

## ESTUDO DE MICRORGANISMOS PRESENTES EM UMA ÁREA CONTAMINADA POR GASOLINA COMERCIAL

Daniela Boaneres de Souza<sup>1</sup>, Gabriela Cristina Barbosa Brito<sup>2</sup>, Fernanda Carla Wasner Vasconcelos<sup>3</sup> e Letícia da Conceição Braga<sup>4</sup>

**Resumo:** A bioprospecção de organismos selecionados naturalmente em áreas contaminadas por gasolina comercial representa uma estratégia importante, a fim de obter agentes para processos de biorremediação destas áreas. Este trabalho teve como objetivo isolar e determinar a capacidade de biodegradação de microrganismos resistentes à gasolina. A amostra de solo contaminado com gasolina foi submetida ao isolamento de microrganismos, utilizando o petroderivado como única fonte de carbono. Foi feito inicialmente o enriquecimento em meio mineral com 1% de gasolina, durante 21 dias. As colônias isoladas foram purificadas em meios específicos. A caracterização preliminar dos microrganismos obtidos foi feita através da análise visual e coloração de Gram e o teste de biodegradação da gasolina foi realizado com o reagente DCPIP. Foram isolados dez morfotipos, quatro bacterianos, todos gram-positivos e seis leveduriformes. O isolamento foi realizado em condição aeróbica, o que pode ter influenciado a quantidade de morfotipos microbianos obtidos, pois na profundidade de amostragem (2m) a condição de anaerobiose prevalece. A capacidade de biodegradação da gasolina foi observada em nove, dos dez morfotipos isolados, em três bacterianos e nos seis leveduriformes.

**Palavras-chave:** Biodegradação. Hidrocarbonetos. Áreas contaminadas. Biotecnologia.

### 1 Introdução

A indústria do petróleo apresenta extensa e fundamental importância para a forte industrialização e o desenvolvimento econômico experimentados pelo Brasil, principalmente, a partir da década de 70. O setor petrolífero ainda constitui a principal fonte energética mundial e os derivados do petróleo são matérias-primas para a manufatura de vários bens de consumo. Toda essa demanda exigiu grande estruturação da cadeia produtiva desse setor, desde novas descobertas de campos de petróleo, passando pela formação de vários pólos petroquímicos, ao aumento das redes de distribuição, a ponta dessa cadeia (FATORELLI, 2005, MARIANO, 2006).

Diante de toda essa estrutura, 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. Alguns grupos de hidrocarbonetos são altamente tóxicos e

capazes de bioacumular ao longo da cadeia alimentar (TIBURTIUS, 2004). No caso de óleos, como a gasolina e o óleo diesel, os hidrocarbonetos monoaromáticos, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) são mutagênicos e carcinogênicos. Além disso, seus constituintes têm maior solubilidade em água e, portanto, são poluentes que apresentam maior mobilidade nas águas subterrâneas. Entre os BTEX, o benzeno é considerado o mais agressivo (BAIRD, 2002; MARIANO, 2006).

Desde a extração do petróleo passando pelo seu processamento e transporte até a armazenagem dos derivados, é crescente a inquietação com a possibilidade de contaminação do meio ambiente, cujas principais formas são o vazamento de gasolina de tanques subterrâneos mal conservados ou mal manejados e os vazamentos decorrentes da utilização do ambiente marinho pela indústria petrolífera. Segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), em 2009, os vazamentos em postos de combustíveis foram responsáveis

<sup>1</sup> E-mail: daniboaneres@yahoo.com.br.

<sup>2</sup> E-mail: gabrielacbbrito@gmail.com.

<sup>3</sup> E-mail: fernanda.wasner @prof.una.br. Centro Universitário UNA. una@una.br.

<sup>4</sup> E-mail: leticiacb@prof.una.br.

por 78 % dos casos de áreas contaminadas no Estado de São Paulo, o que corresponde a 2.279 áreas (CETESB, 2010). No Estado de Minas Gerais, 88% das áreas contaminadas listadas em 2009, estavam relacionadas com o segmento de postos de combustíveis (FEAM, 2010).

A Resolução n. 273 (CONAMA, 2000) considera que toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais. Define que a localização, construção, instalação e operação de postos de combustíveis dependerão de prévio licenciamento do órgão ambiental competente, sem prejuízo de outras licenças legalmente exigíveis.

