779	5	3	1	1	1	1
INPA R781	3	2	1	1	1	1
INPA R782	4	3	2	2	2	2
INPA R783	3	4	2	1	1	1
INPA R784	2	4	2	2	2	1
INPA R791	2	3	2	2	2	2
INPA R796	2	3	5	4	4	4
INPA R798	5	5	1	1	1	1
INPA R803	2	3	3	3	1	1
INPA R969	2	4	5	4	3	3
INPA R970	2	3	5	5	4	4
INPA R972	2	3	3	3	2	1
INPA R974	3	3	4	4	4	4
INPA R976	3	4	4	4	3	1
INPA R980	3	4	5	4	5	4
INPA R986	2	4	4	2	2	1
INPA R989	3	4	4	3	3	1
INPA R995	3	3	4	2	2	2
INPA R997	3	4	4	2	2	2
INPA R1037	2	2	3	3	3	4
INPA R1043	3	3	3	4	4	5
INPA R1044	1	1	1	1	1	1
INPA R1048	2	4	3	2	2	1
INPA R1051	2	4	3	2	2	2
INPA R1052	2	4	4	3	2	1
INPA R1053	1	1	1	1	1	1

Tabela 16: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e gasolina como fonte de carbono em meio líquido

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R1062	1	1	2	3	3	3
INPA R1063	1	1	1	3	3	3
INPA R1077	3	3	3	2	3	1
INPA R1081	3	3	3	2	2	2

4.3.3 Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em querosene

Com relação a descoloração com a fonte de carbono querosene, com 24h incubação, nove isolados já apresentaram descoloração total. Com 48h de incubação mais onze isolados também atingiram a nota máxima de descoloração. Um total de 16 isolados foram selecionados pois atingiram, até seis dias, a nota máxima de descoloração (INPA R267, INPA R293, INPA R302, INPA R316, INPA R325, INPA R332, INPA R555, INPA R713, INPA R969, INPA R970, INPA R974 INPA R980, INPA R995, INPA R1044, INPA R1062, INPA R1063) conforme mostra a Tabela 16.

Tabela 17: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e o querosene como fonte de carbono em meio líquido

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R267	1	2	2	3	3	5
INPA R281	2	4	4	2	2	1
INPA R293	1	2	2	3	3	5
INPA R302	5	5	5	5	5	5
INPA R307	3	4	4	2	2	2
INPA R315	2	4	4	4	4	4
INPA R316	4	5	3	2	2	2
INPA R318	4	4	3	2	2	1
INPA R325	5	5	5	3	2	2
INPA R332	3	5	5	5	5	5
INPA R555	5	1	5	5	5	5
INPA R672	1	1	1	1	1	1
INPA R689	2	4	3	2	2	1
INPA R699	1	1	1	1	1	1
INPA R710	3	4	2	2	2	1
INPA R713	3	5	5	5	5	5
INPA R720	1	1	1	1	1	1
INPA R729	2	2	2	2	1	1
INPA R733	3	4	3	3	3	2
INPA R734	2	2	2	2	1	1
INPA R741	1	1	1	1	1	1
INPA R751	3	1	1	1	1	1
INPA R770	1	1	1	1	1	1
INPA R779	1	1	1	1	1	1
INPA R781	1	1	1	1	1	1
INPA R782	1	1	1	1	1	1
INPA R783	1	1	1	1	1	1
INPA R784	2	3	2	2	2	1
INPA R791	1	1	1	1	1	1

Tabela 17: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e o querosene como fonte de carbono em meio líquido

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R796	1	1	1	1	1	1
INPA R798	2	1	1	1	1	1
INPA R803	3	4	4	3	2	1
INPA R969	5	5	5	5	2	3
INPA R970	5	5	5	4	3	2
INPA R972	4	4	4	2	2	1
INPA R974	5	5	5	4	2	2
INPA R976	3	4	4	2	2	1
INPA R980	5	5	5	5	3	3
INPA R986	3	4	4	2	1	1
INPA R989	2	4	2	2	2	1
INPA R995	4	4	5	3	2	3
INPA R997	4	4	4	2	2	2
INPA R1037	2	4	3	3	3	3
INPA R1043	2	4	4	2	3	2
INPA R1044	3	4	5	2	2	2
INPA R1048	3	4	2	2	1	1
INPA R1051	3	4	2	2	2	1
INPA R1052	3	4	4	3	2	1
INPA R1053	2	2	2	1	1	1
INPA R1062	5	5	5	5	5	5
INPA R1063	5	5	5	5	5	5
INPA R1077	3	4	3	2	2	1
INPA R1081	2	4	3	2	2	2

4.3.4 Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em nafta

Com relação a descoloração com a fonte de carbono nafta, com 24h incubação sete isolados já apresentaram descoloração total. Com 48h de incubação mais oito isolados também atingiram a nota máxima de descoloração. Um total de 12 isolados foram selecionados pois atingiram, até seis dias, a nota máxima de descoloração (INPA R302, INPA R325, INPA R332, INPA R555, INPA R713, INPA R969, INPA R970, INPA R974 INPA R980, INPA R995, INPA R1062, INPA R1063) conforme mostra a Tabela 17.

Tabela 18: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e nafta como fonte de carbono em meio líquido

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R267	1	1	1	1	1	1
INPA R281	2	4	4	4	3	1
INPA R293	1	1	1	1	1	1
INPA R302	1	1	5	5	5	5
INPA R307	3	3	3	3	2	3
INPA R315	2	4	4	4	4	4
INPA R316	2	4	4	3	2	1
INPA R318	3	4	3	3	2	1

Tabela 18: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e nafta como fonte de carbono em meio líquido

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R325	5	5	5	4	4	4
INPA R332	1	4	5	5	5	5
INPA R555	1	1	1	1	2	5
INPA R672	1	1	1	1	1	1
INPA R689	3	4	3	2	3	1
INPA R699	1	1	1	1	1	1
INPA R710	3	4	2	2	1	1
INPA R713	1	2	5	3	5	5
INPA R720	1	1	1	1	1	1
INPA R729	1	1	1	1	1	1
INPA R733	2	4	4	2	2	1
INPA R734	1	1	1	1	1	1
INPA R741	1	1	1	1	1	1
INPA R751	1	1	1	1	1	1
INPA R770	1	1	1	1	1	1
INPA R779	1	1	1	1	1	1
INPA R781	1	1	1	1	1	1
INPA R782	1	1	1	1	1	1
INPA R783	1	1	1	1	1	1
INPA R784	2	4	3	3	2	1
INPA R791	1	1	1	1	1	1
INPA R796	1	1	1	1	1	1
INPA R798	1	1	1	1	1	1
INPA R803	2	4	4	3	2	1
INPA R969	5	5	5	5	3	4
INPA R970	3	5	5	4	3	3
INPA R972	2	4	4	3	3	1
INPA R974	5	5	5	4	3	3
INPA R976	3	4	4	3	2	1
INPA R980	5	5	5	5	4	3
INPA R986	2	4	3	2	2	1
INPA R989	2	4	3	2	3	1
INPA R995	5	5	5	4	4	3
INPA R997	3	4	4	2	2	2
INPA R1037	2	4	4	3	3	1
INPA R1043	2	4	3	3	2	2
INPA R1044	1	1	1	1	3	3
INPA R1048	2	4	3	2	2	1
INPA R1051	2	4	3	2	3	1
INPA R1052	3	4	3	3	2	1
INPA R1053	1	2	1	1	3	3
INPA R1062	5	5	5	5	5	5
INPA R1063	5	5	5	5	5	5
INPA R1077	3	4	3	2	2	1
INPA R1081	2	4	3	3	2	3

4.3.5 Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em óleo lubrificante

Com relação a descoloração com a fonte de carbono óleo lubrificante, com 24h incubação dois isolados já apresentaram descoloração total. Com 48h de incubação mais

7 isolados também atingiram a nota máxima de descoloração. Um total de 10 isolados foram selecionados pois atingiram, até seis dias, a nota máxima de descoloração (INPA R302, INPA R307, INPA R316, INPA R318, INPA R332, INPA R555, INPA R713, INPA R976, INPA R1043 e INPA R1053) conforme mostra a Tabela 18.

Tabela 19: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e óleo lubrificante como fonte de carbono em meio líquido

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R267	1	1	1	1	1	1
INPA R281	1	3	4	3	2	1
INPA R293	1	1	1	1	1	1
INPA R302	1	1	5	5	5	5
INPA R307	4	5	3	4	4	3
INPA R315	2	4	4	4	4	4
INPA R316	3	5	3	2	2	1
INPA R318	2	5	3	2	2	1
INPA R325	4	4	3	3	2	2
INPA R332	2	4	5	5	5	5
INPA R555	1	1	5	5	5	5
INPA R672	1	1	1	1	1	1
INPA R689	2	4	1	1	1	1
INPA R699	1	1	1	1	1	1
INPA R710	3	4	1	2	2	1
INPA R713	2	3	5	5	5	5
INPA R720	1	1	1	1	1	1
INPA R729	1	1	1	1	1	1
INPA R733	2	4	1	2	2	1
INPA R734	1	1	1	1	1	1
INPA R741	1	1	1	1	1	1
INPA R751	1	1	1	1	1	1
INPA R770	1	1	1	1	1	1
INPA R779	1	1	1	1	1	1
INPA R781	1	1	1	1	1	1
INPA R782	1	1	1	1	1	1
INPA R783	1	1	1	1	1	1
INPA R784	2	3	2	2	1	1
INPA R791	1	1	1	1	1	1
INPA R796	2	5	2	2	2	2
INPA R798	1	1	1	1	1	1
INPA R803	2	4	4	2	2	1
INPA R969	4	4	4	4	3	2
INPA R970	4	4	4	4	2	3
INPA R972	2	3	3	1	1	1
INPA R974	4	4	4	4	3	4
INPA R976	2	5	4	2	1	1
INPA R980	4	4	4	4	3	4
INPA R986	2	4	3	2	2	1
INPA R989	2	4	1	1	2	1
INPA R995	4	4	4	4	2	3
INPA R997	4	4	4	1	2	2
INPA R1037	2	3	3	2	3	3
INPA R1043	4	4	5	4	4	5
INPA R1044	3	3	3	2	2	2
INPA R1048	2	4	1	1	1	1
INPA R1051	2	4	1	2	2	1

Tabela 19: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e óleo lubrificante como fonte de carbono em meio líquido

INPA R1052	1	3	3	1	1	1
INPA R1053	2	2	3	3	3	5
INPA R1062	2	3	3	3	3	3
INPA R1063	3	3	3	3	3	3
INPA R1077	3	4	1	2	2	1
INPA R1081	2	2	3	1	2	2

A Figura 14 (A) manitol, (B) óleo diesel, (C) gasolina, (D) querosene, (E) nafta e (F) óleo lubrificante, demonstra os gráficos referentes as porcentagens de degradação dos derivados de petróleo. Nota-se em cada derivado um pico mais elevado de degradação, onde o óleo diesel com 48h obteve 60% de descoloração total, a gasolina com 72h apresentou 17%, o querosene 25%, a nafta 17%, já o óleo lubrificante o seu maior índice de descoloração total foi obtido com 144h de incubação. Todos os derivados demonstraram um queda após a oxidação total do DCPIP.

Estas fontes de carbono quando comparados com o manitol que apresentou altos índices de degradação, alcançaram valores significativos, comprovando que esses micro-organismos de solo têm capacidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono.

Os resultados indicam diferenças significativas entre as velocidades de biodegradação dos diferentes tipos de fontes de carbono na presença dos mesmos micro-organismos utilizados, assim verificou-se que um total de 41 isolados (INPA R267, INPA R302, INPA R307, INPA R316, INPA R318, INPA R325, INPA R332, INPA R555, INPA R672, INPA R689, INPA R699, INPA R710, INPA R713, INPA R720, INPA R729, INPA R733, INPA R734, INPA R741, INPA R751, INPA R770, INPA R779, INPA R781, INPA R782, INPA R783, INPA R796, INPA R798, INPA R969, INPA R970, INPA R974, INPA R976, INPA R980, INPA R995, INPA R1037, INPA R1043, INPA R1048, INPA R1051, INPA R1052, INPA R1053, INPA R1062, INPA R1063 e INPA R1077) apresentaram descoloração total durante todos os tempos de incubação dos derivados, mostrando-se bastante eficazes na degradação de hidrocarbonetos, sendo que os isolados INPA R302, INPA R332, INPA R555 e INPA R713 atingiram descoloração total em todos os derivados, sendo selecionados assim para serem utilizados em testes posteriores.

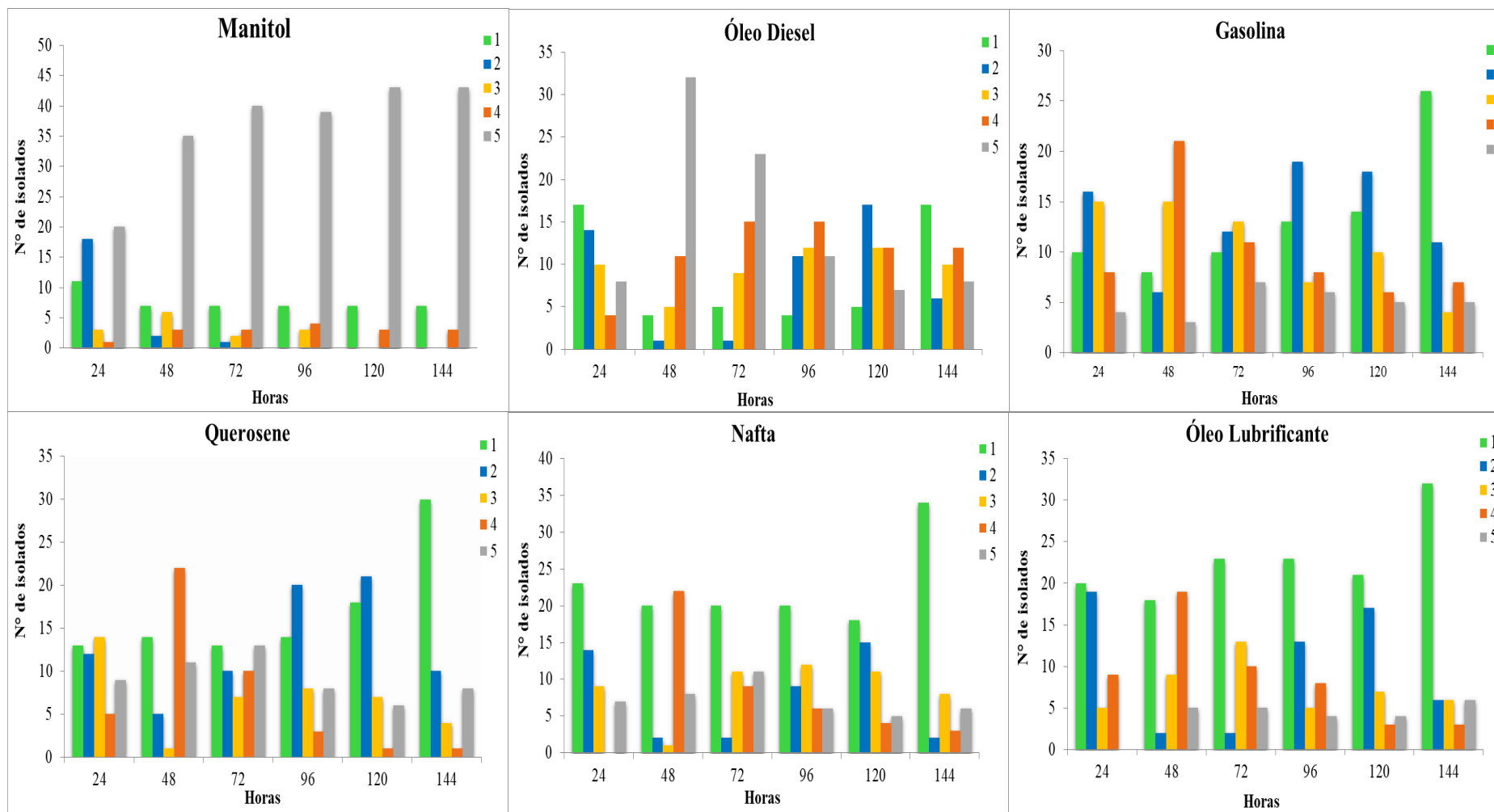


Figura 16: Biodegradação de derivados de petróleo e manitol por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP

4.3.6 Concetrações de células bacterianas estimada em Câmara de Neubauer, utilizando o Diclorofenol Indofenol – DCPIP e derivados de petróleo como fontes de carbono.

Além da avaliação visual dos 53 isolados de rizóbio com DCPIP e derivados de petróleo foi realizada ainda uma avaliação quanto a concentração celular em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL⁻¹), quando submetidos a fontes de carbono distintas (manitol, óleo diesel, gasolina, nafta, querosene e óleo lubrificante), apresentaram diferenças significativas entre os isolados e entre os tempos estudados (24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas).

Em relação ao controle, contendo o manitol como fonte de carbono (Tabela 19), no tempo de 24 horas, o isolado INPA R969 apresentou o maior número de células (293 UFC.mL⁻¹) quando comparado aos demais tratamentos, onde a menor concentração foi de 75 UFC.mL⁻¹, do isolado INPA R720. Com 48h, mais seis isolados se destacaram INPA R710, INPA R741, INPA R803, INPA R969, INPA R970 e INPA R1052 apresentando uma quantidade celular maior, variando de 311 à 334 UFC.mL⁻¹ entre esses isolados e tendo o menor número de células com 75 UFC.mL⁻¹, novamente do isolado INPA R720. Com 72h, os isolados de maior destaque foram o INPA R741, com quantidade celular de 290 UFC.mL⁻¹ e INPA R980, com 294 UFC.mL⁻¹, apresentando o menor número com 62 UFC.mL⁻¹. Com 96h, os isolados INPA R689, com 313 UFC.mL⁻¹ e INPA R980, contendo 316 UFC.mL⁻¹, tendo a menor concentração o isolado INPA R1044, com 61 UFC.mL⁻¹. Com 120h, os isolados INPA R1043, continha uma concentração de 214 UFC.mL⁻¹ e INPA R1048, com 205 UFC.mL⁻¹, e o isolado INPA R989, apresentou a menor quantidade (33 UFC.mL⁻¹). Com 144h, apesar da baixa quantidade de células, quando comparadas entre os tratamentos, destacaram-se os isolados INPA R302, INPA R315, INPA R318, INPA R332, INPA R689, INPA R713, INPA R734, INPA R770, INPA R779, INPA R791, INPA R798, INPA R972, INPA R976 e INPA R1037, que variaram entre 128 à 147 UFC.mL⁻¹. Esses isolados que obtiveram destaque com 144h entre os tratamentos, quando observados seus picos referentes a quantidade de células entre os tempos testados, verificou-se que todos os isolados apresentaram uma maior quantidade celular nos demais tempos testados.

