



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
CENTRO DE TECNOLOGIA – CT
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE QUÍMICA

THAFFAREL PEREIRA GUEDES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ISOLADOS
HIDROCARBONOCLÁSTICOS PROVENIENTES DE POSTOS DE
COMBUSTÍVEIS AUTOMOTORES**

João Pessoa/PB

2019

THAFFAREL PEREIRA GUEDES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ISOLADOS
HIDROCARBONOCCLÁSTICOS PROVENIENTES DE POSTOS DE
COMBUSTÍVEIS AUTOMOTORES**

*Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação de Engenharia
de Química, do Centro de Tecnologia da
Universidade Federal da Paraíba, para
apreciação da banca examinadora como
parte dos requisitos necessários para a
obtenção do grau de Bacharel em
Engenharia Química.*

Orientadora: Prof^o. Dra. Sharline F. de M. Santos

João Pessoa/PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G924a Guedes, Thaffarel Pereira.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ISOLADOS
HIDROCARBONOCLÁSTICOS PROVENIENTES DE POSTOS DE
COMBUSTÍVEIS AUTOMOTORES / Thaffarel Pereira Guedes. -
João Pessoa, 2019.

77 f. : il.

Orientação: Dra Sharline F de M Santos.
Monografia (Graduação) - UFPB/CT.

1. Petroderivados. 2. Hidrocarbonoclasticos. 3.
Emulsificação. 4. Isolamento. I. Santos, Dra Sharline F
de M. II. Título.

UFPB/BC

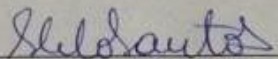
THAFFAREL PEREIRA GUEDES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ISOLADOS
HIDROCARBONOCLÁSTICOS PROVENIENTES DE POSTOS DE
COMBUSTÍVEIS AUTOMOTORES**

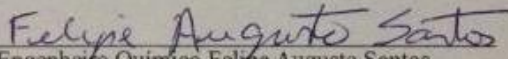
Folha de avaliação apresentado a coordenação
do curso de Engenharia Química da
Universidade Federal da Paraíba-UEPB, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em 27/9/19

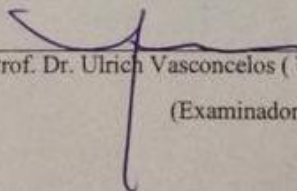
BANCA EXAMINADORA:



Prof^o. Dra. Sharline F. de M. Santos (UEPB/CT/DEQ)
(Orientadora)



Engenheiro Químico Felipe Augusto Santos
(Examinador)



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos (UEPB/ CBIOTEC)
(Examinador)

João Pessoa/PB

2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar forças, coragem e estímulo para nunca desistir dos meus objetivos e permitir que eu chegasse até aqui, mesmo com todas as dificuldades que a vida apresenta.

A minha base, Josilene e José, que sempre foram pais maravilhosos, amorosos, companheiros e que sempre acreditaram em mim, me apoiaram em todas as minhas decisões e me ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos. Aos meus irmãos, que procuraram me ajudar de todas as formas possíveis. E por toda a minha família em geral que torcem para que eu alcance os meus objetivos.

Ao, Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos, pelo exemplo de profissional, pela paciência, dedicação e por todo o conhecimento compartilhado durante minha vida acadêmica. Levarei o senhor como exemplo de profissional altíssima qualidade.

A minha orientadora, Prof(a) Dra. Sharline F. de M. Santos, pela oportunidade de aprendizado, dedicação e atenção na minha formação.

Ao meu amigo Mestrando em Engenharia Química, Felipe Augusto Santos, por aceitar fazer parte da banca, e por sua amizade que levarei para toda a vida.

A Danusa Araújo, que com seu carisma alegrou meus dias mais angustiantes e me motivou sempre que alcançaria meus objetivos.

A todos os professores do curso de Engenharia química e Biotecnologia, pelo conhecimento transmitido e pela contribuição para o meu aprendizado.

Aos meus amigos pelo apoio, amizade e por toda a colaboração nesta caminhada árdua, mas que ao lado de vocês foi prazerosa. Ficaram para sempre no meu coração.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse momento.

Muito obrigado !