A maioria dos tanques de armazenamento encontra-se alocado no subsolo dificultando o monitoramento e o controle de vazamentos que, quando ocorrem, requerem medidas mitigadoras imediatas para evitar danos ao solo e contaminação de águas subterrâneas (CUNHA et al., 2008).

A legislação brasileira exige que áreas contaminadas devam ser remediadas, para minimizar a interferência ambiental e restaurar os ecossistemas. Para isto, são necessários o diagnóstico, a análise e o monitoramento do impacto e medidas remediadoras (CETESB, 2010), os quais consomem grande volume de recursos econômicos de indústrias e agências governamentais (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000).

Assim, grandes esforços têm sido dedicados ao desenvolvimento de tecnologias limpas e processos de remediação eficientes e de baixo custo. Essas ações objetivam a transformação das espécies responsáveis pela poluição ambiental em formas menos tóxicas ou mesmo atóxicas que não ofereçam riscos de impacto ambiental (NOCENTINI et al., 2000).

Os processos biológicos são uma tecnologia promissora para a remoção de contaminantes e sobressaem-se por serem fundamentados em métodos naturais e relativamente simples, menos agressivos e mais adequados para a manutenção do equilíbrio ecológico, além do baixo custo quando comparados às outras alternativas (BENTO et al., 2005, MATHEW et al., 2006).

A biodegradação do petróleo por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários

pelo qual os compostos poluentes desse óleo são eliminados no meio ambiente (TAPAJÓS et al., 2008). A capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo é apresentada por diversos gêneros microbianos, principalmente bactérias, fungos e leveduras, todavia, cianobactérias, algas e mesmo protozoários também possuem essa capacidade (TRINDADE, 2002). Esses microrganismos podem ser encontrados no solo, em ambientes marinhos e de água doce.

Segundo Borém e Santos (2004) e Nakagawa e Andréa (2006), a biorremediação pode ser definida como uma estratégia ou processo que emprega agentes biológicos, microrganismos, plantas ou enzimas, para destoxificar poluentes alvos em ambientes contaminados. Por ser natural, supostamente não acarreta nenhum impacto adicional e pode ser realizada a um baixo custo. O princípio de todos os processos de biorremediação é propiciar um aumento na biodegradação e provocar um estímulo da atividade microbiana degradadora por diferentes mecanismos (MOLINA-BARAHONA et al., 2004).

Ao possibilitar a destoxificação de locais contaminados, a biorremediação é uma técnica capaz de restituir a funcionalidade do solo poluído e, conseqüentemente, promover nova sustentabilidade da área. Após o processo de descontaminação, esse solo torna-se mais propício a abrigar grande biodiversidade, e assim, a revegetação, como início do processo sucessional, é estimulada, permitindo a ciclagem de nutrientes, o reaparecimento da fauna até a auto-sustentação do ambiente (FEAM, 2010).

Para efetuar a biorremediação microbiana, uma das etapas consiste na seleção dos microrganismos adequados, sejam estes autóctones ou alóctones. Para a determinação dos microrganismos indígenas, os primeiros indícios podem ser obtidos através do estudo das colônias que habitam os ambientes contaminados. Logicamente, se um grupo de organismos consegue proliferar em um local com altas concentrações de uma espécie poluente, existe uma maior probabilidade de que possua um sistema que lhe permita metabolizar esse contaminante. Assim, a bioprospecção de organismos selecionados naturalmente em áreas contaminadas por óleos combustíveis representa uma estratégia importante, a fim de obter agentes

para processos de biorremediação dessas áreas. (MARTINS et al.,2003).

O presente trabalho teve como objetivo isolar e determinar a capacidade de biodegradação de microrganismos resistentes à gasolina comercial, subsidiando a escolha de microrganismos aptos para a degradação deste composto.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Obtenção das Amostras.

A amostra de solo contaminado com gasolina foi fornecida pela empresa de investigação ambiental, situada em Belo Horizonte, MG. A amostragem foi realizada por meio de uma perfuração do solo com 2m de profundidade. Houve uma análise prévia da presença de compostos orgânicos voláteis, detectando-se COV-1280 através do uso de Gastech. A amostra obtida foi acondicionada em um recipiente de vidro e encaminhada ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Universitário UNA para posterior análise.