Tabela 20: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL⁻¹), em meio líquido, com manitol como fonte de carbono

Isolados	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
	-----10 ⁵ UFC.mL ⁻¹ -----											
INPA R267	200	dA	176	fB	129	fC	164	fB	80	gD	36	dE
INPA R281	137	gC	116	hD	164	eB	191	eA	60	hE	59	cE
INPA R293	181	eA	122	hC	148	eB	168	fA	137	dB	124	bC
INPA R302	114	hC	107	hC	103	gC	74	jD	171	cA	134	aB
INPA R307	98	iB	107	hB	122	fB	215	dA	100	fB	63	cC
INPA R315	206	dA	160	gB	116	fC	161	gB	152	cB	136	aC
INPA R316	155	fB	188	fA	109	gC	173	fA	153	cB	112	bC
INPA R318	157	fA	94	gC	74	hD	94	iC	57	hD	128	aB
INPA R325	100	iA	68	iB	90	gA	82	jB	42	iC	35	dC
INPA R332	214	dB	271	cA	217	cB	271	bA	117	eD	141	aC
INPA R555	159	fC	178	fB	192	dB	226	dA	128	eD	116	bD
INPA R672	164	fB	182	fA	202	cA	113	hC	162	cB	73	cD
INPA R689	189	eC	210	eB	210	cB	313	aA	191	bC	142	aD
INPA R699	170	fC	218	eA	195	dB	187	eB	122	eD	110	bD
INPA R710	184	eC	311	aA	185	dC	240	cB	189	bC	116	bD
INPA R713	120	hB	171	fA	153	eA	172	fA	159	cA	130	aB
INPA R720	75	iC	83	iC	184	dA	111	hB	87	gC	85	cC
INPA R729	237	cA	254	dA	132	fC	181	eB	100	fD	125	bC
INPA R733	253	cA	229	eB	119	fD	166	fC	163	cC	78	cE
INPA R734	142	gB	174	fA	189	dA	103	iC	115	eC	129	aB
INPA R741	194	eC	325	aA	290	aB	117	hD	77	gE	122	bD
INPA R751	111	hC	109	hC	146	eB	202	dA	109	eC	45	dD
INPA R770	154	fB	215	eA	221	cA	222	dA	86	gD	126	aC
INPA R779	115	hD	161	gB	171	dB	187	eA	156	cB	139	aC
INPA R781	122	hC	193	eB	256	bA	267	bA	124	eC	100	bD
INPA R782	116	hB	183	fA	176	dA	187	eA	45	iD	76	cC
INPA R783	93	iB	112	hA	127	fA	92	iB	104	fB	119	bA
INPA R784	130	hB	203	eA	118	fB	131	hB	120	eB	90	cC
INPA R791	182	hB	206	eA	219	cA	121	hD	155	cC	134	aD
INPA R796	121	eB	207	eA	137	fC	174	fB	146	dC	113	bD
INPA R798	147	hD	159	gA	62	hD	98	iC	120	eB	128	aB
INPA R803	238	cA	321	aA	157	eC	257	cB	73	gE	122	bD
INPA R969	293	aB	318	aA	140	eD	263	bC	65	hE	44	dE
INPA R970	255	cB	334	aA	195	dC	132	hD	64	hE	69	cE
INPA R972	191	eA	176	fA	143	eB	144	gB	132	dB	138	aB
INPA R974	147	gB	275	cA	123	fC	84	jD	80	gD	64	cD
INPA R976	133	gB	163	gA	135	fB	139	gB	112	eC	137	aB
INPA R980	199	dD	222	eC	294	aB	316	aA	53	hF	116	bE
INPA R986	214	dC	294	bA	207	cC	251	cB	114	eD	70	cE
INPA R989	183	eB	254	dA	142	eC	185	eB	33	iE	120	bD
INPA R995	162	fC	199	eA	184	dB	213	dA	99	fE	122	bD
INPA R997	163	fB	211	eA	74	hD	65	jD	114	eC	84	cD
INPA R1037	211	dA	172	fB	97	gD	175	fB	147	dC	147	aC
INPA R1043	155	fC	207	eA	188	dB	214	dA	214	aA	98	bD
INPA R1044	199	dA	190	fA	191	dA	61	jC	133	dB	122	bB
INPA R1048	203	dB	295	bA	165	eC	127	hD	205	aB	72	cE
INPA R1051	115	hC	153	gB	154	eB	208	dA	127	eC	113	bC
INPA R1052	209	dB	318	aA	220	cB	106	iD	138	dC	81	cE
INPA R1053	269	bA	280	cA	194	dB	197	dB	167	cC	111	bD
INPA R1062	136	gB	165	gC	154	eA	159	gA	124	eB	120	bB
INPA R1063	221	dB	202	eC	239	bB	271	bA	129	eD	83	cE
INPA R1077	163	fB	189	fA	134	fB	144	gB	148	dB	67	cC
INPA R1081	97	iA	67	iC	83	hB	75	jB	41	iC	29	dC

OBS. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade), considerando as minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

No experimento com a fonte de carbono óleo diesel, os 53 isolados testados proporcionaram uma concentração significativa ($P < 0,05$) de células, pois quando comparado o número de células entre os tratamentos, com 24h de incubação, destacamos com maior quantidade o isolado INPA R781, contendo 351 UFC.mL^{-1} , tendo o isolado INPA R555 a menor concentração (9 UFC.mL^{-1}) em 48h, os INPA R325, em 345 UFC.mL^{-1} e INPA R989 364 UFC.mL^{-1} , tendo o INPA R803 a menor quantidade (28 UFC.mL^{-1}). Às 72h, os isolados INPA R699, INPA R798, INPA R980 e INPA R1063, apresentaram as maiores concentrações entre os tratamentos, variando entre $270,00$ à 302 UFC.mL^{-1} , tendo o isolado INPA R318 com a menor quantidade (32 UFC.mL^{-1}). Com 96h, o INPA R995, apresentou a maior concentração (317) e a menor entre os tratamentos foi de 28 UFC.mL^{-1} , apresentado pelo isolado INPA R782. O isolado INPA R713, apresentou as maiores concentrações celulares nos tempos de 120 (284 UFC.mL^{-1}) e 144h (442 UFC.mL^{-1}), tendo as menores concentrações de 60 UFC.mL^{-1} com 120h e 65 UFC.mL^{-1} com 144h. Quando comparadas a concentração celular entre as horas, destaca-se que esses isolados atingiram um pico mais elevado nos horários citados com exceção do INPA R798 que apresentou o maior pico de crescimento as 24h (Tabela 20).

Tabela 21: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL^{-1}), em meio líquido, com óleo diesel como fonte de carbono

Isolados	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
	----- 10^5 UFC.mL^{-1} -----											
INPA R267	64	iC	42	jD	180	cA	71	hC	136	eB	128	gB
INPA R281	129	gA	103	hB	94	fB	97	gB	86	gB	93	hB
INPA R293	13	IE	50	jD	120	eC	172	dB	69	hD	273	cA
INPA R302	29	jD	112	hC	167	dB	111	fC	104	gC	199	eA
INPA R307	238	cA	55	jE	142	eC	173	dB	93	gD	171	eB
INPA R315	58	iD	96	iC	157	dB	165	dB	199	cA	187	eA
INPA R316	169	eA	173	fA	88	fD	97	gD	121	fC	144	fB
INPA R318	38	jD	147	gA	31	hD	40	iD	109	fB	79	iC
INPA R325	135	gB	345	aA	141	eB	70	hC	60	hC	88	hC
INPA R332	58	iC	230	eB	223	bB	252	bB	224	bB	403	bA
INPA R555	9	ID	58	jC	90	fB	42	iC	73	hC	142	fA
INPA R672	192	dA	207	eA	96	fB	104	gB	75	hB	93	hB
INPA R689	128	gC	256	dA	181	cB	96	gD	103	gD	187	eB
INPA R699	219	dB	237	eB	302	aA	176	dC	213	bB	157	fC
INPA R710	128	gC	315	bA	181	cB	118	fC	139	eC	111	gC
INPA R713	97	hF	128	hE	173	dD	199	dC	284	aB	442	aA
INPA R720	137	gA	145	gA	113	fB	108	gB	128	fA	65	iC
INPA R729	246	cA	154	gB	56	gC	134	fB	148	eB	130	gB
INPA R733	352	aA	280	cB	57	gF	94	gE	126	fD	161	fC
INPA R734	255	cA	229	eB	200	cC	77	hE	126	fD	127	gD
INPA R741	147	fA	151	gA	60	gD	95	gC	84	gC	117	gB
INPA R751	9	ID	63	jC	69	gC	123	fA	131	eA	101	hB
INPA R770	89	hC	102	hC	183	cA	99	gC	121	fB	135	gB

Tabela 21: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL⁻¹), em meio líquido, com óleo diesel como fonte de carbono

Isolados	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
INPA R779	317	bA	179	fC	225	bB	63	hF	100	gE	139	fD
INPA R781	351	aA	320	bB	181	cC	86	gE	137	eD	144	fD
INPA R782	203	dA	218	eA	43	hD	28	iD	70	hC	113	gB
INPA R783	270	cA	174	fB	156	dB	118	fC	133	eC	184	eB
INPA R784	178	eA	107	hB	169	dA	183	dA	114	fB	131	gB
INPA R791	206	dA	222	eA	234	bA	98	gC	154	eB	111	gC
INPA R796	83	iD	115	hC	238	bA	73	hD	147	eB	110	gC
INPA R798	295	hA	184	fB	286	aA	88	gD	200	cB	131	gC
INPA R803	66	iB	28	jC	127	eA	115	fA	108	fA	102	hA
INPA R969	158	fC	105	hD	248	bB	143	eC	146	eC	279	cA
INPA R970	263	cA	122	hC	189	cB	170	dB	87	gD	279	cA
INPA R972	63	iC	115	hB	157	dA	112	fB	111	fB	93	hB
INPA R974	203	dB	83	iB	197	cB	228	cA	111	fC	203	eB
INPA R976	93	hA	75	iB	105	fA	106	gA	98	gA	73	iB
INPA R980	120	gD	104	hD	293	aA	151	eC	142	eC	259	cB
INPA R986	59	iC	119	hB	165	dA	130	fB	125	fB	134	gB
INPA R989	244	cB	364	aA	179	dC	155	eC	139	eC	144	fC
INPA R995	244	cC	65	jD	226	bC	317	aA	66	hD	273	cB
INPA R997	154	fB	124	hC	103	fC	217	cA	166	dB	233	dA
INPA R1037	209	dB	252	dA	188	cB	118	fC	121	fC	116	gC
INPA R1043	520	gC	123	hC	218	bA	128	fC	114	fC	189	eB
INPA R1044	91	hD	82	iD	128	eB	162	eA	84	gD	111	gC
INPA R1048	171	eC	270	cA	153	dC	88	gE	128	fD	216	dB
INPA R1051	63	iC	143	gA	80	gC	149	eA	103	gB	163	fA
INPA R1052	100	hB	54	jD	133	eA	112	fB	107	fB	83	iC
INPA R1053	94	hC	66	jD	117	eC	227	cA	63	hD	149	fB
INPA R1062	137	gC	106	hD	113	fD	103	gD	191	cA	154	fB
INPA R1063	145	fC	166	fC	270	aA	154	eC	227	bB	233	dB
INPA R1077	241	cB	284	cA	238	bB	169	dC	143	eC	160	fC
INPA R1081	250	cA	55	jE	142	eC	173	dB	93	gD	171	eB

OBS. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade), considerando as minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

Os isolados testados com a fonte de carbono gasolina (Tabela 21), quando comparados entre os tratamentos com 24h de incubação foi destacado com maior quantidade celular, o isolado INPA R1081, contendo 257 UFC.mL⁻¹ e a menor concentração foi de 12 UFC.mL⁻¹, apresentado pelo isolado INPA R302. Com 48h o INPA R751, com 493 UFC.mL⁻¹, tendo apresentado a menor quantidade o isolado INPA R267 (7 UFC.mL⁻¹). Em 72h, as maiores concentrações foram apresentadas pelos isolados INPA R1062 (399 UFC.mL⁻¹) e INPA R1063 (413 UFC.mL⁻¹) e a menor concentração de 19 UFC.mL⁻¹, apresentado pelo isolado INPA R1043. Às 96h, a maior quantidade foi do INPA R1062 (370 UFC.mL⁻¹) e a menor foi verificada no isolado INPA R307, contendo 13 UFC.mL⁻¹, já com 120h, o INPA R1063 apresentou 408 UFC.mL⁻¹ e o isolado INPA R689, apresentou o menor número celular (56 UFC.mL⁻¹) e com 144h o isolado INPA R779, INPA R997 e INPA R1044 obtiveram a maior

concentração celular, variando de 213 à 230 UFC.mL⁻¹, tendo o isolado INPA R293 apresentado um número baixíssimo (1 UFC.mL⁻¹).

Esses isolados se destacarem entre os tratamentos de cada horário citado, quando verificado os picos de maior quantidade celular entre as horas foi observado que o INPA R779, INPA R997 e INPA R1081 apresentou o maior número com 48h de incubação.

Tabela 22: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10⁵ UFC.mL⁻¹), em meio líquido, com gasolina como fonte de carbono

Isolados	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
	-----10 ⁵ UFC.mL ⁻¹ -----											
INPA R267	9	iB	7	oB	37	mA	46	jA	56	lA	14	iB
INPA R281	74	gD	110	lC	198	fA	177	eB	114	iC	90	eD
INPA R293	12	iC	31	nB	34	mB	36	jB	91	jA	1	iC
INPA R302	12	iE	176	hB	180	gB	144	fC	221	eA	34	hD
INPA R307	109	fC	256	eA	30	mD	13	lD	106	iC	141	cB
INPA R315	64	gD	135	jC	195	fA	178	eB	204	fA	34	hE
INPA R316	138	eB	183	hA	111	iC	110	hC	110	iC	119	dC
INPA R318	90	fB	134	jA	51	lC	54	jC	77	jB	58	gC
INPA R325	97	fD	319	dA	33	mE	206	dB	117	iC	79	fD
INPA R332	108	fD	116	lD	217	eB	194	dC	328	cA	103	eD
INPA R555	14	iE	40	nD	79	jC	174	eB	251	dA	27	hE
INPA R672	48	hE	126	lC	151	hB	162	eB	223	eA	91	eD
INPA R689	205	cA	184	hB	126	iC	107	hC	57	lD	66	fD
INPA R699	95	fC	112	lB	108	iB	126	gA	144	hA	88	eC
INPA R710	148	eC	257	eA	245	dA	201	dB	115	iD	144	cC
INPA R713	42	hD	86	mC	137	hB	133	gB	200	fA	74	fC
INPA R720	70	gD	244	fA	114	iC	204	dB	199	fB	90	eD
INPA R729	78	eB	107	lC	117	iC	150	fB	251	dA	66	fD
INPA R733	142	eB	160	iB	210	eA	163	eB	104	iC	76	fD
INPA R734	149	eC	231	fA	119	iD	180	eB	216	eA	102	eD
INPA R741	106	fC	275	eA	104	iC	158	eB	154	hB	68	fD
INPA R751	90	fD	493	aA	145	hC	172	eB	167	gB	68	fE
INPA R770	68	gD	150	iC	152	hC	236	cB	373	bA	75	fD
INPA R779	81	gE	393	bA	294	cB	295	bB	260	dC	212	aD
INPA R781	79	gD	305	dA	115	iC	225	cB	220	eB	86	eD
INPA R782	68	gC	340	cA	318	bB	302	bB	314	cB	73	fC
INPA R783	66	gE	125	lC	137	hB	146	fB	189	fA	97	eD
INPA R784	129	eB	194	gA	86	jC	88	iC	88	jC	75	fC
INPA R791	131	eD	203	gB	288	cA	204	dB	181	fC	44	gE
INPA R796	59	gE	287	dA	256	dB	242	cB	189	fC	96	eD
INPA R798	64	gC	312	dA	180	gB	182	eB	171	gB	77	fC
INPA R803	97	fC	84	mC	147	hB	166	eA	174	gA	139	cB
INPA R969	137	eC	191	gA	162	gB	35	jE	113	iD	122	dD
INPA R970	127	eA	101	mB	30	mB	29	lD	66	lC	118	dA
INPA R972	72	gE	96	mD	123	iC	130	gC	193	fA	153	bB
INPA R974	62	gC	166	iA	73	jC	89	iB	100	iB	56	gC
INPA R976	37	hC	74	mB	125	iA	84	iB	86	jB	55	gC
INPA R980	45	hD	182	hA	36	mD	139	fB	116	iC	105	eC
INPA R986	134	eA	115	lB	135	hA	125	gB	150	hA	133	cA
INPA R989	173	dB	128	lC	193	fA	120	gC	72	lD	91	eD
INPA R995	45	hC	178	hA	160	gA	20	lD	91	jB	94	eB
INPA R997	232	bB	319	dA	154	hC	96	iE	133	hD	230	aB
INPA R1037	234	bA	228	fA	114	iB	114	hB	81	jC	122	dB
INPA R1043	75	gC	205	gA	19	mD	144	fB	155	hB	163	bB

Tabela 22: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL⁻¹), em meio líquido, com gasolina como fonte de carbono

Isolados	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
INPA R1044	74	gD	110	lC	25	mE	103	hC	154	hB	226	aA
INPA R1048	98	fC	150	iA	101	iC	92	iC	87	jC	126	dB
INPA R1051	110	fB	161	iA	105	iB	104	hB	119	iB	124	dB
INPA R1052	64	gD	91	mC	144	hA	108	hB	90	jC	64	fD
INPA R1053	11	iC	39	nB	26	mB	28	lB	94	jA	102	eA
INPA R1062	97	fE	318	dC	399	aA	370	aB	271	dD	35	hF
INPA R1063	34	hD	320	dB	413	aA	316	bB	408	aA	172	bC
INPA R1077	189	cA	96	mC	51	lE	84	iD	120	iB	130	dB
INPA R1081	257	aB	338	cA	100	iD	109	hD	89	jD	171	bC

OBS. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade), considerando as minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

Os isolados mostrados na Tabela 22, foram submetidos ao teste com a fonte de carbono querosene, quando comparados entre os tratamentos com 24h de incubação obteve destaque, apresentando um número maior de células, o isolado INPA R1037 (366 UFC.mL⁻¹) e com menor concentração o isolados INPA R974 (9 UFC.mL⁻¹), com 48h o maior número foi obtido pelo INPA R1051 (518 UFC.mL⁻¹) e o menor pelo isolado INPA R293 (43 UFC.mL⁻¹), com 72h as maiores concentrações foram do INPA R1063 (286 UFC.mL⁻¹) e INPA R1077 (287 UFC.mL⁻¹) e a menor foi de $31,00$ UFC.mL⁻¹ do isolado INPA R1053. Em 96h, o INPA R970 apresentou uma concentração de 319 UFC.mL⁻¹ e menor concentração de 20 UFC.mL⁻¹, do isolado INPA R267. Com 120h, o maior número foi do INPA R1063 (205 UFC.mL⁻¹), que novamente se destacou e com 144h o isolado INPA R332 obteve 302 UFC.mL⁻¹, com a menor concentração apresentada pelo INPA R318 (11 UFC.mL⁻¹).

Apesar de os isolados com altas concentrações celulares se destacarem entre os tratamentos em cada horário citado (Tabela 22), foi verificado os picos celulares (quantidade) entre as horas e observado que o INPA R1037 apresentou o maior pico com 48h de incubação e o INPA R1063 com 72 horas.

Tabela 23: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL⁻¹), em meio líquido, com querosene como fonte de carbono

Isolados	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
	----- 10^5 UFC.mL ⁻¹ -----											
INPA R267	39	mB	58	oA	36	mC	20	jC	18	iC	17	jC
INPA R281	83	jD	62	oE	109	hC	121	eC	173	bA	156	dB
INPA R293	29	mC	42	oC	72	jA	54	iB	53	gB	53	iB
INPA R302	32	mB	51	oA	35	mB	37	jB	30	hB	27	jB
INPA R307	30	mD	78	nC	125	hB	71	hC	158	cA	137	dB
INPA R315	59	lD	116	lB	157	fA	72	hD	89	eC	120	eB
INPA R316	133	hA	94	mB	62	lC	51	iD	62	gC	45	iD
INPA R318	282	cA	292	dA	189	dB	23	jC	17	iC	11	jC
INPA R325	82	jC	156	hA	94	iB	104	fB	147	cA	140	dA

Tabela 23: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL⁻¹), em meio líquido, com querosene como fonte de carbono

Isolados	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
INPA R332	75	IE	123	jC	95	iD	111	fC	158	cB	302	aA
INPA R555	47	mB	76	nA	70	lA	62	hA	49	gB	43	iB
INPA R672	185	fB	246	fA	151	fC	126	eD	88	eE	81	gE
INPA R689	280	cA	136	iB	83	jC	52	iD	51	gD	39	iD
INPA R699	149	gC	256	fA	190	dB	128	eD	62	gE	36	iF
INPA R710	179	fC	285	dA	209	cB	55	iD	36	hE	25	jE
INPA R713	45	mD	62	oC	187	dA	85	gB	74	fB	80	gB
INPA R720	160	gB	95	mC	203	cA	86	gC	69	fD	37	iE
INPA R729	202	eA	107	lC	151	fB	112	fC	101	eC	59	hD
INPA R733	124	hB	152	iA	54	lD	49	iD	56	gD	95	fC
INPA R734	235	dA	135	iC	156	fB	86	gD	80	fD	61	hE
INPA R741	145	gB	176	hA	145	gB	69	hC	66	fC	43	iD
INPA R751	298	bA	162	hB	170	eB	72	hC	69	fC	56	iC
INPA R770	215	eB	342	cA	168	eC	119	eD	78	fE	62	hE
INPA R779	191	fB	307	dA	159	fC	127	eD	84	eE	62	hF
INPA R781	157	gC	203	gB	236	bA	140	dD	85	eE	61	hF
INPA R782	180	fB	303	dA	117	hC	108	fC	75	fD	44	iE
INPA R783	201	eB	274	eA	153	fC	83	gD	72	fD	43	iE
INPA R784	181	fA	192	gA	94	iB	53	iC	30	hD	24	jD
INPA R791	167	gC	248	fA	209	cB	151	dD	90	eE	62	hF
INPA R796	320	bA	166	hB	139	gC	105	fD	93	eD	78	gE
INPA R798	219	eB	408	bA	125	hC	103	fD	51	gE	46	iE
INPA R803	40	mC	93	mB	115	hA	110	fA	87	eB	91	fB
INPA R969	39	mD	124	jB	90	iC	162	cA	110	dB	35	iD
INPA R970	19	nC	90	mB	80	jB	319	aA	83	eB	28	jC
INPA R972	57	lC	63	oC	63	lC	66	hC	118	dB	141	dA
INPA R974	9	nE	126	jB	74	jC	168	cA	119	dB	31	jD
INPA R976	60	lC	97	mB	114	hA	109	fA	119	dA	91	fB
INPA R980	125	hB	101	mC	138	gA	147	dA	112	dC	55	iD
INPA R986	69	lB	73	nB	123	hA	134	dA	122	dA	111	fA
INPA R989	106	iC	294	dA	159	fB	62	hD	35	hE	24	jE
INPA R995	35	mE	154	hA	85	jD	108	fC	135	dB	34	jE
INPA R997	67	lD	138	iB	185	dA	124	eC	150	cB	178	cA
INPA R1037	366	aB	400	bA	222	bC	64	hD	41	hE	38	iE
INPA R1043	16	nE	65	oD	66	lD	148	dB	116	dC	214	bA
INPA R1044	71	lC	90	mB	65	lC	101	fB	181	bA	92	fB
INPA R1048	229	dA	197	gB	135	gC	69	hD	58	gD	42	iE
INPA R1051	132	hB	518	aA	117	hB	50	iD	90	eC	40	iD
INPA R1052	152	gB	162	hB	201	cA	64	hC	75	fC	47	iD
INPA R1053	11	nD	71	nB	31	mC	30	jC	122	dA	22	jC
INPA R1062	133	hB	173	hA	188	dA	112	fC	87	eD	82	gD
INPA R1063	142	hD	190	gC	286	aA	214	bB	205	aB	188	cC
INPA R1077	161	gB	163	hB	287	aA	48	iC	59	gC	52	iC
INPA R1081	129	hC	183	gB	135	gC	116	fD	102	eD	215	bA

OBS. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade), considerando as minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

Os isolados de rizóbio, quando testados com fonte de carbono nafta (Tabela 23), e comparados entre os tratamentos, com 24h de incubação foi destacado com maior número celular, o isolado INPA R779 (420 UFC.mL⁻¹) e com menor concentração o isolado INPA R267 (3 UFC.mL⁻¹). Com 48h, a maior concentração foi obtida pelo INPA R713 (354 UFC.mL⁻¹) e a menor foi INPA R293 (17 UFC.mL⁻¹). Em 72h, o

isolado INPA R734 apresentou uma quantidade de 253 UFC.mL⁻¹, tendo o INPA R293, com uma baixa concentração celular de 10 UFC.mL⁻¹, em 96, 120 e 144 o INPA R1037 apresentou concentrações variando de 208 à 329 UFC.mL⁻¹, tendo a menor quantidade celular desses três tempos de 1 UFC.mL⁻¹.