RESUMO

Postos de combustíveis são responsáveis por importantes impactos em razão dos petroderivados presentes exercerem pressões seletivas, conduzindo alterações no metabolismo e fisiologia de diversos grupos microbianos do solo. Bactérias e fungos utilizam rotas metabólicas semelhantes durante a eliminação de hidrocarbonetos no ambiente. Embora a concentração microbiana nas áreas com longo históricos de contaminação esteja temporariamente reduzida e impedida de promover uma efetiva eliminação dos hidrocarbonetos, proporcionalmente os indivíduos hidrocarbonoclásticos são mais numerosos. Conhecer seu potencial metabólico possibilita empregá-los nas intervenções cujo foco seja a remoção biológica de petroderivados. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar micro-organismos de amostras de solo e combustível obtido de 7 postos de combustíveis na Grande João Pessoa, conhecendo seu potencial como agente de biorremediação, por meio de ensaios rápidos e reprodutíveis. Um total de 17 linhagens foi obtido: 8 bactérias Gram-negativas e 9 ascomicetos. Do total de isolados, 4 bactérias e 4 fungos filamentosos foram submetidos ao teste da utilização de hidrocarbonetos, em sistemas de microdiluição contendo meio mineral e indicador 2,6-diclorofenil indofenol (DCPIP). O colapso da gota de óleo ocorreu entre 48 e 96h. Em seguida frações contendo as células no início da fase estacionária ou os produtos excretados de seu metabolismo foram misturadas ao óleo diesel e óleo combustível na proporção 3:2 para determinação do índice de emulsificação. As bactérias obtiveram um índice de aproximadamente 40% em até 72h, e para os fungos o índice máximo foi cerca de 50% em 48h, porém as bactérias produziram uma emulsão mais estável à temperatura ambiente. Nas condições experimentais empregadas, 3 bactérias (*Aeromonas hydrophila* TP17, *Burkholderia cepacia* TP21 e *Citrobacter freundii* TP20) e 2 *Aspergillus* sp (TP11 e TP12) foram considerados os microorganismos com maior potencial de aplicação como agente de biorremediação.

Palavras-chave: Petroderivados, Hidrocarbonoclásticos, Emulsificação, Biorremediação.

ABSTRACT

Gas stations are responsible for important impacts due to the present petroderivatives exerting selective pressures, leading to changes in metabolism and physiology of various soil microbial groups. Bacteria and fungi use similar metabolic pathways during the elimination of hydrocarbons in the environment. Although microbial concentration in areas with a long history of contamination is temporarily reduced and prevented from promoting effective elimination of hydrocarbons, proportionally hydrocarbonoclastic individuals are more numerous. Knowing their metabolic potential makes it possible to employ them in interventions that focus on the biological removal of petroleum products. In this context, the objective of this work was to isolate and identify microorganisms from soil and fuel samples obtained from 7 gas stations in Greater João Pessoa, knowing its potential as a bioremediation agent through rapid and reproducible assays. A total of 17 strains were obtained: 8 gram-negative bacteria and 9 ascomycetes. From the total of isolates, 4 bacteria and 4 filamentous fungi were submitted to the hydrocarbon use test in microdilution systems containing mineral medium and indicator 2,6-dichlorophenyl indophenol (DCPIP). The collapse of the oil drop occurred between 48 and 96h. Then fractions containing cells at the beginning of the stationary phase or excreted products of their metabolism were mixed with diesel oil and fuel oil in a 3: 2 ratio to determine the emulsification index. The bacteria obtained an index of approximately 40% within 72h, and for the fungi the maximum index was about 50% within 48h, but the bacteria produced a more stable emulsion at room temperature. Under the experimental conditions employed, 3 bacteria (*Aeromonas hydrophila* TP17, *Burkholderia cepacia* TP21 and *Citrobacter freundii* TP20) and 2 *Aspergillus* sp (TP11 and TP12) were considered the microorganisms with the highest application potential as bioremediation agent.

Keywords: Petroderivatives, Hydrocarbonoclastic, Emulsification, Bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação de contaminação do solo por um posto de combustível	18
Figura 2 - Morfologia de colônias bacterianas	21
Figura 3 - Semeadura por estrias com alça de platina	26
Figura 4 - Semeadura por espalhamento.....	27
Figura 5 - Comparação entre o método de derramamento e de espalhamento.....	28
Figura 6 - Série de diluição para isolamento de um microrganismo.	29
Figura 7 - Representação esquemática dos mecanismos de desestabilização de emulsões do tipo O/A. sendo a – flocculação, b- cremagem, c- acomodação de ostwald, d- coalescência ...	32
Figura 8 - Pontos considerados para coleta das amostras de solo nos postos de gasolina: área central próxima às bombas (A) e entorno (B). Figura adaptada de Tankstellen	36
Figura 9 - Protocolo de identificação bioquímica dos isolados bacterianos.	38
Figura 10 - Ilustração do procedimento de degradação de hidrocarbonetos em multipos. ..	40
Figura 11 - Protocolo do ensaio de emulsificação do óleo	41
Figura 12 - Processo de identificação da bactéria TP-19, utilizando o Kit battery 3.....	44
Figura 13 - de crescimento micelar em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose	46
Figura 14 - Aspectos microscópicos destacando as estruturas micelares e reprodutivas das linhagens TP01 (<i>Paecilomyces</i> sp.), à esquerda; TP02 (<i>Penicillium</i> sp.), ao centro; e TP11 (<i>Aspergillus</i> sp.), à direita.....	47
Figura 15 - Descoloração tempo dependente do 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) por diferentes linhagens microbianas durante o crescimento em óleo lubrificante usado (esquerda) e óleo diesel (direita) ao terceiro dia do ensaio.	49
Figura 16 - Formação da emulsão em óleo diesel e fração com células (F1) e sem células bacterianas (F2), respectivamente, às 48h do início do ensaio.....	50
Figura 17 - Formação da emulsão em óleo de motor e fração com células (F1) e sem células bacterianas (F2), respectivamente, às 48h do início do ensaio.....	51
Figura 18 - Formação da emulsão em óleo de algodão e fração com células (F1) e sem células bacterianas (F2), respectivamente, às 48h do início do ensaio.....	51
Figura 19 - Índice de emulsificação do óleo diesel em linhagens bacterianas nas frações F1.	52
Figura 20 - Índice de emulsificação do óleo de motor em linhagens bacterianas nas frações F1	52