### 2.2 Enriquecimento.

A amostra foi submetida ao isolamento de microrganismos, utilizando como fonte de carbono a gasolina comercial. Para isso, a amostra (10g) foi inicialmente enriquecida, em 100mL do meio mineral Bushnell Haas (BH) composto de:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1g/L,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1g/L,  $\text{MgSO}_4$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$  0,2g/L,  $\text{FeCl}_3$  0,05g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,02g/L, contendo 1% de gasolina como fonte de carbono. A amostra foi inoculada e incubada a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, durante 21 dias.

### 2.3 Isolamento e Caracterização dos Microrganismos.

Para o isolamento dos microrganismos, foram retiradas, a cada 7 dias, alíquotas de 10 mL do meio BH, incubado nas condições descritas no item anterior. As alíquotas foram cultivadas em meio BH sólido, suplementado com 1% de gasolina pela técnica de incorporação. As colônias isoladas foram estriadas em placas de Petri, contendo os meios sólidos: Tryptic Soy Agar (TSA) para bactérias e Sabouraud para fungos filamentosos e leveduras. Após

o período de incubação a 30°C por 5 dias para fungos, e 37°C por 2 dias para bactérias, as colônias foram transferidas para tubos de ensaio, contendo os referidos meios sólidos. As amostras foram novamente incubadas a 30°C por 5 dias e, em seguida, mantidas sob refrigeração (4°C) para a realização dos estudos posteriores. Após esse isolamento os fungos foram caracterizados macroscopicamente como filamentosos ou leveduriformes, e as bactérias caracterizadas por meio da técnica de coloração de Gram. Esta caracterização preliminar dos isolados teve como objetivo apenas diferenciá-los para o teste de biodegradação.

### 2.4 Teste de Biodegradação.

A potencialidade de degradação da gasolina por bactérias, fungos filamentosos e leveduras foi avaliada segundo Hanson et al. (1993). A técnica consiste na utilização do indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP) em meio mineral BH com um derivado de petróleo em uma microplaca. Microrganismos que possuem elevado potencial de degradação de derivados de petróleo tornam o meio incolor 24h após incubação, mas, dependendo do tempo necessário para a mudança de cor, capacidades relativas dos diferentes isolados podem ser apuradas. O princípio deste teste é que durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato. Ao incorporar um acceptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato pela observação da mudança de cor do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido). Para a realização do experimento, 25µL de suspensão microbiana, padronizada em  $10^8$ UFC/mL, foi acrescida às microplacas, contendo 250µL de meio BH, 10µL da fonte de carbono (gasolina comercial) e 5µL do indicador redox DCPIP. Poços abióticos, contendo 25µL de água estéril, substituindo a suspensão microbiana, foram usados como controle negativo. As placas foram incubadas a 30°C e observadas visualmente, no tempo 0 hora e nos intervalos de 12 e 24 horas. Para os morfotipos que apresentassem a capacidade de utilizar hidrocarbonetos como substrato era esperado a descoloração do meio.

### 3 Resultados e discussão

No isolamento de microrganismos da amostra de solo contaminado com gasolina, foram obtidos dez morfotipos dos diferentes

grupos microbianos pesquisados: bactérias (4) e leveduras (6) (Figura 1). A caracterização microscópica e macroscópica dos dez morfotipos encontrados no solo contaminado está representada na Tabela 1.