O isolado INPA R1037 que se destacou por apresentar elevada concentração celular entre os três últimos tempos de incubação, foi verificado o pico maior quantidade celular com 144h de incubação.

Tabela 24: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10⁵ UFC.mL⁻¹), em meio líquido, com nafta como fonte de carbono

Isolados	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
	-----10 ⁵ UFC.mL ⁻¹ -----											
INPA R267	3	oB	22	oA	13	pA	6	oB	2	nB	1	nB
INPA R281	79	IC	61	ID	133	fA	128	eA	107	fB	113	fB
INPA R293	33	nA	17	oB	10	pC	9	oC	7	nC	2	nC
INPA R302	20	oB	22	oB	36	nA	41	mA	29	mB	25	mB
INPA R307	17	oD	47	mC	115	hA	114	fA	83	hB	78	hB
INPA R315	76	IC	80	jC	201	cA	88	hB	64	iD	25	mE
INPA R316	135	gB	342	bA	141	eB	71	iD	60	jE	88	hC
INPA R318	148	gA	101	iC	82	iD	117	fB	66	iE	49	IF
INPA R325	69	IA	61	IB	20	oC	60	jB	22	mC	53	IB
INPA R332	134	gD	191	eB	202	cA	164	cC	100	fE	77	hF
INPA R555	18	oD	19	oD	13	pD	129	eA	67	iC	77	hB
INPA R672	106	iA	94	iB	66	IC	66	iC	69	iC	58	jC
INPA R689	78	ID	210	dA	29	nE	130	eB	117	eC	104	fC
INPA R699	107	iA	99	iA	66	IC	83	hB	87	gB	65	iC
INPA R710	248	cA	92	iB	61	IC	43	ID	38	ID	35	mD
INPA R713	138	gC	354	aA	183	dB	123	fC	45	IE	108	fD
INPA R720	199	eB	241	cA	193	cB	139	dC	118	eD	118	eD
INPA R729	62	mC	79	jB	131	fA	61	jC	76	hB	44	ID
INPA R733	240	cA	131	gB	86	iC	58	jE	75	hD	37	mF
INPA R734	68	IE	149	fB	253	aA	62	jE	75	hD	127	eC
INPA R741	126	hA	121	hA	75	jC	68	jE	91	gB	62	jD
INPA R751	169	fA	63	IC	110	hB	69	iC	39	ID	33	mD
INPA R770	33	nA	35	nA	33	nA	32	mA	28	mA	28	mA
INPA R779	420	aA	105	iB	30	nE	94	hC	65	iD	35	mE
INPA R781	184	eA	79	jC	129	fB	38	mD	79	hC	45	ID
INPA R782	120	hA	65	IC	65	IC	81	hB	69	iC	56	jD
INPA R783	104	iB	117	hA	44	mD	105	gB	79	hC	50	ID
INPA R784	143	gA	115	hB	86	iC	87	hC	80	hC	67	iD
INPA R791	123	hB	146	fA	65	ID	40	mE	71	iD	101	gC
INPA R796	218	dA	76	jB	65	IC	59	jD	54	jD	51	ID
INPA R798	176	fA	118	hB	65	ID	49	IE	85	gC	61	jD
INPA R803	337	bA	102	iC	144	eB	62	jD	69	iD	31	mE
INPA R969	73	IC	129	gB	123	gB	134	eA	128	dB	138	dA
INPA R970	102	iC	154	fA	49	mE	115	fB	82	hD	29	mF
INPA R972	95	jD	185	eA	43	mE	148	dC	170	bB	103	fD
INPA R974	48	mE	37	nF	187	dA	133	eB	108	fC	83	hD
INPA R976	49	mE	125	gB	175	dA	105	eB	90	gD	98	gC
INPA R980	64	mC	59	IC	120	gA	116	fA	108	fB	69	iC
INPA R986	40	nF	90	iD	113	hC	162	cB	59	jE	178	cA
INPA R989	54	mD	48	mD	107	hC	99	gC	127	dB	149	dA
INPA R995	54	mE	66	ID	73	jD	88	hC	159	cA	101	gB
INPA R997	164	fC	97	iE	153	eD	188	bB	54	jF	200	bA

Tabela 24: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL⁻¹), em meio líquido, com nafta como fonte de carbono

Isolados	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
INPA R1037	86	jD	121	hC	118	gC	208	aB	208	aB	329	aA
INPA R1043	114	iB	226	dA	49	mD	29	mE	79	hC	77	hC
INPA R1044	82	lE	178	eA	36	nF	138	dB	111	fC	94	gD
INPA R1048	91	jF	158	fA	124	gD	146	dB	114	fE	131	eC
INPA R1051	138	gC	183	eA	125	gD	38	mE	31	mE	164	cB
INPA R1052	210	dB	240	cA	73	jD	117	fC	53	jE	71	iD
INPA R1053	115	iD	155	fA	60	lE	146	dB	126	dC	147	dB
INPA R1062	19	oC	26	oC	23	oC	20	nC	37	lB	60	jA
INPA R1063	120	hC	131	gB	204	cA	49	lE	49	lE	92	gD
INPA R1077	134	gC	185	eB	221	bA	185	bB	118	eD	109	fE
INPA R1081	93	jC	124	gA	87	iD	101	gB	66	iE	81	hD

OBS. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade), considerando as minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

Com a fonte de carbono óleo lubrificante, os isolados, quando comparados entre os tratamentos com 24h de incubação, obteve maior quantidade de células o isolado INPA R970 (321 UFC.mL⁻¹) e menor concentração o isolado INPA R972 (25 UFC.mL⁻¹). Com 48h, o INPA R689 obteve uma concentração de 362 UFC.mL⁻¹, tendo como menor o isolado INPA R976 (49 UFC.mL⁻¹). Nos tempos de 72 e 96h, o INPA R1044 obteve as maiores concentrações entre os tratamentos, não havendo diferença significativa entre as concentrações obtidas (296 e 258 UFC.mL⁻¹) e com 120h o INPA R332, INPA R713 e INPA R1063 variaram entre 218 à 226 UFC.mL⁻¹, tendo o isolado INPA R316 com menor concentração (31 UFC.mL⁻¹) e com 144h os isolados INPA R997(128 UFC.mL⁻¹) e INPA R1044 (225 UFC.mL⁻¹) se destacaram, pois continham o maior número de células e o menor ficou de 15 UFC.mL⁻¹, apresentado pelo isolado INPA R293.

Esses isolados que se destacaram com concentrações elevadas de células entre os tratamentos de cada horário citado, quando verificado os picos que tiveram maior número de células entre as horas, foi observado que o INPA R1044 apresentou o maior pico de crescimento com 72h de incubação (Tabela 24).

Tabela 25: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL⁻¹), em meio líquido, com óleo lubrificante como fonte de carbono

Isolados	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
	----- 10^5 UFC.mL ⁻¹ -----											
INPA R267	72	lB	93	gB	78	fB	80	fB	127	dA	92	dB
INPA R281	134	hA	118	fB	144	cA	146	cA	140	dA	114	cB
INPA R293	94	jA	96	gA	60	gB	35	hC	96	fA	15	gD
INPA R302	77	lC	109	gB	128	dA	115	eB	49	hD	100	dB
INPA R307	132	hB	98	gC	101	eC	183	bA	89	fC	51	fD
INPA R315	98	jC	105	gC	146	cA	118	eB	94	fC	129	cB
INPA R316	179	fA	119	fB	37	hD	33	bA	31	hD	69	fC

Tabela 25: Concentração de células estimadas em câmara de Neubauer (10^5 UFC.mL⁻¹), em meio líquido, com óleo lubrificante como fonte de carbono

Isolados	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		144 horas	
INPA R318	174	fA	152	eB	44	hD	59	gD	83	fC	85	eC
INPA R325	122	iC	101	gD	117	dC	159	cB	102	eD	183	bA
INPA R332	153	gB	132	fC	120	dC	114	eC	218	aA	77	eD
INPA R555	78	lC	110	gB	60	gD	86	fC	158	cA	115	cB
INPA R672	97	jC	150	eA	133	dB	160	cA	92	fC	76	eD
INPA R689	96	jC	362	aA	172	bB	114	eC	58	gE	127	cC
INPA R699	149	gA	145	eA	132	dB	131	dB	114	eB	75	eC
INPA R710	205	eB	247	bA	79	fC	67	gC	69	gC	80	eC
INPA R713	92	jD	120	fC	90	eD	156	cB	220	aA	109	dC
INPA R720	101	jB	130	fA	131	dA	119	eA	80	fB	94	dB
INPA R729	90	jD	160	eA	125	dB	111	eC	83	fD	99	dC
INPA R733	200	eA	84	hC	129	dB	61	gD	42	hD	74	eC
INPA R734	111	jB	150	eA	135	dA	135	dA	123	dB	63	fC
INPA R741	34	nB	127	fA	119	dA	115	eA	104	eA	108	dA
INPA R751	54	mD	183	dA	106	eC	183	bA	192	bA	127	cB
INPA R770	106	jC	193	cA	138	dB	151	cB	131	dB	84	eD
INPA R779	79	lD	166	dA	135	dB	109	eC	91	fC	71	eD
INPA R781	85	lD	175	dA	172	bA	154	cA	124	dC	63	fE
INPA R782	85	lC	175	dA	169	bA	155	cA	124	dB	64	fD
INPA R783	120	iC	177	dA	139	dB	114	eC	139	dB	105	dC
INPA R784	87	jB	147	eA	89	eB	64	gC	85	fB	67	fC
INPA R791	65	lC	163	eA	143	cA	110	eB	148	cA	77	eC
INPA R796	137	hC	173	dA	146	cB	133	dC	122	dC	101	dD
INPA R798	38	nD	166	dA	158	bA	126	eB	168	cA	68	fC
INPA R803	89	jC	104	gC	120	dB	114	eB	121	dB	136	cA
INPA R969	165	fB	202	cA	85	fD	124	eC	129	dC	104	dD
INPA R970	321	aA	97	gC	71	fD	139	dB	139	dB	63	fD
INPA R972	25	nD	66	hC	116	dA	96	fB	86	fB	108	dA
INPA R974	244	dA	93	gC	48	hD	137	fC	130	dB	96	dC
INPA R976	47	mD	49	iD	153	cA	106	eB	93	fC	77	eC
INPA R980	290	bA	110	gD	96	eD	145	cB	121	dC	92	dD
INPA R986	64	lC	52	iC	127	dA	145	cA	102	eB	116	cB
INPA R989	133	hA	71	hB	84	fB	84	fB	96	fB	88	dB
INPA R995	250	dA	115	fC	65	gE	94	fD	182	bB	36	gF
INPA R997	153	gB	160	eB	101	eD	128	eC	119	dC	212	aA
INPA R1037	157	gB	211	cA	29	hD	38	hD	58	gC	60	fC
INPA R1043	276	cA	139	fC	77	fE	99	fD	95	fD	193	bB
INPA R1044	162	gE	203	cD	296	aA	258	aB	104	eF	225	aC
INPA R1048	165	fB	225	bA	94	eC	90	fC	68	gD	101	dC
INPA R1051	202	eA	106	gB	70	fC	85	gC	119	dB	120	cB
INPA R1052	201	eB	223	bA	72	fC	70	gC	64	gC	54	fC
INPA R1053	134	hB	160	eA	62	gD	109	eC	91	fC	80	eD
INPA R1062	113	iA	65	hB	124	dA	111	eA	106	eA	22	gC
INPA R1063	120	iC	149	eB	163	bB	132	dC	226	aA	74	eD
INPA R1077	75	lB	121	fA	113	dA	88	fB	84	fB	92	dB
INPA R1081	210,33	eA	148,67	eC	86,67	fD	134,33	dC	86,00	fD	178,00	bB

1- As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade), considerando as minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

O aumento na capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos que ocorrem nas populações de micro-organismos autóctones, em ambientes poluídos por derivados de petróleo, é chamado de adaptação (SPAIN et al., 1980). Essa adaptação resulta em um

aumento da proporção de degradação dos hidrocarbonetos e pode ocorrer por três mecanismos inter-relacionados: Indução e/ou desrepressão de enzimas específicas, mudanças genéticas que resultam na aquisição de novas atividades metabólicas e enriquecimento seletivo de organismos capazes de transformar os compostos (LEAHY e COLWELL, 1990).

Os resultados dos isolados de rizobactérias testados, nas seis fontes de carbono (manitol, óleo diesel, gasolina, querosene, nafta e óleo lubrificante) com relação a concentração de células, observa-se que quando utilizado o manitol, com 24 horas de incubação a maior média entre os tratamentos foi de 293 UFC.mL⁻¹ e quando comparada essa média com os combustíveis utilizados, verificou-se que com exceção da gasolina que apresentou uma média de 257 UFC.mL⁻¹, todos os outros apresentaram médias superiores chegando a 420 UFC.mL⁻¹ com a fonte de carbono nafta. Apesar do controle ter o maior número de isolados que se destacaram entre os tratamentos e as horas investigadas, nota-se que as médias da maioria dos isoados testados nas demais fontes de carbono, são superiores ao controle.

Quando comparado também o teste do Diclorofenol Indofenol – DCPIP visual com o quantitativo de células, nota-se que alguns micro-organismos apresentaram alta descoloração e baixa média relacionada ao número de células e em outros casos baixa descoloração e alto número de células, como é o caso do isolado INPA R779, que apresentou uma baixa nota de descoloração visual (Nota 01) e uma média elevada de células de 470 UFC.mL⁻¹ em 24h de incubação, com a fonte de carbono nafta, conforme tabela 23 e tabela 24. O alto índice de descoloração, pode não estar associado a um número elevado de micro-organismos, e isso pode indicar que alguns micro-organismos, quando atuam em quantidades populacionais baixas, podem possuir boa capacidade para biodegradabilidade. Esses resultados são semelhantes aos descritos por Souza et al. (2010) que demonstraram a capacidade de 90% de seus isolados para a degradação de gasolina comercial. Muitos outros trabalhos envolvendo o uso do corante DCPIP utilizaram bactérias (MARIANO et al., 2008; FURLAN, 2011). Cruz (2013), ao avaliar a capacidade de degradação de *Bacillus subtilis* em solo contaminado, demonstrou através de ensaios de DCPIP que o petróleo é menos biodegradável quando comparado com o diesel e o biodiesel. Lopes (2014) observaram que a bactéria *P. aeruginosa* possui grande capacidade de metabolizar óleo lubrificante, proporcionando maior taxa de biodegradação deste composto em comparação ao tratamento sem a bioaugmentação.

Portanto, esses resultados corroboram com Weber e Santos (2013) quando esses afirmam que a biorremediação é a alternativa biológica mais correta e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados por estas substâncias de difícil degradação, estes consórcios de rizobactérias demonstram a ótima capacidade na degradação de petróleo e seus derivados.

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS SELECIONADOS NO TESTE DO DCPIP.

A partir do sequenciamento da região do gene 16s rRNA foram identificados os seguintes gêneros, conforme a tabela 26.

Tabela 26 - Identificação dos isolados com base na comparação de sequência de 16 rDNA obtida com outras depositadas no banco de dados *GenBank* (análise BLASTn).

Isolados	Resultado BLASTn	Identidade (%)	Número de acesso
INPA R302	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	DQ3424561
INPA R332	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KM4337361
INPA R555	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KJ1254011
INPA R713	<i>Rhizobium</i> sp.	100	TJ167789789

4.5 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELOS CONSÓRCIOS FORMADOS

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica¹. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico). Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Muitos microrganismos possuem capacidade enzimática para degradar hidrocarbonetos existentes no petróleo (ATLAS, 1995). Diante disso, o petróleo foi escolhido para a realização desse teste, devido à predominância de

hidrocarbonetos existentes em sua composição química, pois estes são utilizados como indicadores de poluição quando há derramamentos em aquíferos ou no solo.

A partir de testes realizados com 169 isolados de rizóbactérias capazes de crescerem em meio sólido e líquido contendo derivados de petróleo (gasolina, nafta, óleo diesel, óleo lubrificante e querosene), 04 foram selecionados por possuírem essa capacidade de crescimento e degradação quando testados em todos os derivados descritos e destes formados 05 consórcios. Através da realização de uma investigação da capacidade desses isolados em produzir biossurfactantes e estes por poderem ser produzidos em substratos solúveis em água, foram cultivados em meios líquidos (SYM e INPA), contendo petróleo como fonte de carbono.

Já foi possível visualizar a atividade de emulsificante do tipo água em óleo (A/O) pela formação de espuma com aparência de bolhas, entre a fonte de carbono e o sobrenadante logo após os primeiros minutos do teste. Alguns tratamentos apresentaram uma alta espessura da camada emulsificante, os isolados INPA R555, R713, no meio SYM e todos os Consórcios no SYM com valores de 2,07cm a 9,36cm e, no meio INPA com 2,65cm a 9,14cm. Já os isolados INPA R302 e R332 apresentaram espessura de CE moderadas no meio SYM com 1,07cm e 1,45cm, e no meio INPA a CE foi considerada baixa para os mesmos isolados (0,78cm e 0,88cm) e moderada para INPA R555 e R713 (1,17cm e 1,92cm). Após 48 horas de repouso essa camada tornou-se mais visível, sendo consideradas altas em todos os tratamentos. Variando de 4,97cm a 12,23cm, para o Consórcio 01 e Consórcio 05, respectivamente, no meio SYM e de 3,66cm a 11,15cm nos tratamentos INPA R302 e Consórcio 05, no meio INPA, conforme convenção adotada por Matsuura (2004) descritos na tabela 27. Demonstrando assim que os microrganismos utilizados se adaptaram ao meio de cultura com as fontes de carbono utilizadas. Esses resultados são similares aos descritos por Cáuper et al. (2017), quando estes avaliaram o potencial de produção de biossurfactantes de 15 rizóbios isolados da rizosfera de plantas leguminosas. Estes autores relataram que 3 isolados destacaram-se por apresentarem uma média boa em seu índice emulsificante (UNIP R19 1,58052; UNIP R21 1,50772 e UNIP R22 1,55877). A produção de biossurfactantes também foi demonstrada por amostras de fungos isolados de resíduos oleosos, dos quais 17 apresentaram atividade de produção após 14 dias de fermentação (SPERB, 2015).

Tabela 27: Espessura da camada emulsificante (CE) de estirpes de rizobactérias usando duas soluções de sais diferentes e petróleo como fontes de carbono.

Tratamentos	CE			
	SYM		INPA	
	-----cm-----			
Controle	0,00	B	0,00	B
INPA R302	5,84	A	3,66	A
INPA R332	6,32	A	5,21	A
INPA R555	6,50	A	4,17	A
INPA R713	7,37	A	5,82	A
Consórcio 01	4,97	A	7,96	A
Consórcio 02	6,22	A	6,23	A
Consórcio 03	5,16	A	6,93	A
Consórcio 04	5,96	A	5,72	A
Consórcio 05	12,23	A	11,15	A

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

Para avaliação da atividade emulsificante (densidade óptica, Tabela 28), foram medidos os valores de absorvância do óleo em água - O/A (Figura 1), que é definida como a quantidade de biossurfactantes necessária para aumentar a absorvância em 1,0 unidade a 610 nm, os tratamentos não apresentaram quantidades altas de emulsificantes nos meios analisados. As 48 horas de ensaio, os Consórcios 03 e 04 apresentaram atividade moderada com 0,74U e 0,70 U, no meio SYM e os Consórcios 02 e 04 com 0,73U e 1,04 U, no meio INPA (Tabela 28).