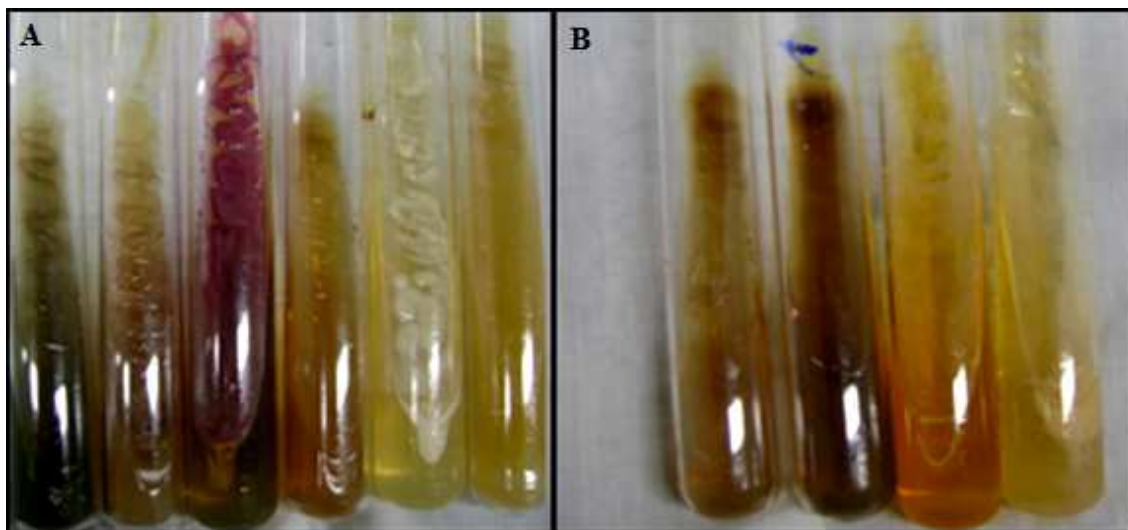


Figura 1 - Diversidade de morfotipos isolados após 21 dias de incubação das amostras. 1A- Isolados leveduriformes em meio Sabouraud; 1B- Isolados bacterianos em meio TSA.

Tabela 1 - Caracterização dos morfotipos isolados após 7 dias de incubação das amostras.

Morfotipo	Tipo de meio de purificação	Grupo microbiano	Aspecto visual (cor)	Coloração de gram	Forma	Presença ou ausência de filamentos
1	TSA	Bactéria	Marrom claro	Positiva	Cocos	_____
2	TSA	Bactéria	Marrom escuro	Positiva	Bacilo	_____
3	TSA	Bactéria	Amarelo	Positiva	Bacilo	_____
4	TSA	Bactéria	Branco	Positiva	Bacilo	_____
5	Sabouraud	Levedura	Verde	_____	_____	Ausência
6	Sabouraud	Levedura	Marrom	_____	_____	Ausência
7	Sabouraud	Levedura	Rosa	_____	_____	Ausência
8	Sabouraud	Levedura	Laranja	_____	_____	Ausência
9	Sabouraud	Levedura	Branco	_____	_____	Ausência
10	Sabouraud	Levedura	Amarelo	_____	_____	Ausência

Os isolados obtidos na amostra incubada por 7 dias no meio de enriquecimento se mantiveram também nas amostras incubadas por 14 e 21 dias, nas quais não foi detectada a presença de novos morfotipos. Os grupos morfológicos obtidos,

denominados M1 a M10, apresentaram um grau de predominância diferenciada no procedimento de isolamento (Figura 2) o que aparentemente também não variou para as amostras incubadas por 14 e 21 dias.

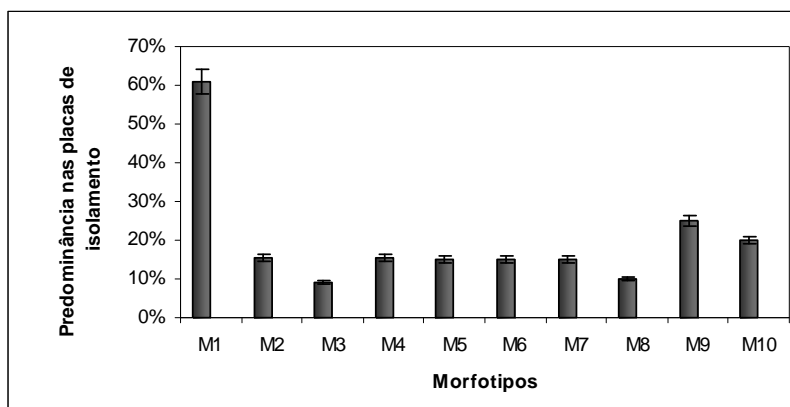


Figura 2 - Predominância dos morfotipos isolados da amostra incubada por 7 dias no meio de enriquecimento. M1 a M10 representam os morfotipos demonstrados na tabela 1.

Todos os experimentos foram realizados em condições aeróbicas, porém é necessário observar que na profundidade de amostragem (2m) prevalecem condições de anaerobiose, o que pode explicar a baixa quantidade de morfotipos microbianos isolados, quando comparados com outros trabalhos. Magalhães et al. (2004) isolaram 75 colônias de um solo contaminado com hidrocarbonetos no município de Guararema, em São Paulo; Teixeira e Bento (2007) isolaram e caracterizaram 37 bactérias de solos contaminados com gasolina no Rio Grande do Sul e Nakamura et al. (2009) isolaram 19 bactérias com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia.

Ron e Rosenberg (2002) demonstraram a capacidade de certos microrganismos utilizarem hidrocarbonetos como fonte de carbono. Neste contexto, demonstraram que estes microrganismos eram amplamente distribuídos na natureza, e que a utilização de hidrocarbonetos era altamente variável de acordo com a natureza química do composto na mistura do petróleo, e com as condições ambientais.

Segundo Perriello (2006), algumas bactérias na presença de oxigênio são capazes de degradar alcanos, decorrentes de poluentes petrolíferos, por metabolismo único ou cometabolismo. Kang et al. (2005) isolaram bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos pela cultura de enriquecimento usando o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) como única fonte de carbono. Dörr (2008) utilizou amostras de água subterrânea contaminada por hidrocarbonetos monoaromáticos para a obtenção de consórcios de bactérias degradadoras de BTEX. Nikolova e Nenov (2005) estudaram o potencial de degradação

de BTEX por fungos. Mollea et al. (2005) utilizaram linhagens fúngicas puras na otimização da biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

A ausência de fungos filamentosos também pode ser explicada pela profundidade da amostragem. Há um decréscimo da comunidade de fungos filamentosos à medida que aumenta a profundidade do solo. Segundo Raymundo e Tauk-Tornisiello (1997) a biodiversidade deste grupo predomina nos primeiros cinco centímetros de camada do solo, posteriormente há um aumento na comunidade de bactérias, provavelmente em virtude da variação da umidade e porosidade do solo. Ressalta-se ainda que Ruivo et al. (2007) e Caproni et al. (2005) verificaram resultados semelhantes.

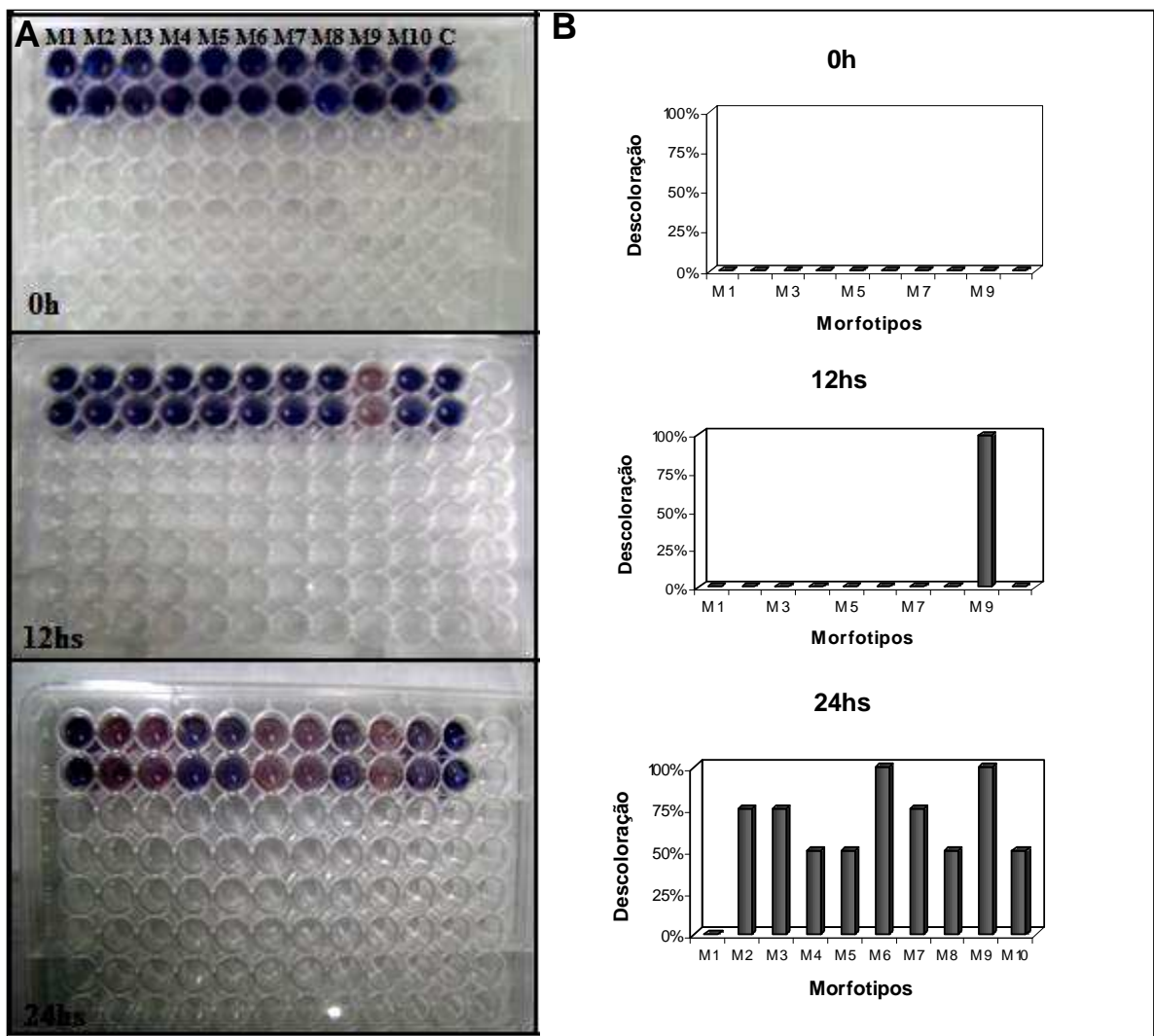
Como não foi detectado nenhum morfotipo bacteriano Gram negativo nos isolados obtidos, foi excluída a possibilidade da presença do gênero *Pseudomonas*. Contudo, estudos anteriores mostram que esse grupo é predominante em solos contaminados com derivados de petróleo (LEAHY; COWELL, 1990, RICHARD; VOGEL, 1999, CORAL; KARAGOZ, 2005, VASUDEVAN et al., 2007).