Tabela 28: Densidade Óptica - Atividade emulsificante de estirpes de rizobactérias usando duas soluções de sais diferentes e petróleo como fonte de carbono.

Tratamentos	Óleo em água			
	SYM		INPA	
	----- U -----			
Controle	0,03	B	0,03	B
INPA R302	0,19	B	0,07	B
INPA R332	0,33	B	0,02	B
INPA R555	0,20	B	0,03	B
INPA R713	0,32	B	0,07	B
Consórcio 01	0,27	B	0,10	B
Consórcio 02	0,34	B	0,73	M
Consórcio 03	0,74	M	0,51	B
Consórcio 04	0,70	M	1,04	M
Consórcio 05	0,20	B	0,55	B

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

O índice de emulsificação (IE) e a estabilidade da emulsão são importantes para avaliação do poder emulsificante (COSTA, 2005). Como visto na tabela 29, onde todos os tratamentos testados produziram camadas significativas desses emulsificantes, conforme pode se observar pela comparação com a camada formada pelo tratamento controle. Segundo Matsuura (2004), as camadas emulsificantes formadas por todos

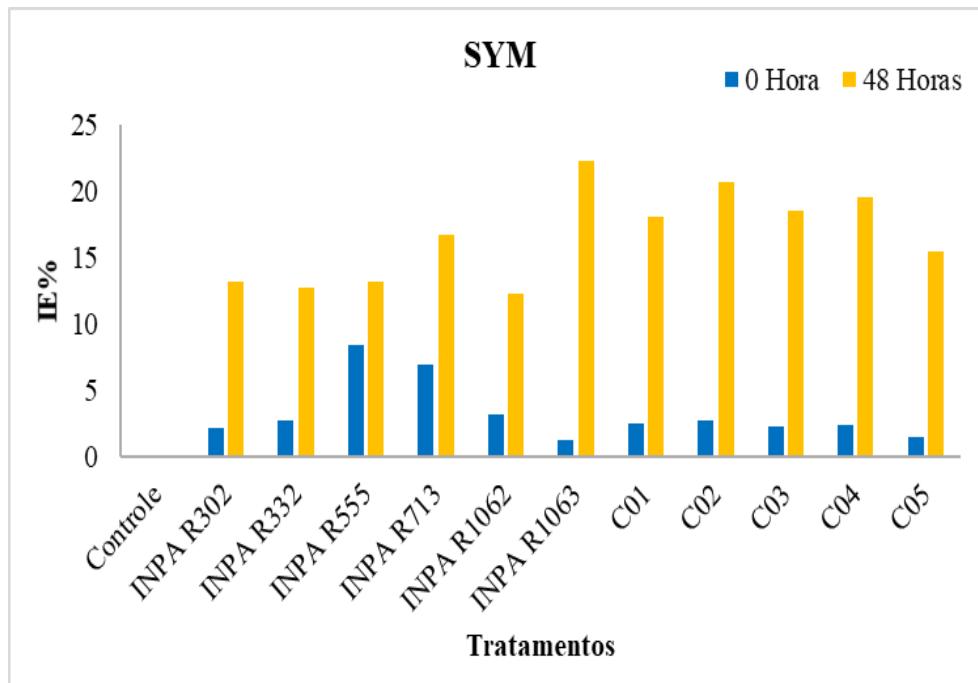


Figura 17: Índice de Emulsificação (IE) de diferentes tratamentos em Meio SYM com petróleo como fonte de carbono, com biossurfactante de rizobactérias.

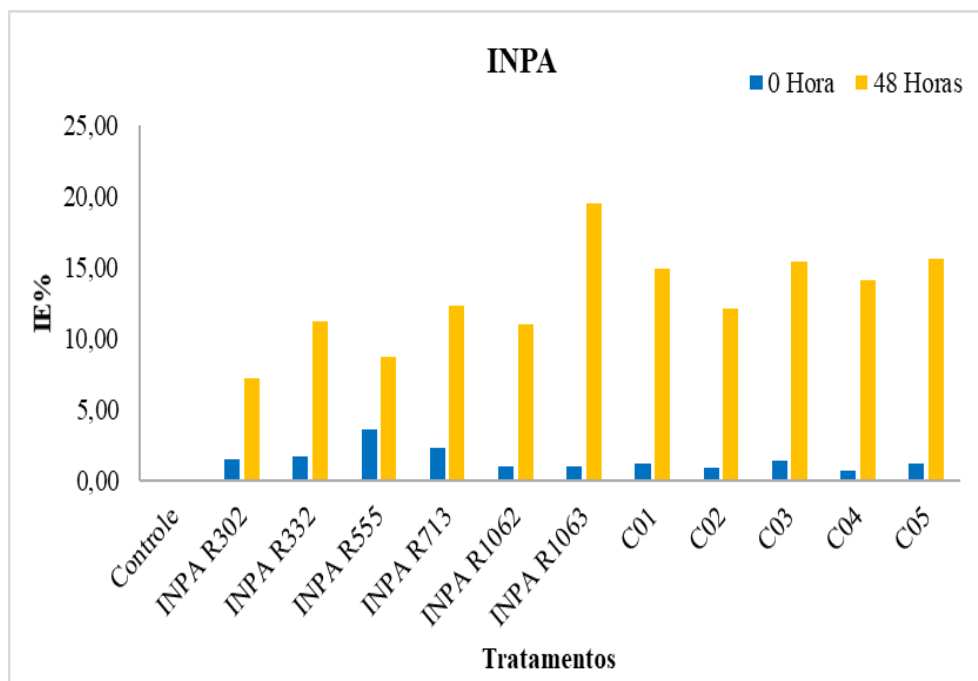


Figura 18: Índice de Emulsificação (IE) de diferentes tratamentos em Meio INPA com petróleo como fonte de carbono, com biossurfactante de rizobactérias.

O pH é um fator químico que afeta diretamente a atividade microbiana, devido aos efeitos dos íons H⁺ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, e, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na

solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos micro-organismos (JACQUES et al., 2007).

Na tabela 31 são apresentados resultados obtidos para pH, podendo-se observar que valores iniciais de pH variou ao utilizar o meio SYM de 7,26 a 7,49 e no meio INPA de 6,53 a 6,67. Após 48 horas foi observado a variação do pH final no meio SYM de 7,58 a 8,06 e INPA de 6,57 a 6,87, indicando com isso, neutralidade, todos contendo petróleo como fonte de carbono e com produção de biomassa.

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

Algumas características apresentam vantagens sobre os surfactantes convencionais como tolerância à temperatura, pH e força iônica. Alguns biosurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. O lipopeptídeo de *B. licheniformis* JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75°C por até 140 h e pH entre 5 e 12 (NITSCHKE e PASTORE 2002). De acordo com esses parâmetros, mesmo havendo variações de pH entre 4 e 7 nas amostras com os meios salinos (INPA e SYM) e com a fonte de carbono (petróleo), os valores obtidos estão dentro da faixa de pH ideal (Tabela 31).

Tabela 30: Avaliação do pH durante o teste de avaliação do potencial de emulsificação – Meio SYM e/ou INPA com petróleo e inóculo

Tratamentos	pH			
	SYM		INPA	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	7,26	7,58	6,59	6,57
INPA R302	7,36	7,70	6,67	6,72
INPA R332	7,26	7,96	6,53	6,87
INPA R555	7,36	7,79	6,65	6,77
INPA R713	7,37	7,90	6,66	6,75
Consórcio 01	7,49	8,06	6,66	6,61
Consórcio 02	7,44	7,93	6,67	6,64
Consórcio 03	7,38	7,96	6,65	6,56
Consórcio 04	7,32	8,00	6,62	6,58
Consórcio 05	7,45	8,02	6,67	6,74

Resultados semelhantes foram descritos por Cáuper et al. (2017) que também ao realizar testes com rizobactérias, observaram que, dentre os 15 isolados estudados, a maioria apresentaram atividade emulsificante em 1 minuto após a montagem do teste de colapso da gota. Outras espécies de bactérias foram testadas por Larik et al. (2018).

Estes mesmos descreveram taxas de degradação significativas, 88,5 e 71,8%, e excelente potencial para a produção de biossurfactantes por *Stenotrophomonas maltophilia* (ensaio de deslocamento de óleo = 6 mm; tensão superficial = 33,9 e 34,4 m N m⁻¹). Decesaro et al. (2013) ao avaliar a produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel afirmaram que os microrganismos identificados que são comumente isolados em solos contaminados com resíduos oleosos, podem estar envolvidos nos processos de biodegradação destes e na produção de biossurfactantes.

4.6 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE SOLO

Verificou-se o crescimento das rizobactérias e seus consórcios (Tabela 32), onde com sete dias de agitação o isolado INPA R713 (254,78 UFC x 10²) e o Consórcio 01 (233,33 UFC x 10²) apresentaram crescimento significativo e maior com relação aos demais isolados, sendo que o INPA R332 apresentou o menor crescimento (66,00 UFC x 10²). Com quatorze dias de incubação, o Consórcio 03 apresentou um alto crescimento (1228,11 x 10²), atingindo seu pico mais elevado de crescimento e maior também com relação aos demais tratamentos. Aos vinte um dias, com exceção dos INPA R302 que apresentou um pequeno aumento no número de colônias (de 53,11 para 69,55 x 10²), os demais diminuíram consideravelmente o número de colônias, principalmente o consórcio INPA R03 (61,78 x 10²) e com vinte e oito dias todos os tratamentos apresentaram crescimento menor se comparados aos demais períodos analisados. Essas informações estão confirmadas na figura 19, onde se destaca o maior pico de crescimento dos Consórcio 02 e 03 e os picos mais baixos com vinte e oito dias de incubação.

Com relação ao tempo de incubação, os tratamentos atingiram o ápice de crescimento aos 14 dias de incubação, com exceção do INPA R302 e INPA R713 que obtiveram maior crescimento aos 7 dias. O Consórcio 03 apresentou a maior média entre os tratamentos, seguido pelo Consórcio 02.

Tabela 31: Crescimento de rizobactérias em solo estéril, utilizando o meio nutricional INPA, com diluição de 10^2

Tratamentos	Diluição 10^2							
	7 Dias		14 Dias		21 Dias		28 Dias	
Controle H ₂ O	0,00	eA	0,00	iA	0,00	cA	0,00	bA
Controle INPA	0,00	eA	0,00	iA	0,00	cA	0,00	bA
INPA R302	154,33	bA	53,11	hB	69,55	aB	15,44	bC
INPA R332	66,00	dB	108,45	gA	32,89	bC	13,67	bC
INPA R555	167,00	bB	387,33	dA	86,89	aC	7,45	bD
INPA R713	254,78	aA	136,45	fB	88,67	aC	31,33	aD
Consórcio 01	233,33	aB	514,22	cA	87,22	aC	44,55	aD
Consórcio 02	91,67	dB	808,34	bA	64,89	aC	43,00	aC
Consórcio 03	127,66	cB	1228,11	aA	61,78	aC	21,22	bD
Consórcio 04	115,33	cB	335,78	eA	70,56	aC	15,67	bD
Consórcio 05	154,67	bA	160,89	fA	23,56	bB	19,00	bB

OBS. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade), considerando as minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

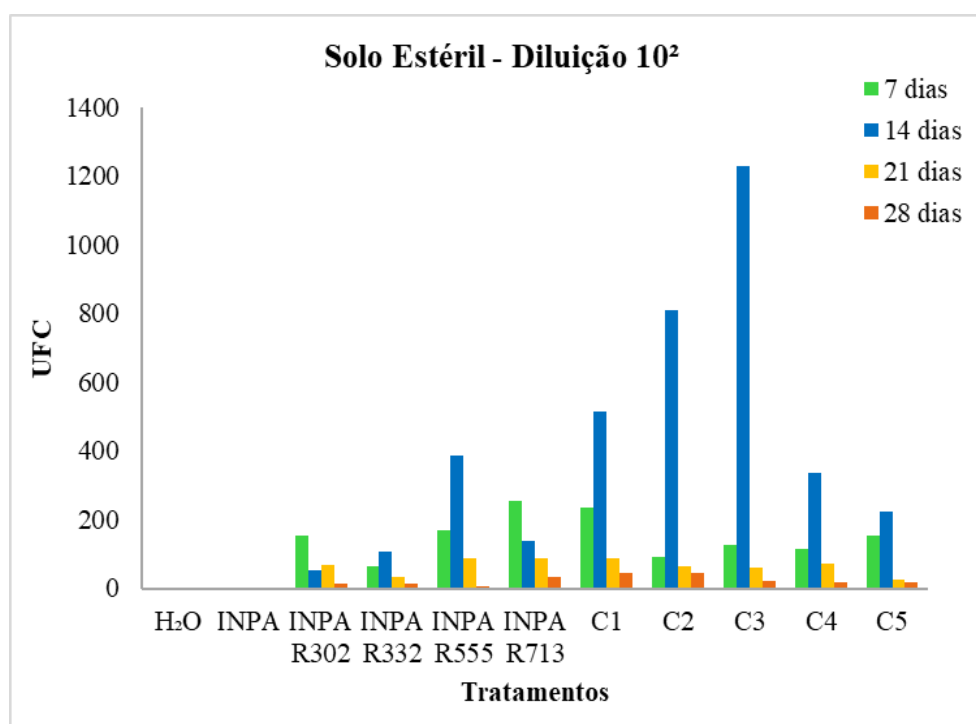


Figura 19: Comparativo de crescimento entre os tratamentos, com diluição de 10^2 , utilizando solo estéril e petróleo como fonte de carbono.

Com relação ao crescimento dos isolados testados, referentes a diluição 10^5 , verificou-se que com sete dias de incubação, o isolado INPA R 555 (Tabela 33), apresentou crescimento ($341,78 \text{ UFC} \times 10^5$) significativo e maior com relação aos demais isolados, com o Consórcio 04 apresentando o menor crescimento ($71,44 \text{ UFC} \times 10^5$). Aos quatorze dias de incubação, o Consórcio 05 apresentou crescimento mais elevado ($300,56 \times 10^2$), quando comparado aos demais tratamentos e os menores

valores de crescimento foram apresentados pelos isolados INPA R302 (123,89 UFC x 10⁵), INPA R 555 (137,33 UFC x 10⁵), INPA R713 (132,89 UFC x 10⁵) e o Consórcios 01 (102,66 UFC x 10⁵).

Aos vinte um dias, a maioria dos tratamentos apresentaram uma diminuição no número de colônias, com excessão do Consórcio 01 que apresentou um pequeno aumento no número (de 102,66 para 105,00 x 10⁵). Os demais diminuiram, com os tratamentos INPA R332 (44,78 (123,89 UFC x 10⁵), Consórcio 03 (37,00 UFC x 10⁵) e Consórcio 05 (24,33 UFC x 10⁵) apresentando menores números de colônias. Com vinte e oito dias, a maioria dos tratamentos apresentaram crescimento menor se comparados aos demais períodos e tratamentos analisados.

Com relação ao tempo de incubação (Figura 20), a maioria dos tratamentos (INPA R332, Consórcios 02, 03, 04 e 05) atingiram o ápice de crescimento aos 14 dias de incubação, seguidos do INPA R302, 555 e 713 e o Consórcio 01, que obtiveram maior pico de crescimento aos 07 dias. O tratamento INPA R555 e no tempo de incubação, apresentando a maior média entre os tratamentos, seguido pelo Consórcio 05.

Tabela 32: Crescimento de rizobactérias em solo estéril, utilizando o meio nutricional INPA com diluição de 10⁵

Tratamentos	Diluição 10 ⁵							
	7 Dias		14 Dias		21 Dias		28 Dias	
Controle H ₂ O	0,00	fA	0,00	fA	0,00	dA	0,00	dA
Controle INPA	0,00	fA	0,00	fA	0,00	dA	0,00	dA
INPA R302	129,00	dA	123,89	eA	56,44	bB	45,33	cB
INPA R332	188,22	cA	191,56	dA	44,78	cB	54,78	cB
INPA R555	341,78	aA	137,33	eB	73,00	bC	23,67	dD
INPA R713	247,55	bA	132,89	eB	113,78	aB	88,44	bC
Consórcio 01	148,11	dA	102,66	eB	105,00	aB	114,11	aB
Consórcio 02	130,89	dB	232,22	cA	67,67	bC	77,33	bC
Consórcio 03	179,11	cB	259,44	bA	37,00	cC	49,78	cC
Consórcio 04	71,44	eB	227,45	cA	77,56	bB	67,56	bB
Consórcio 05	140,33	dB	300,56	aA	24,33	cC	39,67	cC

OBS. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade), considerando as minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

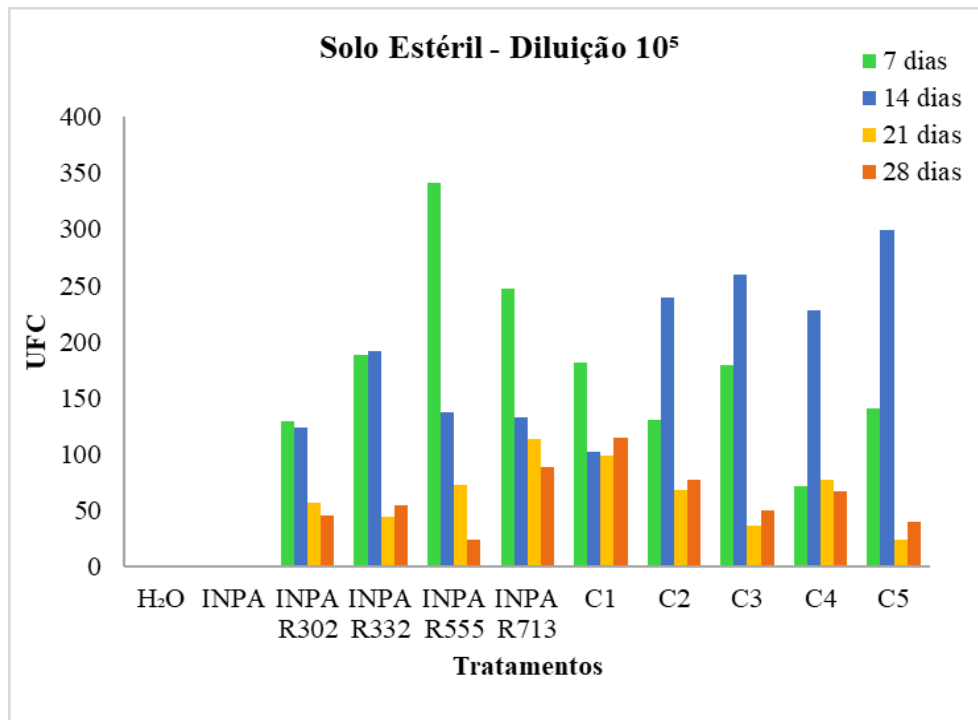


Figura 20: Comparativo de crescimento entre os tratamentos, com diluição de 10^5 , utilizando solo estéril e petróleo como fonte de carbono.

No solo não estéril (Tabela 33), aos sete dias de incubação o isolado INPA R302 ($111,54 \text{ UFC} \times 10^2$) apresentou maior crescimento com relação aos demais, e o Consórcio 5 apresentou o menor crescimento ($17,11 \text{ UFC} \times 10^2$). Aos quatorze dias, o Consórcio 01 apresentou crescimento de $2080,45 \times 10^2$, atingindo seu pico mais elevado de crescimento com relação ao tempo e maior também com relação aos demais tratamentos. Aos vinte e um dias, o Consórcio 04 apresentou número de colônias de $2183,77 \times 10^2$, e com vinte e oito dias os Consórcios 04 e 05 apresentaram crescimento de $2734,89$ e $2591,67 \text{ UFC} \times 10^2$, respectivamente.

Com exceção do sétimo dia, o controle H₂O apresentou menor crescimento nos demais períodos analisados. E ao observarmos o controle INPA, os resultados demonstram que este apresentou crescimento mais elevado quando comparado aos tratamentos Consórcios 02 e 04, aos 14 dias de incubação, INPA R302, aos 21 dias e com o Consórcio 05, aos 28 dias. Este cenário pode ser explicado pelo fato do solo não ser estéril e haver competição entre as rizobactérias autóctones e as alóctones. Na figura 21 é possível observar que com relação ao tempo de incubação, a maioria dos tratamentos atingiram o auge de crescimento aos 28 dias, com exceção dos Consórcios 01, 02 e 05, que obtiveram maior crescimento aos 14 e 21 dias, respectivamente.

Tabela 33: Crescimento de rizobactérias em solo não estéril, utilizando o meio nutricional INPA com diluição de 10^2

Tratamentos	Diluição 10^2							
	7 Dias		14 Dias		21 Dias		28 Dias	
Controle H ₂ O	20,00	aB	602,45	eA	862,45	dA	698,44	gA
Controle INPA	27,45	aB	1298,67	cA	1411,33	cA	1225,45	eA
INPA R302	111,44	aC	1779,89	bA	1044,44	dB	1709,00	dA
INPA R332	25,33	aC	1377,45	cB	1178,23	cB	2305,89	bA
INPA R555	63,78	aC	1549,33	bB	1652,89	bB	2020,22	cA
INPA R713	25,56	aC	1760,89	bA	1277,33	cB	1521,67	dA
Consórcio 01	48,00	aD	2080,45	aA	1200,89	cC	1465,23	dB
Consórcio 02	38,33	aC	1107,56	dB	1857,33	bA	1278,00	eB
Consórcio 03	41,34	aD	1383,67	cC	1857,89	bB	2734,89	aA
Consórcio 04	29,33	aD	1072,89	dC	2183,77	aB	2591,67	aA
Consórcio 05	17,11	aC	1580,33	bA	1349,33	cA	944,89	fB

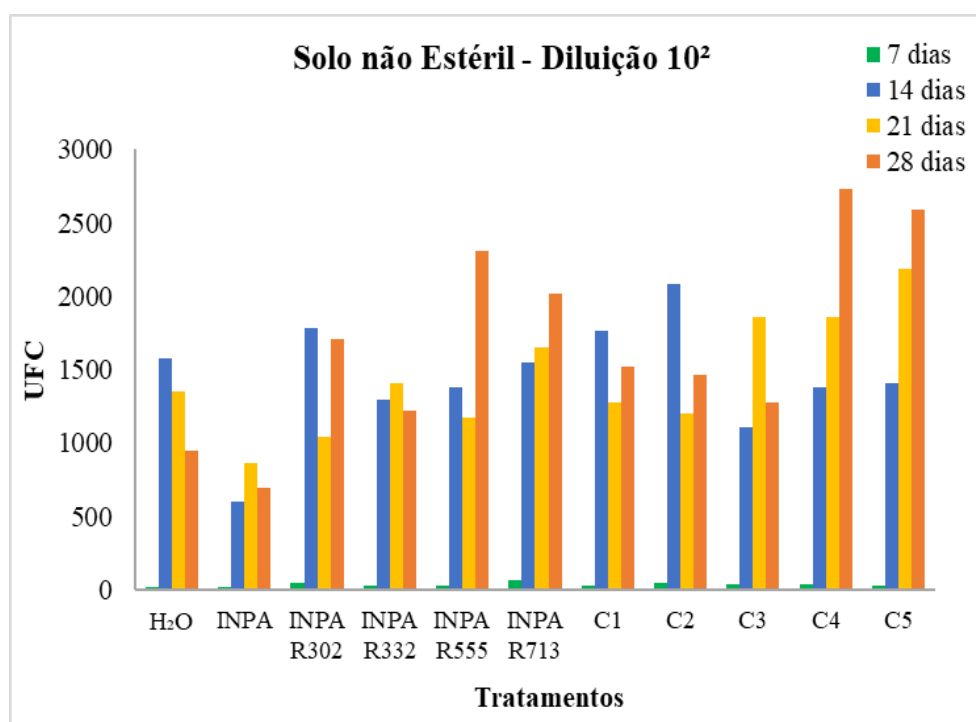


Figura 21: Comparativo de crescimento entre os tratamentos, com diluição de 10^2 , utilizando solo não estéril e petróleo como fonte de carbono.

Com relação a análise do solo não estéril (Tabela 34), referente a diluição 10^5 , verificou-se que aos sete dias de incubação o Consórcio 01 apresentou melhor crescimento ($76,22 \text{ UFC} \times 10^5$) entre os tratamentos e os menores foram o INPA R555 ($8,22 \text{ UFC} \times 10^5$) e o Controle H₂O ($6,44 \text{ UFC} \times 10^5$).

Aos quatorze dias de incubação, os que apresentaram maior número de colônias foram o Controle INPA ($1178,66 \text{ UFC} \times 10^5$) e o INPA R713 ($1270,22 \text{ UFC} \times 10^5$). Apesar do crescimento de poucas colônias com sete dias de incubação, observou-se que aos quatorze dias houve um aumento significativo de colônias, mesmo nos controles,

principalmente no Controle INPA, sugerindo que os nutrientes presente no meio ao juntar com os presentes no solo, favoreceram o crescimento dos micro-organismos já presentes no próprio solo.

Com vinte e um dias de incubação, verificou-se que os isolados INPA R302 (1178,89 UFC x 10⁵), INPA R555 (1115,56 UFC x 10⁵) e o Consórcio 02 (1113,78 UFC x 10⁵) se destacaram, pois apresentaram maior crescimento entre os tratamentos. Verificou-se também que o pico de crescimento da maioria dos tratamentos ocorreu nesse tempo. Já com 28 dias, com excessão dos Consórcios 03, 04 e 05 que aumentaram consideravelmente a quantidade de colônias, nos demais houve uma queda significativa no número dessas colônias.

Ao analisar a figura 22, referente aos tempos de incubação, verifica-se que a maioria dos tratamentos apresentou um crescimento significativo com 21 dias de incubação, seguido do 14^o dia, sendo que o Consórcio 05 apresentou seu pico de crescimento com 28 dias e o INPA R713 com 14 dias. Mesmo os controles, apresentaram um aumento significativo no número de Colônias nesses dias, que apesar dos nutrientes existentes no solo e no meio INPA e a falta destes na água, podemos observar que a fonte de carbono (petróleo) acrescentada aos tratamentos demonstrou que os micro-organismos presentes no solo ou os isolados em laboratório tiveram a capacidade de utilizá-la para potencializar seu crescimento. Observou-se ainda que ao adicionar as rizobactérias isoladas, sozinhas ou em consórcios a já presente microbiota do solo que houve um aumento significativo em todos os tratamentos, sugerindo com isso que é possível e viável a utilização das rizobactérias isoladas e cultivadas nesse trabalho de serem utilizadas num processo de biorremediação de solos, uma vez que demonstraram que se adaptaram ao meio de cultura, a fonte de carbono e as condições naturais do solo.

Tabela 34: Crescimento de rizobactérias em solo não estéril, utilizando o meio nutricional INPA com diluição de 10⁵

Tratamentos	Diluição 10 ⁵							
	7 Dias		14 Dias		21 Dias		28 Dias	
Controle H ₂ O	6,44	aD	493,66	fB	767,56	dA	329,00	gC
Controle INPA	14,44	aD	1178,66	aA	858,22	cB	417,44	gC
INPA R302	37,22	aD	1072,22	bB	1178,89	aA	597,33	fC
INPA R332	34,56	aC	612,22	eB	860,44	cA	813,33	eA
INPA R555	8,22	aD	772,67	dB	1115,56	aA	680,67	fC
INPA R713	34,00	aD	1270,22	aA	946,22	bB	787,00	eC
Consórcio 01	76,22	aD	892,33	cB	1001,22	bA	601,00	fC
Consórcio 02	54,67	aD	420,00	fC	1113,78	aA	890,78	dB
Consórcio 03	27,33	aD	898,67	cB	675,56	dC	1002,89	cA
Consórcio 04	21,67	aD	840,67	cC	972,89	bB	1130,22	bA
Consórcio 05	22,78	aD	885,44	cB	737,33	dC	1384,67	aA

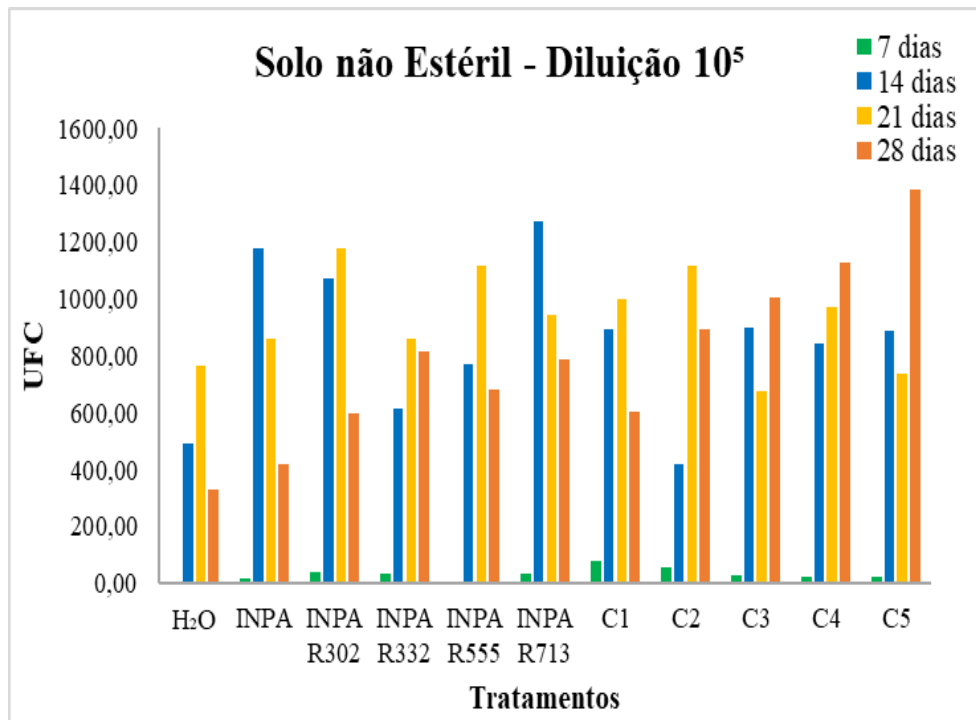


Figura 22: Comparativo de crescimento entre os tratamentos, com diluição de 10^5 , utilizando solo não estéril e petróleo como fonte de carbono

Ron e Rosenberg (2002) demonstraram a capacidade de micro-organismos amplamente distribuídos na natureza em utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono de forma altamente variável de acordo com a natureza química do composto na mistura do petróleo, e com as condições ambientais adequadas.

5 CONCLUSÕES

Dos 169 isolados de rizóbactérias, 122 apresentaram capacidade de tolerar a presença do óleo diesel no meio, apresentando bom crescimento, quando submetidos por 15 dias na presença dessa substância, 103 com Gasolina, 107 com Nafta, 94 com querosene e 94 com óleo lubrificante.

Desses 169 isolados, 29 apresentaram habilidade em utilizar o óleo diesel, 22 com gasolina, 22 com nafta, 40 com querosene e seis com óleo lubrificante como fontes de carbono, pois atingiram a nota de crescimento sugerida (3,06) com seis dias de crescimento, sendo selecionados 53 isolados no total (INPA R267, 281, 293, 302, 307, 315, 316, 318, 325, 332, 555, 672, 689, 699, 710, 713, 720, 729, 733, 734, 741, 751, 770, 779, 781, 782, 783, 784, 791, 796, 798, 803, 969, 970, 972, 974, 976, 980, 986, 989, 995, 997, 1037, 1043, 1044, 1048, 1051, 1052, 1053, 1062, 1063, 1077 e 1081).

Esses 53 isolados testados nos cinco derivados de petróleo (óleo diesel, gasolina, querosene, nafta e óleo lubrificante), quanto a biodegradação desses utilizando a a técnica do indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol – DCPIP, quatro (INPA R302, 332, 555 e 713), apresentaram descoloração total do indicador com até seis dias de incubação, demonstrando capacidade de degradar os cinco derivados, utilizando-os como fonte de carbono.

Esse quatro isolados, bem como seus consórcios formados por estes, foram testados quanto a capacidade de produção de biosurfactantes e verificou-se que com relação a Camada Emulsificante Água em Óleo (A/O), todos os tratamentos apresentaram alta espessura, destacando o Consórcio 05, com espessura de 12,23 cm com meio SYM e 11,15 cm com meio INPA, seguidos do isolado INPA R713 (7,37 cm, meio SYM) e do Consórcio 01 (7,96 cm, meio INPA). Os dados referente aAtividade Emulsificante Óleo em água (O/A), apontaram que houve atividade moderada nos Consórcios 03 (0,74U – SYM) e 04 (0,70U – SYM) e os Consórcios 02 (0,73U – Meio INPA) e o 04 (1,04U – Meio INPA). O Consórcio 05 ainda apresentou o melhor índice de emulsificação dentre todos os islados testados, apresentando um índice final de 29,31%, com meio SYM e 27,46 com meio INPA, sugerindo com isso que os dois meios e a fonte de carbono favoreceram a utilização dos hidrocarbonetos do petróleo por esses micro-organismos.

Com relação a avaliação do crescimento microbiano em diferentes condições de solo (estéril e não estéril), observou-se no solo estéril que a maior quantidade de

colônias se deu com a diluição UFC x 10², onde os isolados testados apresentaram crescimento mais elevado com 14 dias de incubação, destacando-se os Consórcios 03 (1228 UFC x 10²), 02 (808,34 UFC x 10²) e 01 (514,22 UFC x 10²). Com relação ao solo não estéril, os tratamentos apresentaram maior número de colônias na diluição UFC x 10² e na diluição UFC x 10⁵, verificou-se que a maioria dos tratamentos apresentou um crescimento significativo com 21 dias de incubação, sendo que o Consórcio 05 (1384,67 UFC x 10⁵) apresentou seu pico de crescimento com 28 dias e o INPA R713 (1270,22) com 14 dias.

Ao adicionar as rizobactérias isoladas ou seus consórcios ao solo não estéril, contendo micro-organismos autóctones, houve um aumento significativo em todos os tratamentos, apontando dessa forma que os micro-organismos alóctones e os do meio ambiente podem ser utilizadas em conjunto num processo de biorremediação, uma vez que demonstraram capacidade de utilizarem o petróleo como fonte de carbono e boa adaptação aos nutrientes existentes no solo e no meio de cultura.

CAPÍTULO II

DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO E POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTES POR FUNGOS DO GÊNERO *Trichoderma*

DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO E POTENCIAL PARA
PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR FUNGOS DO GÊNERO *Trichoderma*

RESUMO

O processo de biodegradação de hidrocarbonetos está diretamente relacionado com a produção de biossurfactantes. As propriedades únicas dos biossurfactantes como baixa toxicidade, poder emulsificante e biodegradabilidade justificam sua ampla aplicação industrial e eventual substituição dos surfactantes sintéticos. Esse trabalho teve como objetivo selecionar fungos do gênero *Trichoderma* spp. avaliando suas capacidades de degradação e mineralização de hidrocarbonetos do petróleo. A degradação dos derivados de petróleo (gasolina, querosene, nafta, óleo diesel e óleo lubrificante) pelos 20 isolados de trichoderma foi avaliada de acordo com indicador Diclorofenol Indofenol – DCPIP, onde as cepas CFAM 768, CFAM 1143, CFAM 1161 e CFAM 1555, apresentaram degradação total em todos os derivados testados. Esses isolados e seus consórcios formados foram testados quanto a capacidade de produção de biossurfactantes utilizando o petróleo como fonte de carbono e apresentado-se estável na faixa de pH entre 6,12 a 6,50 meio BH e 5,52 a 5,90 meio INPA. Todos os tratamentos apresentaram alta atividade emulsificante, Água em Óleo (A/O) com meio BH (2,33 cm à 9,60 cm) e no meio INPA também (2,14cm a 9,58cm), com exceção do CFAM 1143 e do Consórcio 04, que apresentaram valores médios. A atividade emulsificante Óleo em água O/A, os fungos não apresentaram altas quantidades de emulsificantes, apresentando baixa atividade nos meios BH, a absorbância variou de 0,05U a 0,08U e com meio INPA foi entre 0,13U a 0,27U. Com 0 hora de incubação alguns isolados já apresentaram altos índices de emulsificação no meio BH, tendo o C03 com 12,22%, e o C02 com 9,68% no meio INPA, havendo um aumento significativo dos índices do C03 no meio BH as 48 para 23,42% e no INPA, com 0h 3,55% para 23,94% com 48h, sendo esse último o maior índice apresentado entre todos os isolados. Deste modo, considera-se que os isolados estudados apresentaram importante potencial como produtores de biossurfactantes, principalmente os Consórcios formados, apontando com isso a excelente capacidade de adaptação a fontes de carbono distintas.

Palavras-chave: Fungos; biodegradação; biossurfactantes.

6 INTRODUÇÃO

A transformação e/ou degradação de compostos tóxicos para torná-los ecologicamente inofensivos conhecida como biorremediação envolve o emprego de micro-organismos inerentes ao produto contaminante e ao meio ambiente, ou ainda lança mão de micro-organismos exógenos (JACQUES, 2010; BENNET; FAISON, 1997).

Uma grande variedade de organismos vivos sintetizam compostos com propriedades emulsificantes, denominados biossurfactantes quando produzidos por micro-organismos (BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008), os quais são polímeros, total ou parcialmente extracelulares (BICCA; FLECK; AYUB, 1999; BANAT et al., 2010) e, podem ser classificados quimicamente como glicolipídios, lipossacarídios, lipopeptídios, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros (BANAT et al., 2000).

O biossurfactante atua como redutor da tensão superficial e interfacial. O diminuição dessa tensão faz com que haja um aumento da área de contato e a quebra dos compostos na forma de micela, diminuindo a área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e a água, facilitando a dispersão dos contaminantes no ambiente e sua consequente metabolização pelos micro-organismos presentes no meio (ZILIO et al., 2012).

A busca de cepas microbianas produtoras de surfactantes visa o emprego potencial destas substâncias na biorremediação, dispersão de efluentes oleosos, na otimização e recuperação de óleos. Podendo estes compostos substituir os surfactantes químicos no futuro, principalmente nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica, produtos de limpeza industrial, produtos químicos agroindustriais e no processo de biorremediação, já que são biodegradáveis, tem baixa toxicidade, possuem estabilidade em extremos de pH, temperatura e salinidade e são produzidos a partir de fontes renováveis (CHEN et al., 2007; MAKKAR; CAMEOTRA, 1998).

A habilidade dos micro-organismos, como os fungos, de adaptar rapidamente o seu metabolismo a diversas fontes de carbono e energia é um fator essencial para sua sobrevivência. Essa flexibilidade se deve à produção de uma grande quantidade de

enzimas intra e extracelulares, capazes de degradar compostos inclusive polímeros complexos (SILVA; ESPOSITO, 2004).

Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por sintetizarem diversos metabólitos secundários, como inibidores de fitopatógenos antimicrobianos, produtores de fitohormônios e enzimas como a celulase e a amilase (PANDEY et al., 2000; CHANDRA et al., 2009). Estes vivem livremente no meio ambiente ou parasitando outras espécies de fungos, podendo ser encontrados na rizosfera de plantas, em qualquer tipo de solo em que há matéria orgânica em abundância como fonte de carbono e nitrogênio e em materiais vegetais em decomposição (HARMAN, 2006; CARRERAS-VILLASENÑOR et al., 2012), sendo colonizadores de sucesso de seus *habitats*. Esta característica deve-se à sua potente maquinaria de degradação do substrato, que é realizada através de suas enzimas extracelulares (DA SILVA PATEKOSKI e PIRES-ZOTTARELLI, 2016), tornando-os de grande interesse econômico.

Por apresentarem essas características e principalmente por raramente serem patogênicos a animais e plantas (ESPOSITO; SILVA, 1998; KREDICS et al, 2003; GROLL; WALSH, 2001), os fungos trichodermas podem se tornar uma alternativa viável para serem utilizados em no processo de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo Geral

Selecionar fungos do gênero *Trichoderma* spp. avaliando suas capacidades de degradação e mineralização de hidrocarbonetos do petróleo.

7.2. Objetivos Específicos

- a) Obter consórcios de fungos a partir de isolados de *Trichoderma* que apresentarem capacidade de utilizar derivados de petróleo como fonte de carbono, através de enriquecimentos sob condições aeróbias;
- b) Avaliar o potencial de produção de biosurfactantes pelos *Trichoderma* spp. obtidos, tendo o petróleo como única fonte de carbono;

8. METODOLOGIA

8.1 REATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

Foram testados 20 isolados de *Trichoderma* spp. que estão depositados na Coleção de Fungos da Amazônia – CFAM, pertencentes à Coleção Biológica do Instituto Leonidas e Maria Deane – Fiocruz- Amazônia (Tabela 35). Estes foram reativados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), a 28 °C por sete dias.

Tabela 35: Isolados de trichoderma

Nº de registro da cultura	Espécie
CFAM 251	<i>Trichoderma</i> sp.
CFAM 255	<i>Trichoderma virens</i>
CFAM 256	<i>Trichoderma virens</i>
CFAM 442	<i>Trichoderma koningii</i>
CFAM 767	<i>Trichoderma</i> sp.
CFAM 768	<i>Trichoderma</i> sp.
CFAM 1143	<i>Trichoderma virens</i>
CFAM 1157	<i>Trichoderma virens</i>
CFAM 1161	<i>Trichoderma virens</i>
CFAM 1172	<i>Trichoderma harzianum</i>
CFAM 1182	<i>Trichoderma</i> sp.
CFAM 1204	<i>Trichoderma reesei</i>
CFAM 1217	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
CFAM 1221	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
CFAM 1223	<i>Trichoderma atroviride</i>
CFAM 1233	<i>Trichoderma atroviride</i>
CFAM 1304	<i>Trichoderma</i> sp.
CFAM 1376	<i>Trichoderma</i> sp.
CFAM 1379	<i>Trichoderma</i> sp.
CFAM 1555	<i>Trichoderma harzianum</i>

8.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS

A potencialidade dos 20 fungos para degradar o petróleo e seus cinco derivados foi avaliada através da técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), segundo Hanson et al. (1993), modificado.