Para a efetuação de processos de biorremediação, é imprescindível a detecção da capacidade de biodegradação de derivados do petróleo por microrganismos isolados de solos contaminados por óleos combustíveis.

No teste de biodegradação, realizado para cada morfotipo, e em duplicata, foi observado que nove, dos dez morfotipos isolados, apresentaram capacidade de degradar a gasolina, sendo três bacterianos (M2, M3 e M4) e os seis leveduriformes (M5, M6, M7, M8, M9 e M10). Apesar do morfotipo M1 predominar em 60% das placas de

isolamento, constatou-se a incapacidade desta bactéria em biodegradar a gasolina. Para os morfotipos com capacidade de biodegradação, houve uma diferenciação temporal na mudança de cor do meio contendo DCPIP. Descoloração completa ocorreu após 12 horas nos poços contendo o morfotipo M9. Por outro lado, descoloração parcial foi observada no tempo 24 horas nos poços inoculados com os morfotipos M4, M5,

M8 e M10, e descoloração completa, ou quase completa, ocorreu no mesmo tempo nos poços M6, M2, M3 e M7. Os poços abióticos se mantiveram sem alteração, bem como os poços do morfotipo M1 (Figura 3). Esses resultados indicam que o isolado M9 apresenta maior capacidade de degradação da gasolina comercial, seguido pelo M6, quando comparados aos demais isolados (Figura 3B).



**Figura 3 - Teste de biodegradação da gasolina por microrganismos isolados de solo contaminado utilizando indicador DCPIP. 3A- Visualização do teste em microplacas após incubação a 30°C por 12 e 24 horas. 3B- Medida da eficiência da capacidade de biodegradação dos isolados em porcentagem de descoloração do meio contendo DCPIP. M1 a M10 representam os isolados; C representa o grupo controle.**

De acordo com os resultados obtidos, 90% dos isolados apresentaram potencial para degradar a gasolina. Utilizando o DCPIP para a análise de degradação, Gomes (2004) analisou oito morfotipos bacterianos isolados de amostras

contaminadas com petroderivados, destes, quatro (50%) apresentaram potencial de biodegradação. Souza et al. (2005) obtiveram 9,3% dos isolados microbianos obtidos sendo capazes de degradar a gasolina e Viera et al. (2007) encontraram 93,3% de

isolados bacterianos que demonstraram potencial de degradação do biodiesel.

O aumento na capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos que ocorrem em algumas populações de microrganismos indígenas, em ambientes poluídos por derivados de petróleo, é chamado de adaptação (SPAIN et al., 1980). Segundo Leahy e Colwell (1990), há três mecanismos inter-relacionados que podem contribuir para a adaptação: 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. É essa adaptação que resulta em um aumento da proporção de degradação dos hidrocarbonetos.

A presença dos microrganismos isolados na área contaminada indica que possivelmente eles são capazes de metabolizar as espécies químicas existentes, diminuindo assim a concentração dos agentes contaminantes no meio e, por isso, mostram-se promissores para novos estudos envolvendo o processo de biorremediação deste local.