O ensaio foi realizado em tubos de ensaio previamente estéreis, contendo 7,5mL de meio INPA líquido (sem fonte de carbono), 400µL do DCPIP, 25µL de derivado de petróleo (diesel, querosene, gasolina, nafta), 100µL de suspensão de esporos padronizados em Câmara de Neubauer a 10^5 esporos.mL⁻¹. O experimento foi realizado em triplicata, com dois tratamentos controles: Controle contendo Meio Mineral INPA, indicador DCPIP e Derivado e, Controle sem derivado, contendo Meio Mineral INPA, indicador DCPIP e inóculo da suspensão de esporos. Os tubos de ensaio foram incubados a 30 °C e a cada 24 horas foi observado o desaparecimento da coloração azul do indicador DCPIP (forma oxidada) para a incolor (forma reduzida) (Mariano et al., 2007). A leitura positiva foi dada com a atribuição de notas após estes tempos, pela descoloração do DCPIP (Tabela 36).

Tabela 36: Classificação quanto a descoloração do DCPIP

Nota	Coloração
Nota 1	Coloração Total
Nota 2	Início da Descoloração
Nota 3	Descoloração Parcial
Nota 4	Descoloração Quase Total
Nota 5	Descoloração Total

Também foram retiradas a cada 24 horas, por um período de seis dias, alíquotas e submetidas a uma análise quantitativa com o uso de espectrofotometria a 595 nm. Os melhores isolados foram utilizados para os próximos testes e para a formação de consórcios em meio líquido.

8.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Os fungos foram cultivados a partir das colônias individuais em 100 mL de meio mineral INPA, acrescido de 0,1 mL de petróleo de Urucu em erlenmeyers de 250 mL. Foram utilizados como controles, frascos contendo meio INPA ou BH e petróleo. Os frascos ficaram incubados a 30° C em agitador rotatório a 65 rpm, por nove dias. Foi medido o pH inicial e final de cada amostra para verificar se houve interferência neste parâmetro químico. Foram realizados testes com cada um dos quatro isolados, bem como consórcio dos mesmos: C01 (CFAM 768, CFAM 1143, CFAM 1161, CFAM 1555); C021 (CFAM 768, CFAM 1143, CFAM 1555); C03 (CFAM 768, CFAM 1161, CFAM 1555); C04 (CFAM 768, CFAM 1143, CFAM 1161); e C05 (CFAM 1143, CFAM 1161, CFAM 1555).

8.3.1 Avaliação da atividade de emulsificação

Para a realização desse experimento foram utilizadas as suspensões dos quatro isolados de trichoderma e seus consórcios (nove tratamentos), nos meios minerais BH e INPA líquido, acrescidos de petróleo. Para cada 3,5 mL da suspensão, foram adicionados 3,5 mL de petróleo de Urucu em tubos de ensaio que foram agitados durante 2 minutos em vórtex e deixados por 48 horas em repouso. Após esse tempo, foram efetuadas medidas da altura da camada de emulsão (CE), água em óleo (AO) e da Altura Total (AT) dos líquidos no tubo expressa em cm. O índice de emulsificação foi obtido através da fórmula: $IE(\%) = (CE/AT)*100$, descrita por Cooper e Goldenberg (1987). A atividade de emulsificação óleo em água foi medida pela densidade óptica em espectrofotômetro a 610 nm de absorbância, medida em unidade (JOHNSON, 1992). A qualificação da atividade emulsificante foi realizada de acordo com Matsuura (2004), Tabela 30.

Tabela 37: Convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante

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

Fonte: Matsuura (2004)

8.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos seguiram delineamento completamente aleatorizado, com 3 repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), pelo teste F. Quando significativo, as comparações de médias foram realizadas pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT 7.0.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO, UTILIZANDO O INDICADOR REDOX – DCPIP

Os 20 isolados de trichoderma foram reativados e submetidos à teste para verificar a capacidade de biodegradação destes. A leitura desse teste foi realizada durante um período de seis dias em intervalos de 24 horas, onde foi observada a redução total do DCPIP em alguns isolados, em diferentes derivados ocorreu nos tempos de 48h e 72h. Foram utilizadas diferentes fontes de carbono como óleo diesel, gasolina, nafta, querosene e óleo lubrificante, em solução salina INPA, para a realização desse teste.

A tabela 38 mostra os resultados de descoloração visual utilizando-se a solução salina INPA, onde com 24 horas de incubação houve uma descoloração quase total na amostra contendo o isolado CFAM 767. Com 144 horas de incubação, 13 isolados apresentaram descoloração quase total e quatro descoloração total.

Tabela 38: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de *Trichoderma* spp. utilizando o indicador DCPIP e meio INPA líquido (Controle)

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
CFAM 251	1	2	3	3	4	4
CFAM 255	1	4	4	3	4	4
CFAM 256	1	5	5	3	4	4
CFAM 442	1	4	4	4	4	4
CFAM 767	4	4	4	4	4	4
CFAM 768	1	3	4	5	5	5
CFAM 1143	1	4	5	5	5	5
CFAM 1157	3	3	4	4	4	3
CFAM 1161	3	5	5	4	4	4
CFAM 1172	2	4	4	4	5	5
CFAM 1182	2	2	3	4	4	4
CFAM 1204	1	3	3	3	3	3
CFAM 1217	1	3	3	4	4	4
CFAM 1221	3	4	4	4	4	4
CFAM 1223	1	2	3	3	4	5
CFAM 1233	1	3	4	3	4	4
CFAM 1304	2	2	3	3	3	3
CFAM 1376	1	3	4	4	4	4
CFAM 1379	1	4	5	4	5	4
CFAM 1555	3	5	5	4	4	4

9.1.1 Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em gasolina

Os *Trichoderma* sp. CFAM 768 e *Trichoderma virens* CFAM 1161 apresentaram descoloração total após 48 horas de incubação e outros dois apresentaram descoloração quase total, *Trichoderma virens* CFAM 1157 e *Trichoderma harzianum* CFAM 1555. Um total de quatro isolados foram selecionados pois atingiram, até seis dias, a nota máxima de descoloração (CFAM 767, CFAM 1143, CFAM 1161 e CFAM 1555), conforme mostra a Tabela 39, para os tratamentos em meio líquido INPA e gasolina como fonte de carbono.

Tabela 39: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de *Trichoderma* spp. utilizando o indicador DCPIP, meio INPA líquido e gasolina como fonte de carbono

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
CFAM 251	1	1	2	2	4	3
CFAM 255	1	1	4	3	4	4
CFAM 256	1	2	2	3	4	4
CFAM 442	1	1	2	3	4	4
CFAM 767	1	3	5	5	4	4
CFAM 768	1	5	3	3	3	1
CFAM 1443	1	3	5	4	4	4
CFAM 1157	3	4	4	4	4	4
CFAM 1161	1	5	5	5	5	5
CFAM 1172	1	1	4	3	4	4
CFAM 1182	1	2	4	4	4	4
CFAM 1204	1	1	1	1	2	3
CFAM 1217	1	2	3	4	4	3
CFAM 1221	2	2	2	3	3	4
CFAM 1223	1	1	3	2	4	4
CFAM 1233	1	3	3	3	4	4
CFAM 1304	1	1	1	2	2	3
CFAM 1376	1	3	4	4	4	4
CFAM 1379	1	3	4	4	4	4
CFAM 1555	1	4	5	4	4	3

9.1.2 Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em nafta

Com relação a descoloração com a fonte de carbono nafta no meio INPA, com 48h incubação seis isolados já apresentaram descoloração total. Um total de 11 isolados atingiram, até seis dias, a nota máxima de descoloração (CFAM 251, CFAM 255, CFAM 256, CFAM 1172, CFAM 768, CFAM 1143, CFAM 1161, CFAM 1233, CFAM 1376, CFAM 1379 e CFAM 1555) conforme mostra a Tabela 40.

Tabela 40: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de *Trichoderma* spp. utilizando o indicador DCPIP, meio INPA líquido e nafta como fonte de carbono

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
CFAM 251	1	2	3	3	4	5
CFAM 255	1	4	4	3	5	5
CFAM 256	1	5	5	4	4	4
CFAM 442	1	1	4	3	4	4
CFAM 767	3	3	4	4	4	4
CFAM 768	1	2	4	4	4	5
CFAM 1143	1	5	5	3	4	3
CFAM 1157	3	3	4	4	4	4
CFAM 1161	3	5	5	5	5	5
CFAM 1172	1	4	4	4	5	5
CFAM 1182	1	4	4	4	4	4
CFAM 1204	1	1	2	3	3	3
CFAM 1217	1	2	3	4	4	3
CFAM 1221	2	2	3	4	4	4
CFAM 1223	1	4	4	3	4	4
CFAM 1233	1	5	5	3	4	4
CFAM 1304	1	1	2	3	3	3
CFAM 1376	1	2	3	5	4	4
CFAM 1379	1	5	5	4	5	5
CFAM 1555	2	5	5	5	5	4

9.1.3 Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em óleo diesel

Com relação a descoloração com a fonte de carbono nafta no meio INPA, com 48h incubação seis isolados já apresentaram descoloração total. Um total de 11 isolados atingiram, até seis dias, a nota máxima de descoloração (CFAM 251, CFAM 255, CFAM 256, CFAM 768, CFAM 11443, CFAM 1161, CFAM1 172, CFAM 1233, CFAM 1376, CFAM 1379 e CFAM 1555) conforme mostra a Tabela 41.

Tabela 41: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de *Trichoderma* spp. utilizando o indicador DCPIP, meio INPA líquido e óleo diesel como fonte de carbono

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
CFAM 251	1	2	2	3	4	4
CFAM 255	2	5	5	5	5	5
CFAM 256	1	5	5	5	5	5
CFAM 442	1	4	4	4	5	5
CFAM 767	4	5	5	5	5	5
CFAM 768	1	5	5	3	2	3
CFAM 1143	1	4	5	5	5	5
CFAM 1157	4	4	5	5	5	5
CFAM 1161	2	5	5	5	5	5
CFAM 1172	2	4	4	5	5	5
CFAM 1182	2	4	4	4	5	5

CFAM 1204	1	2	3	4	4	4
CFAM 1217	3	4	5	5	4	5
CFAM 1221	3	4	5	5	4	5
CFAM 1223	1	1	1	2	4	4
CFAM 1233	1	4	3	3	4	4
CFAM 1304	2	2	3	3	3	3
CFAM 1376	1	4	4	4	5	5
CFAM 1379	1	5	5	5	5	5
CFAM 1555	1	5	5	5	5	5

9.1.4 Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em querosene

A fonte de carbono querosene em meio INPA, em 48h incubação, sete isolados já apresentaram descoloração quase total e descoloração total. Com 72h de incubação mais seis isolados também atingiram a nota máxima de descoloração. Um total de 14 isolados atingiram até seis dias, a nota máxima de descoloração (CFAM 255, CFAM 256, CFAM 442, CFAM 1143, CFAM 1157, CFAM 161, CFAM 1172, CFAM 1182, CFAM 1204, CFAM 1217, CFAM 1376 e CFAM 1379), conforme mostra a Tabela 42.

Tabela 42: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de *Trichoderma* spp. utilizando o indicador DCPIP, meio INPA líquido e querosene como fonte de carbono

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
CFAM 251	1	1	1	2	4	3
CFAM 255	1	3	3	4	5	5
CFAM 256	1	3	5	5	5	5
CFAM 442	2	4	4	5	5	5
CFAM 767	3	4	5	5	5	5
CFAM 768	1	4	5	5	5	5
CFAM 1143	1	5	5	4	4	3
CFAM 1157	3	3	5	5	4	4
CFAM 1161	2	5	5	5	5	5
CFAM 1172	2	4	4	5	5	5
CFAM 1182	1	2	4	4	5	5
CFAM 1204	2	2	3	4	3	3
CFAM 1217	1	2	4	4	4	5
CFAM 1221	2	2	2	4	4	4
CFAM 1223	1	1	2	2	3	4
CFAM 1233	1	3	3	3	3	3
CFAM 1304	2	2	2	3	4	3
CFAM 1376	2	4	5	4	4	4
CFAM 1379	1	4	4	4	5	5
CFAM 1555	2	4	5	5	5	4

9.1.5 Avaliação visual relacionada a descoloração do DCPIP em óleo lubrificante

No meio INPA com a fonte de carbono óleo lubrificante, a descoloração as 24h incubação dois isolados apresentaram descoloração quase total. Com 48h de incubação mais 8 isolados também atingiram descoloração quase total e seis a nota máxima de descoloração. Um total de 14 isolados atingiram a nota máxima de descoloração, até seis dias de avaliação (CFAM 251, CFAM 255, CFAM 256, CFAM 442, CFAM 767, CFAM 768, CFAM 1143, CFAM 1157, CFAM 1161, CFAM 1221, CFAM 1223, CFAM 1233, CFAM 1379 e CFAM 1555), conforme mostra a Tabela 43.

Tabela 43: Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de *Trichoderma* spp. utilizando o indicador DCPIP, meio INPA líquido e óleo lubrificante como fonte de carbono

Isolado	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
CFAM 251	1	3	3	4	5	5
CFAM 255	3	4	5	5	5	5
CFAM 256	1	5	5	5	5	5
CFAM 442	2	4	4	4	5	5
CFAM 767	4	4	5	4	4	5
CFAM 768	1	5	5	5	5	3
CFAM 1143	1	4	5	4	4	5
CFAM 1157	4	4	4	5	5	5
CFAM 1161	3	5	5	5	5	5
CFAM 1172	2	4	4	4	4	3
CFAM 1182	1	4	4	4	4	4
CFAM 1204	1	3	3	3	3	3
CFAM 1217	1	4	4	4	4	3
CFAM 1221	3	4	4	5	5	5
CFAM 1223	1	4	4	4	5	5
CFAM 1233	1	5	5	4	5	4
CFAM 1304	2	3	3	3	4	4
CFAM 1376	2	3	4	4	4	4
CFAM 1379	1	5	5	4	5	5
CFAM 1555	3	5	5	4	5	5

A figura 23 demonstra os números de isolados e os níveis de degradação dos derivados de petróleo (óleo diesel, gasolina, querosene, nafta e óleo lubrificante), no meio INPA. Nota-se em cada derivado um pico elevado de degradação, onde a gasolina com 72h, obteve quatro isolados com descoloração total, o querosene 10, às 120h, a nafta seis isolados com 48h, o óleo diesel 14 com 144h, já o óleo lubrificante o seu maior índice de descoloração total foi obtido após 120h de incubação, com 12 isolados. Todos os derivados, com exceção da gasolina, demonstraram estabilidade de oxidação, após atingirem a descoloração total do DCPIP.

As fontes de carbono apresentam elevados índices de degradação, alcançando valores expressivos, comprovando que estes fungos têm capacidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono. O processo de degradação foi favorecido também pelos sais presentes no meio INPA. Foram selecionados quatro isolados de trichoderma que alcançaram descoloração total até seis dias (144h) de avaliação (CFAM 768, CFAM 1143, CFAM 1161 e CFAM 1555), estes foram utilizados nos testes posteriores para comprovar a capacidade de produção de biossurfactante, uma vez que se mostram capazes de se adaptarem a todas as fontes de carbono testadas.

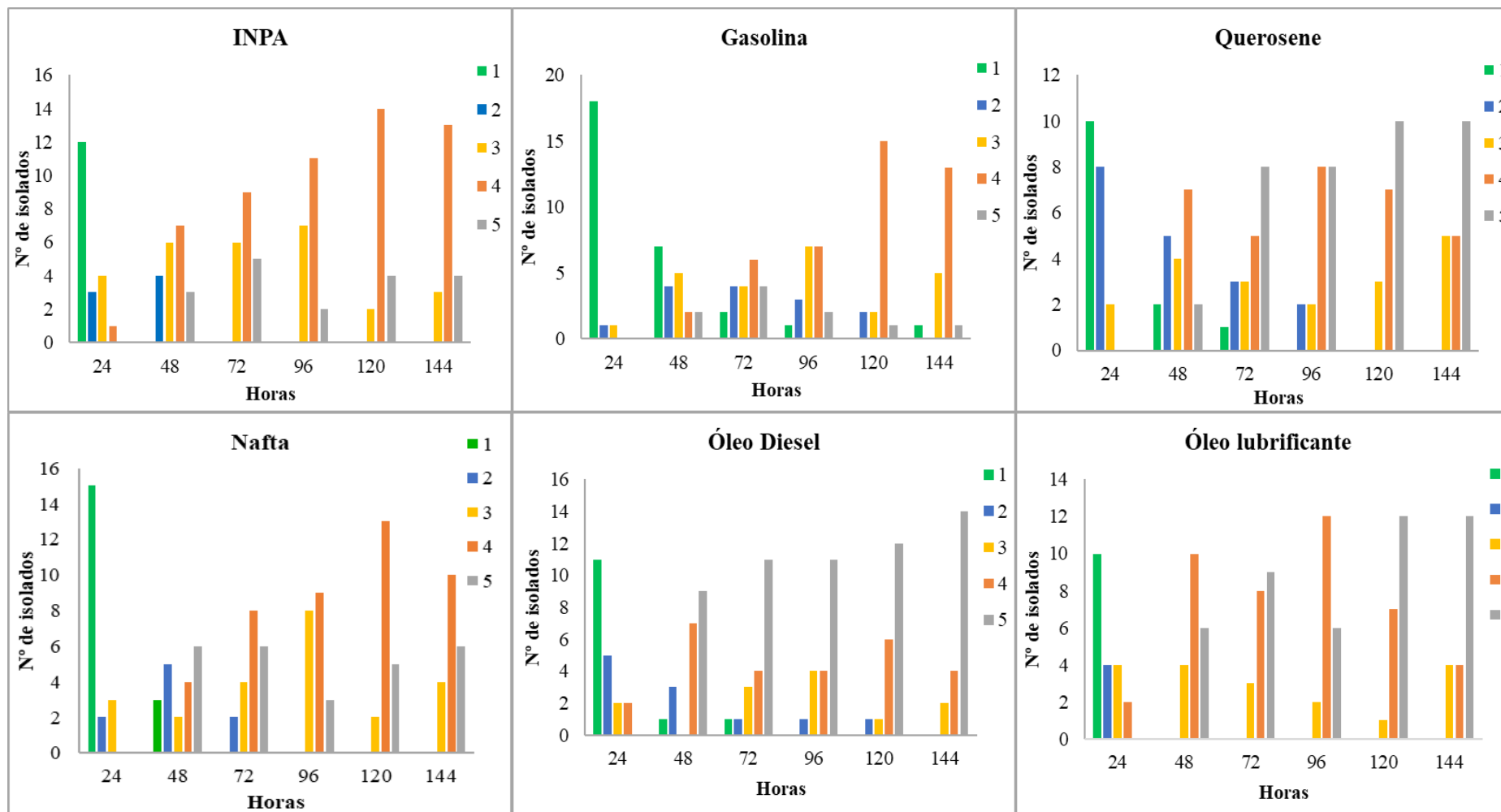


Figura 23: Biodegradação de derivados de petróleo e INPA por *Trichoderma* spp. utilizando o indicador redox DCPIP

O teste do Diclorofenol Indofenol – DCPIP visual apresentaram alta descoloração em todos os cinco derivadose, atingindo nota cinco logo após 48h, destacando-se os resultados de degradação do óleo diesel e óleo lubrificante. Maciel (2013) descreve que fungos filamentosos, como o *Penicillium*, são capazes de sobreviver em ambientes com poucos nutrientes e degradar hidrocarbonetos do querosene. Para este autor a visualização da descoloração foi possível entre 14-24h. O tempo de degradação de hidrocarbonetos depende do período de adaptação do fungo ao substrato. Behnhood et al. (2014) decreveram a capacidade de fungos *Phanerochaete chrysosporium* na degradação de óleo em água salobre. Estes autores demonstraram que a salinidade não teve qualquer efeito no crescimento fúngico em diferentes salinidades.

Assim sendo, os *Trichodermas* spp. utilizados neste trabalho foram capazes de se adaptar a fonte de carbono, demonstrando a capacidade em degradar querosene. Azevedo (2010) obteve resultados semelhantes quanto a tempo de oxidação do DCPIP, onde o *Trichoderma* apresentou descoloração com aproximadamente 50h, comprovando que o fungo possui a capacidade de utilizar o petróleo e/ou derivados como fonte de exclusiva de carbono.

9.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO

Após a seleção prévia dos isolados capazes de crescerem em meio líquido contendo derivados de petróleo como fonte de carbono, foram realizados testes onde se avaliou a atividade emulsificante, sendo os isolados cultivados em meios líquidos BH e INPA, contendo petróleo com fonte de carbono e, nos tempos 0 e 48 horas foi realizada medição de pH em todos os tratamentos, através de potenciômetro digital.

O comportamento da tensão superficial exercida pelo biossurfactante sobre o contaminante, esta diretamente conectada a faixa de pH, pois quando há uma brusca variação de pH, ocorre uma provável precipitação do biossurfactante e a elevação na tensão superficial (BARROS et al. 2007; 2008).

Na tabela 44, são apresentados os valores de pH e pode ser observado que não houve variação do pH expressiva nos tratamentos, os valores iniciais variaram ao utilizar o meio BH entre 6,26 e 6,50 e no meio INPA de 5,59 e 5,79. Após 48 horas foi observado a variação do pH final no meio BH de 6,12 e 6,47 e INPA de 5,52 e 5,90.

Tabela 44: Avaliação do pH durante o teste de avaliação do potencial de emulsificação – Meio BH e/ou INPA com petróleo e inóculo.

Tratamentos	pH			
	BH		INPA	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	6,36	6,47	5,59	5,55
CFAM 768	6,44	6,27	5,77	5,86
CFAM 1143	6,36	6,19	5,75	5,78
CFAM 1161	6,50	6,25	5,73	5,90
CFAM 1555	6,44	6,13	5,73	5,81
Consórcio 01	6,45	6,12	5,65	5,67
Consórcio 02	6,33	6,21	5,69	5,73
Consórcio 03	6,36	6,30	5,73	5,52
Consórcio 04	6,42	6,18	5,79	5,75
Consórcio 05	6,26	6,25	5,74	5,78

De acordo com Par et al. (1983), a atividade microbiológica no solo é intensamente afetada pela disponibilidade de nutrientes, pela tolerância dos micro-organismos às variações do pH, compostos tóxicos, entre outros. Alguns micro-organismos têm uma maior tolerância a variações de pH enquanto outros suportam apenas pequenas variações.

Em pH ácido, normalmente micro-organismos, como bactérias, não conseguem competir com os fungos, devido a disponibilidade de nutrientes e maior resistentência (LEAHY e COLWELL, 1990; ZILIO et al., 2012), favorecendo assim sua utilização em ambientes com condições mais ácidas.

Os resultados dos experimentos para avaliação das atividades de emulsificação para os fungos crescidos no meio com petróleo, apresentaram o total de nove tratamentos com atividade emulsificante alta do tipo água em óleo no meio BH, nos valores de 2,33 a 9,60 cm. Para o meio INPA, dois tratamentos apresentaram atividade moderada CFAM 1143 (1,37) e C04 (1,88) e, outros sete atividade alta variando entre 2,14 e 9,58 cm. As camadas emulsificantes mais espessas nos meios BH e INPA foram formadas pelo tratamento C03 (Tabela 45).

Tabela 45: Espessura da camada emulsificante (CE), de isolados de *Trichoderma* spp. usando duas soluções de sais diferentes e petróleo como fonte de carbono

Tratamentos	CE			
	BH		INPA	
	----- cm -----			
Controle	0,00	B	0,00	B
CFAM 768	3,82	A	2,42	A
CFAM 1143	2,72	A	1,37	M
CFAM 1161	2,33	A	2,97	A
CFAM 1555	2,85	A	2,14	A
C01	3,50	A	2,38	A

Tratamentos	CE			
	BH		INPA	
C02	4,76	A	3,29	A
C03	9,60	A	9,58	A
C04	4,91	A	1,88	M
C05	5,18	A	3,16	A

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

Para avaliação da atividade emulsificante, tipo óleo em água, os fungos não apresentaram quantidade altas de emulsificantes (densidade óptica), tendo sua atividade considerada baixa de acordo com a convenção adotada (Tabela 37). Dos tratamentos em meio BH e petróleo como fonte de carbono, o valor de absorbância variou de 0,05 U a 0,08 U. Ao se utilizar o meio INPA os valores foram de 0,13 U a 0,27 U, conforme observado na tabela 46.

Tabela 46: Densidade Óptica - Atividade emulsificante de estirpes de *Trichoderma* spp. usando duas soluções de sais diferentes e petróleo como fonte de carbono.

Tratamentos	Óleo em água			
	BH		INPA	
	----- U -----			
Controle	0,08	B	0,11	B
CFAM 768	0,06	B	0,21	B
CFAM 1143	0,07	B	0,18	B
CFAM 1161	0,06	B	0,16	B
CFAM 1555	0,06	B	0,18	B
C01	0,06	B	0,15	B
C02	0,08	B	0,27	B
C03	0,08	B	0,16	B
C04	0,05	B	0,13	B
C05	0,06	B	0,16	B

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

Na tabela 47 é possível observar em todas as emulsões testadas, no período de 0 hora os melhores valores foram observados nos tratamentos C03 (BH) e C02 (INPA), 12,22 e 9,68, respectivamente. E as 48h no tratamento C03 nos dois meios com a fonte de carbono petróleo (23,42 e 23,94%). A diferença no comportamento dos tratamentos com relação ao meio de cultura poderia sugerir uma maior estabilidade da emulsão formada pelo biossurfactante no meio BH, com exceção do tratamento C02, as 0h, o qual apresentou significativa vantagem no meio INPA. Os tratamentos CFAM 1161, CFAM 1555 e C03, nos meios estudados não diferem entre si, as 48h.

Em relação à estabilidade, os tratamentos CFAM 1161 no meio BH e, C02 no meio INPA apresentaram uma redução percentual nas emulsões, as 48h quando comparado ao período inicial, de 8,57 para 5,85% e 9,68 para 8,39%, respectivamente (Figuras 25 e 26). Observa-se que os maiores índices de emulsão foram apresentados pelo C03 as 48h nos dois meios testados, sendo que houve um aumento significativo, relativo aos tempos testados no dois meios (BH – 12,22% com 0h para 23,42% com 48h e no INPA - 3,55% com 0h para 23,94% com 48h).

Quando comparada cada estirpe testada com seus consórcios formados, verifica-se que os maiores índices de emulsão foram apresentados pelos consórcios, sendo o Consórcio 03 o mais eficaz. Isso indica que os consórcios formados e testados demonstraram maior capacidade de degradação e utilização dos hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono quando comparados as estirpes, apontando com isso, potencial para serem utilizados num processo de biorremediação de petróleo e seus derivados.

Tabela 47: Índice de Emulsão de isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	BH		INPA	
		% Inicial		
Controle	0,00	fA	0,00	eA
CFAM 768	5,06	dA	2,50	cB
CFAM 1143	5,75	dA	3,33	bB
CFAM 1161	8,57	bA	1,48	dB
CFAM 1555	5,12	dA	1,01	dB
C01	8,73	bA	1,79	dB
C02	7,36	cB	9,68	aA
C03	12,22	aA	3,55	bB
C04	5,86	dA	1,58	dB
C05	4,03	eA	1,14	dB
		% Final		
Controle	0,00	fA	0,00	eA
CFAM 768	9,70	cA	6,44	cB
CFAM 1143	6,69	eA	3,24	dB
CFAM 1161	5,85	eA	7,36	bA
CFAM 1555	7,98	dA	6,57	cA
C01	10,40	cA	7,57	bB
C02	11,66	bA	8,39	bB
C03	23,42	aA	23,94	aA
C04	11,81	bA	4,72	cB
C05	12,82	bA	8,22	bB

OBS. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade), considerando as minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas.

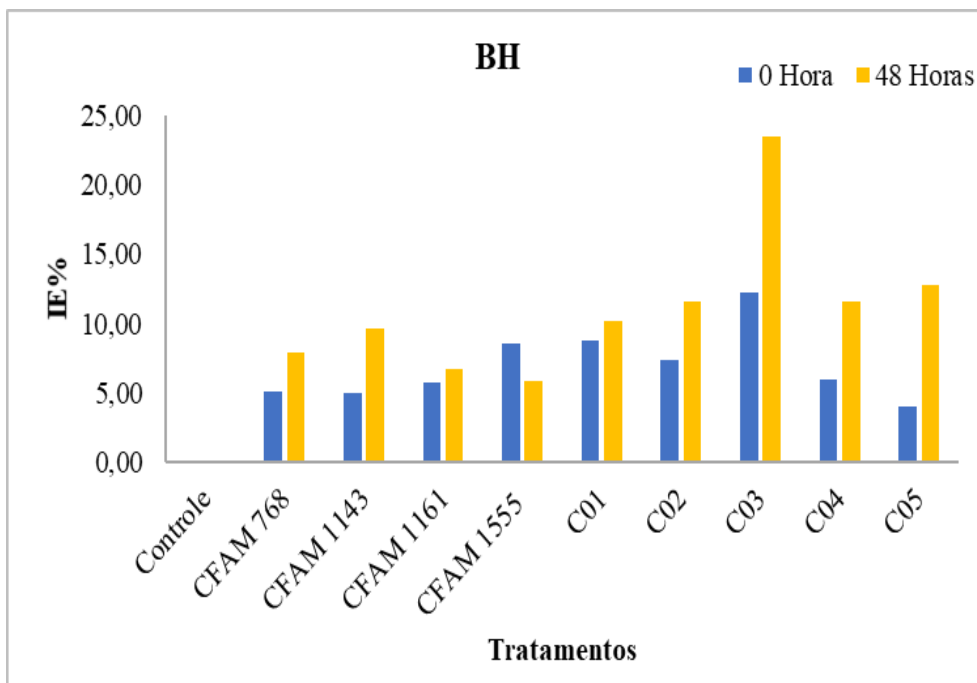


Figura 24: : Índice de Emulsificação (IE) de diferentes tratamentos em Meio BH com petróleo como fonte de carbono, com biossurfactante de trichoderma

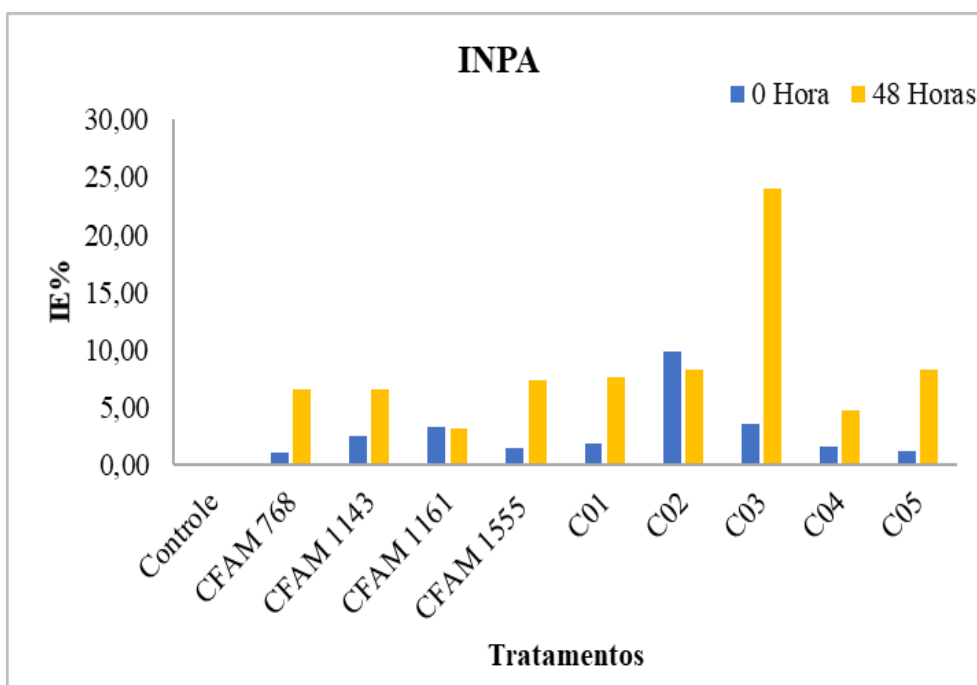


Figura 25: Índice de Emulsificação (IE) de diferentes tratamentos em Meio INPA com petróleo como fonte de carbono, com biossurfactante de trichoderma

Os isolados de trichoderma testados demonstram melhores resultados quanto a produção de biosurfactantes do que alguns outros micro-organismos citados na literatura. Matsuura (2004), ao testar a produção de biosurfactantes por micro-organismos provenientes da região amazônica, encontrou seis linhagens de leveduras com atividades emulsificantes significativas do tipo água em óleo, com a produção de uma camada emulsificante de 2,3 cm de altura de água em óleo.

Neves (2006) obteve atividade de emulsificação de óleo em água para a linhagem *Bacillus badius*, no valor de 0,018 em seis dias de estudo, utilizando meio de cultura para produção de biosurfactante, adicionado de uma mistura de Hidrocarbonetos (Naftaleno, Antraceno, Fluoreno e Pireno). E Dias (2007) estudando consórcios microbianos na presença de hidrocarbonetos lineares e aromáticos, encontrou valores de emulsão do tipo óleo em água de 0,890 e 0,13 U.

Considerando as características apresentadas pelos biosurfactantes produzidos neste trabalho, pode-se dizer que os mesmos são adequados para aplicação em biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados, uma vez que apresentam-se estáveis.

CONCLUSÕES

Dos 20 isolados de trichoderma testados quanto a capacidade de degradação em meio INPA, contendo derivados de petróleo como fonte de carbono, 04 apresentaram descoloração total em todos os derivados testados (gasolina, querosene, nafta, óleo diesel e óleo lubrificante), apontando com isso a excelente capacidade de adaptação a fontes de carbono distintas.

Com relação a atividade emulsificante apresentada por esses isolados ou seus consórcios, observou-se que não houve variação expressiva nos valores do pH dos tratamentos e que esses valores variaram entre os meios (BH 6,26 a 6,50 e INPA 5,59 a 5,79) às 24 horas e com 48 horas BH com 6,12 a 6,47 e INPA 5,52 a 5,90, sendo que o INPA possui maior acidez se comparado ao BH que se apresentou básico.

Todos os tratamentos apresentaram alta atividade emulsificante com meio BH (2,33 cm à 9,60 cm) e no meio INPA com exceção dos tratamentos CFAM 1143 e do consórcio 04 que apresentaram camadas emulsificantes médias, os demais apresentaram

altas camadas variando entre 2,14 cm à 9,58 cm. Nenhum tratamento apresentou camada emulsificante baixa.

Alguns isolados apresentaram alto índice de emulsão com 0 horas de incubação no meio BH, tendo o C03 com 12,22%, e o C02 com 9,68% no meio INPA. Houve um aumento significativo dos índices do C03 no meio BH as 0h com 12,22% e com 48h, apresentou 23,42% e no INPA, com 0h 3,55% e com 48h, com 23,94%, sendo esse último o maior índice apresentado entre todos os isolados.

Os Consórcios (C01, 02, 03, 04 e 05) formados das estirpes apresentaram os maiores índices de emulsão, nos dois tempos e nos dois meios avaliados, indicando que estes podem ser utilizados num processo de biorremediação, por apresentarem maior capacidade de degradação dos hidrocarbonetos do petróleo, ao utilizarem estes como fonte de carbono, destacando o Consórcio 03, pois se mostrou mais eficaz que os demais ao apresentar os maiores índices de emulsão.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple growth promoting activities. **Microbiol Res.**, v. 163, p. 173–181, 2008.

ADEBIYI, K. A. Bioremediation of Heavy Metals in the Soil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Trichoderma harzianum* Using *Solanum lycopersicum* as Test Plant. **Asian Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. v.2, n.2, p. 1-13, 2017.

ALVES, L. M. C.; SOUZE, J. A. M.; VARANI, A. M.; LEMOS, E. G. M. The family Rhizobiaceae. **The prokaryotes**, v. 5 p. 419-437, 2014.

AL-WAHAIBI, Yahya et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 114, p. 324 – 33, 2014.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e seus Derivados. **Eclética Química**. São Paulo, v. 35, p. 3, p. 17-43, 2010.

ANP, 2016, *Boletim da produção de petróleo e gás natural até maio de 2016*. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=69299&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1423061494715>. Acesso em: Julho de 2016.

APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION); **Standard Methods the Examination of Water and Wastewater**–19th edition, 1995.

ASH, C., PRIEST, F. G. & COLLINS, M. D. *Paenibacillus* gen. nov. and *Paenibacillus polymyxa* comb. nov. In. Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB, List no. 51. **Int J Syst Bacteriol**, v. 44, p. 852, 1994.

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

AZEVEDO, L. M. L. **Potencial de degradação de petróleo por fungos isolados de sedimentos de manguezal de impactado**. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, PE. 2010.

BAKER, K. H.; S. HERSON. **Bioremediation**. New York. McGraw-Hill, inc. 375p. 1994.

BANAT, Ibrahim. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.87, n. 2, p.427-444, 2010.

BANAT, Ibrahim. M. et al. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, n. 5, p. 495-508, 2000.

BANFORTH, S.M.; SINGLETON, I. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Current Knowledge and Future Directions. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 80 (7): 723-736, 2005.

BARROS, J. Y.; MELO, F. V.; DIONÍSIO, A. J.; OLIVEIRA, B. E.; CARON, L.; KUMMER, L.; AZEVEDO, R. C. J.; SOUZA, P. C. L. Indicadores de Qualidade de solos em Área de Mineração e Metalurgia de Chumbo. I – Microrganismos. **Rev. Bras. Ciênc. Solo** vol. 34 no.4 Viçosa July/Aug. 2010.

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

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

BEAZLEY MJ, MARTINEZ RJ, RAJAN S, et al. Microbial Community Analysis of a Coastal Salt Marsh Affected by the *Deepwater Horizon* Oil Spill. Liles MR, ed. *PLoS ONE*. v. 7, n. 7, 2012.

BEHNOOD, M.; NASERNEJAD, B.; NIKAZAR, M. Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 20, n. 4, p. 1879-1885, 2014.

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

BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., GAYLARDE, C.C., 2008. Biosurfactantes. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. In: Melo, I.S., Ghini, R., Silva, C.M.M.S., Vieira, R.F., Fay, E.F., Abakerli, R.B. (Eds.) *Microbiologia Ambiental*, second ed., vol. 1, pp. 151e184.

BERGE, O.; GUINEBRETIERE, M-H.; ACHOUAK, W.; NORMAND, P.; HEULIN, T. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 607–616, 2002.

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

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Rev. Microbiol.* V. 30, n. 3, p. 231-236, São Paulo, 1999.

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**. v.69, n.11 ,p. 2357-2372, 1991.

BRITO, L. L. **Degradação de Petróleo por Isolados de Rizóbios da Amazônia**. 98 f. Disserta – Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, AM, 2013.

BRUNETTA, Juliana M. F. C.; et al. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de *Pinus taeda*. **Revista Árvore**, v.34, n.3, p.399-406, 2010.

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

CARRERAS-VILLASENÖR, Nohemí et al. Trichoderma: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology* (2012), 158, 3–16.

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

CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; VAINSTEIN, M. H.; CAMARGO, F. A. O.; PERALBA, M. C. R.; BENTO, F. M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology** Vol. 102, 11003–11010, 2011.

CETESB – Companhia de Tecnologia Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo Acidentes ambientais. Disponível em <http://cetesb.sp.gov.br>. Acesso: Abril de 2018.

CHAGAS JÚNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.A.; OLIVEIRA, A.N.; ANDRÉ, L.W. Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 39, p. 489-494, 2009.

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

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P.K.; KUMAR, H.; SANGWAN, R.S. Cellulase production by six Trichoderma spp fermented on medicinal plant process. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v.36, p. 605-609, 2009.

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

CHEN, Ying-Li e LI, Qian-Zhang. Prediction of apoptosis protein subcellular location using improved hybrid approach and pseudo-amino acid composition. *Journal of Theoretical Biology*, v. 248, issue 2, 21, P. 377-381. September 2007.

COCAIGN, A.; BUI, L-C.; SALAR, P.; TONG, L C. H.; BUSI, F.; LAMOURI, A.; MOUGIN, C.; LIMA, F. R.; DPRET, J. M.; DAIROU, J. Biotransformation of *Trichoderma* spp. and Their Tolerance to Aromatic Amines, a Major Class of Pollutants. *Jornal List Appl Environ Microbiol.* v.79, n.15, p. 4719–4726, 2013.

COELHO, F. J. R. C.; SOUSA, S.; SANTOS, L.; SANTOS, A. L.; ALMEIDA, A.; GOMES, N. C. M.; CUNHA, A. PAH Degrading Bacteria in an Estuarine System. **Biological Responses to Contaminants**, p. 77–87, 2010.

COHEN, M. A, Water pollution from oil spills. In: (Ed.). Encyclopedia of Energy, Natural Resource, and Environmental Economics. ed. 1: Elsevier Science, v3 p.p. 121-126.2013. ISBN 9780123750679.

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

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

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

CRUZ, F. G.; MARSAIOLE, J. A. Processos Naturais de Biodegradação do Petróleo em Reservatórios. **Quim. Nova**, Vol. 35, No. 8, 1628-1634, 2012.

CRUZ, J.M., LOPES, P.R.M., TAMADA, I. S., MONTAGNOLLI, R.N., BIDOIA, E. D. Biodegradação e Fitotoxicidade de Biodiesel, Diesel e Petróleo em Solo. In: 8th

LATIN AMERICAN BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION SYMPOSIUM, 2013, Porto Alegre. **Anais**. 2014. 70-73

CRUZ, J. M. Avaliação ecotoxicológica da biodegradação utilizando inóculo enriquecido com *Bacillus subtilis* em solo contaminado com petróleo, diesel e biodiesel. 2013. 68f. Dissertação de mestrado Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2013.

CUMMINGS, S.P. The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in low input and organic cultivation of graminaceous crops; potential and problems. *Environ Biotechnol* 5(2):43–50, 2009.