A bioprospecção de microrganismos baseada em metodologias moleculares tem se mostrado altamente promissora. A metagenômica, que é a análise genômica da comunidade de microrganismos de um determinado ambiente por técnicas independentes de cultivo, contém um

número maior de informação genética do que aquela verificada na diversidade microbiana cultivável. Esse novo campo da microbiologia pode permitir o acesso de até 100% do material genético de toda biodiversidade encontrada no ambiente (OLIVEIRA; MANFIO, 2006).

A análise microbiológica é necessária para uma averiguação do potencial de biodegradação de microrganismos autóctones para uma possível biorremediação de uma área contaminada. Desta forma, a bioprospecção de organismos degradadores de petroderivados incentiva o tratamento biológico de solos contaminados por estes compostos, contribuindo para os estudos de remediação destas áreas.

#### 4 Considerações finais

Ainda que empresas de remediação poucas vezes adotem práticas biológicas para reduzir uma contaminação, a biorremediação é um dos focos principais da era biotecnológica e visa contribuir com a gestão e a recuperação de áreas contaminadas. O conhecimento da capacidade de biodegradação por microrganismos da gasolina é uma estratégia essencial para a aplicação de processos biológicos na restauração de áreas contaminadas com hidrocarbonetos derivados do petróleo.

---

#### 5 Study of microorganisms present in a contaminated area by gasoline

**Abstract:** *Bioprospecting of organisms naturally selected in areas contaminated by commercial gasoline represents an important strategy in order to obtain agents for bioremediation processes of these areas. This study aimed to isolate and determine the ability of biodegradation of microorganisms resistant to gasoline. The sample of soil contaminated with gasoline was submitted to the isolation of microorganisms, using the oils derivatives as the only carbon source. The enrichment in mineral medium was initially made with 1% of gasoline during 21 days. The colonies isolated were purified in specific media. The preliminary characterization of microorganisms was carried out by visual examination and Gram staining and gasoline degradation test was performed using the reagent DCPIP. Ten morphotypes were isolated, four bacterial, all gram-positive and six yeast. The isolation was carried out in aerobic condition, which may have influenced the amount of microbial morphotypes obtained because for the sampling depth (2m) the anaerobic condition prevails. The ability of biodegradation of gasoline was observed in nine of the ten morphotypes isolates, three bacterial and six yeast.*

**Key-words:** Biodegradation. Hydrocarbons. Contaminated areas. Biotechnology.

---

## 6 Referências

- ACCIOLY, A. M. A., SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 1, p. 299-352, 2000.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. Trad. RECIO, M. A. L.; CARRERA, L. C. M. 2ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BENTO F. M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.
- BORÉM, A., SANTOS, F. R. Biorremediação. In: BORÉM, A.; SANTOS, F.R. (Eds) **Biotecnologia Simplificada**. Universidade Federal de Viçosa/MG, p. 179-187, 2004.
- CAPRONI, A. L. et al. Fungos micorrízicos arbusculares em estéril revegetado com *Acacia mangium*, após mineração de bauxita. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 373-381, 2005.
- CETESB – **COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL**. [on line]. Brasil, 2010. Disponível em:<<http://www.cetesb.sp.gov.br>> Acesso em: 13 jan. 2010.
- CONAMA. Resolução n. 273, de 29 de novembro de 2000. Dispõe sobre prevenção e controle da poluição em postos de combustíveis e serviços, 2010. Disponível em:<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2000>> Acesso em: 15 jan. 2010.
- CORAL, G., KARAGÖZ, S. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. **Annals of Microbiology**, v. 55, p. 255-259, 2005.
- CUNHA, C. D. et al. **Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 45 p., 2008.
- DORR, F. **Consórcios degradadores de BTEX: identificação, caracterização e avaliação do potencial de degradação**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). USP - Universidade de São Paulo. 2008.
- FATORELLI, L. **Proposta de avaliação de risco ecológico para contaminações de petróleo e derivados – estudo de caso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Pós-Graduação em Engenharia Ambiental/ PPGEA. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 102 p., 2005.
- FEAM – **FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE**. [on line]. Brasil, 2010. Disponível em:<[www.feam.com.br](http://www.feam.com.br)> Acesso em: 13 fev. 2010.
- GOMES, E. B. **Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo Terminal Portuário de Suape-PE**. Pernambuco. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos), UFPE. 109 p., 2004.
- HANSON, K. G. et al. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, p. 745-748, 1993.
- KANG, S. et al. Physiological characterization of BTEX degrading bacteria *Microbacterium* sp. EMB-1 and *Rhodococcus* sp. EMB-2 isolated from reed rhizosphere of suncheon bay. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 169-177, 2005.
- LEAHY, J. G., COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 305-315, 1990.
- MAGALHÃES, H. M. et al. **Empregos de fungos na degradação de petróleo**. In: Comunicação Técnica CT2004-074-00, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT 2004.
- MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese (Doutorado em Geociências e Ciências Exatas), UNESP. Rio Claro, 147 p., 2006.
- MARTINS, A. et al. Biorremediação. **III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas**, Rio Claro, SP 2003. Disponível em:<[www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/3fec2401](http://www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/3fec2401)> Acesso em: 20 ago. 2009.
- MATHEW, M. et al. Bioremediation of 6% [w/w] diesel-contaminated Mainland soil in Singapore; comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Engineering Life Science**, v. 6, n. 1, p. 63-67, 2006.
- MOLINA-BARAHONA, L. et al. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, v. 27, p. 65-175, 2004.
- MOLLEA, C. et al. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. **Chemosphere**. Itália, Jan. 2005.
- NAKAGAWA, L. E., ANDRÉA, M. M. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 575-582, 2006.