DA SILVA PATEKOSKI, Katya; PIRES-ZOTTARELLI, Carmen Lidia Amorim. Efeito de trichoderma SPP no controle de podridão de raiz causada por *pythium aphanidermatum* e na promoção de crescimento da alface hidropônica. **Acta Scientiae Biological Research**, v. 1, n. 1, 2016.

DASGUPTA, Debdeep; GHOSH, Ritabrata; SENGUPTA, Tapas K. Biofilm-mediated enhanced crude oil degradation by newly isolated *Pseudomonas* species. **ISRN biotechnology**, v. 2013, 2013.

DECESARO, Andressa et al. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Quim. Nova**, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.

DELADONA, P. S. Produção de glicosil hidrolases por *Trichoderma harzianum* para o processo de sacarificação da biomassa vegetal. Tese de doutorado Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 149 f. 2015.

DE MORAIS, E. B. **Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através de sistema de biopilhas**. 73 f. Dissertação (Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro/SP. 2005.

DE NORONHA, Iruam Rodrigues; FERREIRA, Maria Inês Paes; PINTO, Augusto Eduardo Miranda. Riscos e danos ambientais associados às atividades da cadeia

produtiva do petróleo: instrumentos de comando e controle para mitigação dos impactos de vazamentos de óleo. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 7, n. 1, p. 596-613, 2018.

DETONI, S.; GILMARA, I. 5º Relatório: Técnicas de Coloração de Gram. Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia/ Universidade Federal do Amazonas. 2011.

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

DIAS, F.G.. **Utilização de consorcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo**. Tese (Doutorado em Engenharia dos Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo Campinas, 106f. 2007.

ESPOSITO E.; DA SILVA M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Crit Rev Microbiol.**, v. 24, n. 2, p. 89-98, 1998.

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

FARIAS, T.; ALVES, E. COSTA, I. SRAIVA, L.; BARRETO, R.; LIMA, S. M. M. Utilização de Fungos na Degradação de Compostos Fenólicos de Derivados de Petróleo VII CONNEPI. Isbn: 978-85-62830-10-5. 2012.

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

FONTES, L. C. **Isolamento e seleção de fungos com potencial para biorremediação a partir de ambientes aquáticos com histórico de contaminação por metais pesados**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

FERREIRA, P.A.A. **Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio em feijoeiro e sua tolerância à acidez e alumínio “in vitro”**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, p. 64, 2008.

FERRADJI, Fatma Zohra et al. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 86, p. 300-308, 2014.

FLORENTINO, LIGIANE A. et al. Diversidade e potencial de utilização dos rizóbios isolados de nódulos de *Gliricidia sepium*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 320-338, 2014.

FURLAN, B. Caracterização do gene *recA* de isolados do gênero *Burkholderia* e identificação do potencial de biodegradação de compostos aromáticos. 2011. 111f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

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

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian J. Microbiol.**, v. 41, p. 107-117, 1995.

GOVINDASAMY, V.; SENTHILKUMAR, M.; MAGHESHWARAN, V.; KUMAR, U.; BOSE, P.; SHARMA, V.; ANNAPURNA, K.; Editora Springer. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for Sustainable Agriculture. Plant Growth and Health Promoting Bacteria; **Microbiology Monographs**, v.18, p. 333-364; 2011.

GROLL A.H., WALSH T.J. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. **Clin Microbiol Infect.** v. 7, n. 2, p. 8-24. 2001

GU, L.; BAI, Z.; BO JIN, B.; ZHANG, J.; LI W.; ZHUANG, G.; ZHANG, H. Production of a newly isolated *Paenibacillus polymyxa* biocontrol agent using monosodium glutamate wastewater and potato wastewater. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 9, p.1407–1412, 2010.

HAMZAH A., ZARIN M.A., HAMID A.A., et al. Optimal Physical and Nutrient Parameters for Growth of *Trichoderma virens* UKMP-1 M for Heavy Crude Oil Degradation. **Sains Malaysiana**. 2012;41:71–79.

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

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

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40: 667-672, 2005.

HARMAN, G.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, v. 2, n. 1, p. 43-56, jan. 2004.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, p. 190-194, 2006.

HARAYAMA, S; KISHIRA, H; KASAI, Y; SHUTSUBO, K. Petroleum biodegradation in marine environments. **J. Molec. Microbiol. Biotechnol**, v.1, n.1, p. 63-70, 1999.

HILDEBRANDT, Ulrich et al. The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 2, p. 258-267, 2006.

HOON, C.; PARK, S-Y.; RYU, C-M.; KIM, J. F.; PARK, S-H.; PARK, C. S. Diversity of Root-Associated *Paenibacillus* spp. in Winter Crops from the Southern Part of Korea. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 15, n. 6, p. 1286–1298, 2005.

HUANG, X-D.; EL-ALAWI, Y.; GURSKA, J.; GLICK, B.R.; GREENBERG, B.M. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (HTPs) from soils. *Microchem. J.*, 81:139- 147, 2005.

HUGHES, J.B.; HELLMANN, J.J; RICKETTS, T.H.; BOHANNAN, B.J.M. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67 p. 4399-4406, 2001.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro, p. 187-294. In: Vargas, M.A.T.; Hungria, M., (eds). **Biologia dos Solos do Cerrado**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 1997.

HWANG, I. T.; LIM, H. K.; SONG, H. Y.; CHO, S. J.; CHANG, J-S.; PARK, N-J. Cloning and characterization of a xylanase, KRICT PX1 from the strain *Paenibacillus* sp. HPL-001. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 594–601, 2010.

IARC: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Carcinogenicity evaluation of BTEX, 71:829, 2006. Disponível em: <http://www.iarc.fr/>. Acesso em: 31 Jul. 2016.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagonista e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas **Ciência Rural** ., v.40, n.2, p. 310-317, fev 2010. disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n2/a468cr1426.pdf>

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO; F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JARAMILLO, P.M.D.; GUIMARAES, A.A.; FLORENTINO, L.A.; SILVA, K.B.; NOBREGA, R.S.A. E MOREIRA, F.M.S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populationstrapped from soils underagroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, vol. 70, n. 6, p. 397-404, 2013.

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

KAMPFEER, P.; NEEF, A.; SALKINOJA-SALONEN, M. S.; BUSSE, H. J.; *Chelatobacter heintzii* (Auling et al. 1993) is a later subjective synonym of *Aminobacter aminovorans* (Urakami et al. 1992). **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 52, p. 835-839, 2002.

KATA, M.F., HUSSAINI, A.A.S.A., ZULKHARNAIN, A., ROSLAN, H.A. Bioremediation of Crude Oil by Different Fungal Genera. **Asian Journal of Plant Biology**.V.2, N.1, p. 11-18, 2014.

KO, C-H.; TSAI, C-H.; LIN, P-H.; CHANG, K-C.; TU, J.; WANG, Y-N.; YANG, C-Y. Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7882–7888, 2010.

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

KOSTKA JE, PRAKASH O, OVERHOLT WA, et al. Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by

the Deepwater Horizon Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 77, n. 22, p. 7962-7974, 2011.

KREDICS, László et al. Influence of Environmental Parameters on Trichoderma Strains with Biocontrol Potential. **Food Technol. Biotechnol.** 41 (1) 37–42, 2003.

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

KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. Genus *Rhizobium*, a highly divergent genus in a revised family, the Rhizobiaceae. In: Bergey's **Manual of Systematic Bacteriology**, George Garrity (Ed.), Springer, 2 ed., v.2, p. 324-340, 2005.

LAI, C. C.; HUANG, Y. C.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, p. 609-614, 2009.

LAL, S.; TABACCHIONI, S. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. **Indian J Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 2–10, 2009.

LARIK, I. A. et al. *Stenotrophomonas maltophilia* strain 5DMD: an efficient biosurfactant-producing bacterium for biodegradation of diesel oil and used engine oil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1-10, 2018.

LEAHY, Joseph. G e COLWELL, Rita. R.; **MICROBIOL. REV.** 1990, 54, 305; CHAINEAU, C. H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY,E.; OUDUT, J.; *Sci. Total Environ.* 227-237. 1990.

LEAHY, Joseph. G e COLWELL, Rita. R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 3, Sept. 1990Sept. 1990.

LEELAVATHI M. S.; VANI, L.; REENA, P. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. **International Journal of Current Microbiology and Appeliend Science**. n.3, v.1, p. 96-103, 2014.

LIMA, J. M. S. **Avaliação do potencial de produção de biossurfactantes por micro-organismos endofíticos e epifíticos de macrófitas aquáticas coletadas em afluentes**

do rio negro contaminados por petróleo. 119 f. Tese (Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte). Universidade Federal do Amazonas e Universidade Estadual do Amazonas Manaus/ AM. 2016.

LIMA, M. PRIMAZ, A. L.; COSTA, J. A. V.; COLLA, M. L. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação de resíduos de petróleo e óleo vegetal. XVI Mostra de Iniciação Científica, Universidade de Passo Fundo. v.1, p. 1-2. 2006.

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

LOPES, P.R.M., Oliveira, L.M., Montagnolli, R.N., Tamada, I.S., Cruz, J.M., Contiero, J., Bidoia, E.D. Método colorimétrico aplicado à degradação de óleo lubrificante por *Pseudomonas aeruginosa* e biossurfactantes. **8th Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium**, Porto Alegre : Evangraf, 136p, 2014.

LORENTZ, R.H. **Seleção de isolados de Paenabacillus sp. com atividade enzimática e antimicrobiana.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia. Dissertação, Porto Alegre, 2005.

LU, F.; LU, Z.; BIE, X.; YAO, Z.; WANG, Y.; LU, Y.; GUO, Y. Purification and characterization of a novel anticoagulant and fibrinolytic enzyme produced by endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Thrombosis Research*, v.126, n. 5, p.349 e 355, 2010.

LUDWIG, JULIANE; MOURA, ANDRÉA B.; GOMES, CESAR B. Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 1-5, 2013.

MACIEL, C. C. S.; SOUZA, C.S.; SILVA, P. A.; SOUSA, M. F. V. R.; GUSMÃO, N. B. Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação. *Brazilian Journal of Biosciences*. N.1, v. 11, p. 39-42, 2013.

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

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

MARIANO A. P., TOMASELLA R. C., OLIVEIRA L. M. DE, CONTIERO J.; ANGELIS D. DE F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 9, p.1323-1328, 2008.

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

MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 58, p. 200-214, 2008.

MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. p. 74, 2005.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 20, p. 48–52, 1998.

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

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R.; BORGE, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 529-535, Maringá, 2009.

MISHARA, S.; JYOT, J.; KUHAD, R. C.; LAL, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ biorremediation of oily-sludge-contaminated soil. **Applied Environmental Microbiology**. Washington, v.67, n.4, p.1675-1681, 2001.

NADIM, F.; HOAG, G. E.; LIU, S.; CARLEY, R. J.; ZACK, P. Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v.26, p. 169-178, 1999.

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

NONG, G.; RICE, J. D.; CHOW, V.; PRESTON, J. F. Aldouronate Utilization in *Paenibacillus* sp. Strain JDR-2: Physiological and Enzymatic Evidence for Coupling of Extracellular Depolymerization and Intracellular Metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 13, p. 4410–4418, 2009.

OLIVEIRA, J.P. **Investigação da variabilidade genética em rizóbios que nodulam o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes centros de diversidade.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. p. 97, 2009.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia de polimerase. Embrapa. São Carlos: São Paulo, 2007

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

OTSUAKA, A. A. Avaliação da biodegradação de tolueno por fungos isolados de ambientes associados ao petróleo. Monografia. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo. 81f. 2015.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugar-cane bagasse. *Bioresour Technol.*, v. 74, p. 69-80, 2000.

PAR, J. F.; SIKORA, L. J.; BURGE, W. D. Factors affecting the degradation and inactivation of waste constituents in soil. In *Land Treatment of Hazardous Wastes* Parr, J.F., Kla, J.M. (eds). Park Ridge, NJ, Noyes Data Corp., cap. 20, p. 321-337, 1983.

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

PESANTEZ, M.; CASTRO, R. Potencial de cepas de *Trichoderma* spp. para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo. *Biotecnología Vegetal*. v.16, n.4, p. 251 – 256, 2016.

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

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

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

RON, E.Z., ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 249-252, 2002.

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

SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; NEVES, M.C.; RUMJANEK, N.G.; BORGES, R.V.; FREITAS, A.D.S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 249-256, 2007.

SAVAGE, K. N.; KRUMHOLZ, L. R.; GIEG, L. M.; PARISI, V. X.; SUFLITA, J. M.; ALLEN, J.; PHILP, R. P. & ELSHAHED, M. S. Biodegradation of low-molecular-weight alkanes under mesophilic, sulfate-reducing conditions: metabolic intermediates and community patterns. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 72, p. 485–495, 2010.

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

SAWADOGO, A., OTOIDOBIGA, H. C., KABORÉ, A., SAWADOGO, J. B., TRAORÉ, S. A., DIANOU, D. Optimization of Hydrocarbons Biodegradation by Bacterial Strains Isolated from Wastewaters in Ouagadougou, Burkina Faso: Case Study of Diesel and Used Lubricating Oils. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*. v.3, p. 652-657, 2015.

SCHÄFFER, A. A.; ARAVIND, L.; MADDEN, T. L.; SHAVIRIN, S.; SPOUGE, J. L.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V.; ALTSCHUL, S. F. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements *Nucl. Acids Res.* (2001) 29 (14): 2994-3005 doi:10.1093/nar/29.14.2994

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

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J. G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in Rhizobium Research. **Crit Rev Plant Sci**, v. 21, p. 323-378, 2002.

SHENTU, X.; ZHAN, X.; MA, Z.; YU, X.; ZHANG, C. Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 248-254, 2014.

SHUKLA, D.; VANKAR, P. S. Chapter 30 - Role of *Trichoderma* Species in Bioremediation Process: Biosorption Studies on Hexavalent Chromium. **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. V., n., p. 405-412.

SILVA, M.; ESPOSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: Espósito, E.; Azevedo, J.L. (orgs). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, p. 337 –378, 2004.

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

SOUZA, K. C.; TANABE, A. K.R.; SABONARO, D. Z.; SMITH, W. Biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos utilizando fungos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 14, n. 2, p. 43-52, 2016.

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

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

SPAIN, J. C.; PRITCHARD, P. H.; BOURQUIN, A. W. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater

environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 40, n. 4, p.726-734, 1980.

SPERB, João G.C. et al. Avaliação qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. **Engevista**, v. 17, n. 3, p. 385-397, 2015.

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

SRIVASTAVA, M.; SHAHID, M.; PANDEY, S.; SINGH, A.; KUMAR, V.; GUPTA, S.; MAURYA, M. *Trichoderma* genome to genomics: a review. **Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics**, v. 5, n. 3, p. 1-4, 2014.

TABATABAEE, A.; ASSADI, M. M.; NOOHI, A. A.; SAJADIAN, V. A. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. **Iranian J Env Health Sci Eng.** v. 2, n. 1, p. 6-12, 2005.

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

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

TYAGY, M.; DA FONSECA, M. M. R. e DE CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, v. 22, n. 2, p. 231-241, 2011.

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

VESSEY, J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586, 2003.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; WOO, S. L.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; RUOCCO, M.; LANZUISE, S.; MAGANIELLO, G.; LORITO, M. Trichoderma Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. *The Open Mycology Journal*. v.8, p. 127-139, 2014.

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

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

WANG, L.; TANG Y.; WANG, S.; LIU, R. L.; LIU M. Z. ZHANG, Y.; LIANG, F. L.; FENG, L. Isolation and characterization of novel thermophilic degrading long-chain n-alkanes. *Extremophiles*. v. 10, p. 347 – 356, 2006.

WEBER, Bruna, e SANTOS, Antenor. "Utilização da Biorremediação como Ferramenta para o controle da Degradação Ambiental Causada pelo Petróleo e seus Derivados." *Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia* v.10, n.1, p. 114 – 133, 2013.

WEIR, B.S. **The current taxonomy of rhizobia**. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.>, Last updated: 10 April, 2012.

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

WENTZEL, A.; ELLINGSEN, T. E.; KOTLAR, H-K.; ZOTCHEV, S. B.; THRONE-HOLST, M. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, p. 1209-1221, 2007.

WEON, H. Y.; LEE, C. M.; HONG, S. B.; KIM, B. Y.; YOO, S. H.; KWON, S. W.; GO, S. J. *Kaistia soli* sp. Nov., isolated from a wetland in Korea. **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, vol. 58, p. 1522-1524, 2008.

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

ZEHNDER, G. W.; MURPHY, J. F.; SIKORA, E. J.; KLOEPPER, J. W. Application of rhizobacteria for induced resistance, **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 107, p. 39-50, 2001.

ZHUANG, X.; CHEN, J., SHIM, H.; BAI, Z. New advances in plant growthpromoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ. Intern.* 33, p.406-413, 2007.

ZILIO, R. L. et al. BBR - **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.2, p. 39-47, 2012.

ANEXOS

Tabela A. Resumo das análises de variação conjuntas contendo as fontes de variação (FV) graus de liberdade (GL) e valores dos quadrados médios com respectivas

significâncias pelo teste F de crescimento celular (10^5 UFC.mL⁻¹) em meio líquido contendo manitol como fonte de carbono

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Trat-a(Ta)	52	1174092.71488	22578.70606	200.2779 **
Resíduo-a	106	11950.11111	112.73690	
Parcelas	158	1186042.82600		
Trat-b(Tb)	5	970109.56813	194021.91363	2048.3887 **
Int. TaxTb	260	3492260.54298	13431.77132	141.8061 **
Resíduo-b	530	50201.22222	94.71929	
Total	953	5698614.15933		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Tabela B. Resumo das análises de variação conjuntas contendo as fontes de variação (FV) graus de liberdade (GL) e valores dos quadrados médios com respectivas significâncias pelo teste F de crescimento celular (10^5 UFC.mL⁻¹) em meio líquido contendo óleo diesel como fonte de carbono

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Trat-a(Ta)	52	1521764.39832	29264.69997	89.7569 **
Resíduo-a	106	34560.66667	326.04403	
Parcelas	158	1556325.06499		
Trat-b(Tb)	5	187466.03040	37493.20608	162.4675 **
Int. TaxTb	260	3224729.80294	12402.80693	53.7445 **
Resíduo-b	530	122310.00000	230.77358	
Total	953	5090830.89832		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Tabela C. Resumo das análises de variação conjuntas contendo as fontes de variação (FV) graus de liberdade (GL) e valores dos quadrados médios com respectivas significâncias pelo teste F de crescimento celular (10^5 UFC.mL⁻¹) em meio líquido contendo gasolina como fonte de carbono

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Trat-a(Ta)	52	2355889.04822	45305.55862	241.3773 **
Resíduo-a	106	19895.77778	187.69602	
Parcelas	158	2375784.82600		
Trat-b(Tb)	5	965466.44864	193093.28973	1344.5155 **
Int. TaxTb	260	3330252.66247	12808.66409	89.1872 **
Resíduo-b	530	76116.22222	143.61551	
Total	953	6747620.15933		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Tabela D. Resumo das análises de variação conjuntas contendo as fontes de variação (FV) graus de liberdade (GL) e valores dos quadrados médios com respectivas significâncias pelo teste F de crescimento celular (10^5 UFC.mL⁻¹) em meio líquido contendo querosene como fonte de carbono

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Trat-a(Ta)	52	1174092.71488	22578.70606	200.2779 **
Resíduo-a	106	11950.11111	112.73690	
Parcelas	158	1186042.82600		
Trat-b(Tb)	5	970109.56813	194021.91363	2048.3887 **
Int. TaxTb	260	3492260.54298	13431.77132	141.8061 **
Resíduo-b	530	50201.22222	94.71929	
Total	953	5698614.15933		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Tabela E. Resumo das análises de variação conjuntas contendo as fontes de variação (FV) graus de liberdade (GL) e valores dos quadrados médios com respectivas significâncias pelo teste F de crescimento celular (10^5 UFC.mL⁻¹) em meio líquido contendo nafta como fonte de carbono

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Trat-a(Ta)	52	1224206.10692	23542.42513	932.2378 **
Resíduo-a	106	2676.88889	25.25367	
Parcelas	158	1226882.99581		
Trat-b(Tb)	5	203793.18763	40758.63753	1470.2848 **
Int. TaxTb	260	2259901.20126	8691.92770	313.5436 **
Resíduo-b	530	14692.44444	27.72159	
Total	953	3705269.82914		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

Tabela F. Resumo das análises de variação conjuntas contendo as fontes de variação (FV) graus de liberdade (GL) e valores dos quadrados médios com respectivas significâncias pelo teste F de crescimento celular (10^5 UFC.mL⁻¹) em meio líquido contendo óleo lubrificante como fonte de carbono

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Trat-a(Ta)	52	523982.48637	10076.58628	76.3778 **
Resíduo-a	106	13984.66667	131.93082	
Parcelas	158	537967.15304		
Trat-b(Tb)	5	206105.92034	41221.18407	325.1656 **
Int. TaxTb	260	1758343.41300	6762.85928	53.3476 **
Resíduo-b	530	67188.00000	126.76981	
Total	953	2569604.48637		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)