- NAKAMURA, F. M. et al. Isolamento de *Pseudomonas* e *Burkholderia* degradadoras de compostos aromáticos em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia. In: **17º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SIICUSP)**. São Paulo, 2009.
- NIKOLOVA, N., NENOV, V. BTEX degradation by fungi. **Water Science & Technology**, v. 51, n. 11, p. 87-93, 2005.
- NOCENTINI, M. et al. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. **Chemosphere**, v. 41, p. 1115-1123, 2000.
- OLIVEIRA, V. M., MANFIO, G.P. **Molecular approaches for the screening of novel enzymes**. In: Jean-Louis Reymond. (Ed.). *Enzyme Assays: High-throughput screening, genetic selection and fingerprinting*. p. 221-238, 2006.
- PERRIELLO, F. A. **Bioremediation of petroleum pollutants with alkane-utilizing bacteria**. United States Patent No. 6,110,372. 2000.
- RAYMUNDO, O. Jr., TAUK-TORNISIELO, S. M. Occurrence of hyphomycetes and actinomycetes in red-yellow latosol from a cerrado region in Braz. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 197-203, 1997.
- RICHARD, J. Y., VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, p. 93-100, 1999.
- RON, E. Z., ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion Biotechnology**, v. 3, p. 249-252, 2002.
- RUIVO, M. L. P. et al. Esecaflor Artificially induced drought in Caxiuanã; Reserve, Eastern Amazonia -Soil properties and Litter Spider Fauna. **Earth Interaction Journal**, v. 11, p. 1-13, 2007.
- TAPAJÓS, P. B. A. et al. **Estudo da mobilidade e da biodegradação de um óleo mineral em solos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 205 p., 2008.
- SOUZA, C. S. et al. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. In: **3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás**. Salvador/BA, 2005.
- SPAIN, J. C. et al. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/watter cores from estuarine and freshwater environments. **Applied & Environmental Microbiology**, v. 40, p. 726-734, 1980.
- TEIXEIRA, A. S., BENTO, F. M. **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial**. Dissertação (Mestrado em faculdade de Agronomia) UFRGS. Porto Alegre, 95 p., 2007.
- TIBURTIUS, E. R. L. et al. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, p. 441-446, 2004.
- TRINDADE, P. V. O. **Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo**. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.
- VASUDEVAN, N. Role of plasmid in the degradation of petroleum hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* NS1. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 42, p. 1141-146, 2007.
- VIEIRA, T. M. et al. Utilização de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) em teste rápido de caracterização de potenciais biodegradadores de biodiesel. In: **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Brasília, 2007.

## 7 Agradecimentos

À empresa de investigação ambiental do Grupo MBM, Manfer Serviços e Assessoria Ltda, por ceder a amostra de solo contaminado; ao Dr. Adriano Pinto Mariano, pelo apoio na metodologia; e aos Profs. Agnes Kiesling Casali e Evandro Carrusca de Oliveira, pelas inúmeras contribuições ao longo deste trabalho.