Figura 21 - Índice de emulsificação do óleo de algodão em linhagens bacterianas nas frações F1	53
Figura 22 - Índice de emulsificação do óleo diesel em linhagens bacterianas nas frações F2. 53	
Figura 23 - Índice de emulsificação do óleo de motor em linhagens bacterianas nas frações F2	54
Figura 24 - Índice de emulsificação do óleo de algodão em linhagens bacterianas nas frações F2	54
Figura 25 - Formação da emulsão em óleo diesel e fração com células (F1) e sem células bacterianas (F2), respectivamente, às 48h do início do ensaio.....	56
Figura 26 - Formação da emulsão em óleo de motor e fração com células (F1) e sem células bacterianas (F2), respectivamente, às 48h do início do ensaio.....	56
Figura 27 - Formação da emulsão em óleo de algodão e fração com células (F1) e sem células bacterianas (F2), respectivamente, às 48h do início do ensaio.....	57
Figura 28 - Índice de emulsificação do óleo Diesel em linhagens bacterianas nas frações F1..	57
Figura 29 - Índice de emulsificação do óleo de motor em linhagens bacterianas nas frações F1	58
Figura 30 - Índice de emulsificação do óleo de algodão em linhagens bacterianas nas frações F1	58
Figura 31 - Índice de emulsificação do óleo Diesel em linhagens bacterianas nas frações F2..	59
Figura 32 - Índice de emulsificação do óleo de motor em linhagens bacterianas nas frações F2	59
Figura 33 - Índice de emulsificação do óleo de algodão em linhagens bacterianas nas frações F2	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Meios de Cultura	23
Quadro 2 - Localização dos pontos de coleta com sucesso no isolamento	35
Quadro 3 - Bactérias isoladas nas amostras originadas dos postos de gasolina	43
Quadro 4 - Fungos filamentosos isolados nos postos de gasolina	45
Quadro 5 - Tempo observado para o meio perder a coloração azul do indicador*	48

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo do índice de emulsificação.....	41
---	----

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	14
2 - OBJETIVOS.....	16
2.2 – ESPECÍFICOS	16
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 - PETRÓLEO	17
3.2 – CONTAMINAÇÃO POR PETRODERIVADOS.....	17
3.3 - BIORREMEDIAÇÃO	19
3.4 – ISOLAMENTO DE MICROORGANISMO	20
3.5 – MEIOS DE CULTURA	22
3.5.1 – MEIOS DE CULTURA PURA PARA BACTÉRIAS	24
3.5.2 – MEIOS DE CULTURA PURA PARA FUNGOS	24
3.6 – ISOLAMENTO EM CULTIVO SÓLIDO	25
3.6.1 – TÉCNICA DE SEMEADURA POR ESTRIAS.....	25
3.6.2 – TÉCNICA DE SEMEADURA POR ESPALHAMENTO	26
3.6.2 – TÉCNICA DE SEMEADURA POR DERRAMAMENTO	27
4 – ISOLAMENTO EM CULTIVO LÍQUIDO.....	29
5 - EMULSÃO.....	30
5.1 - ESTABILIDADE DAS EMULSÕES	31
5.2 - EMULSIONAMENTO	32
4.1 - MATERIAIS	34
4.2 - MÉTODOS	34
4.2.1 – PONTOS DE COLETA	34
4.2.2 - AMOSTRAS	35
4.2.3 - ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E ISOLAMENTO	36

4.2.4 – IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	37
4.2.5 – IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS	39
4.2.6 – DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO.....	40
4.2.7 – TESTE DE COLAPSO DA GOTA DE ÓLEO.....	40
4.2.8 – ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO	41
5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
5.1 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS HIDROCARBONOCLÁSTICOS.....	43
5.1.1 – BACTÉRIAS	43
5.1.2 – FUNGOS.....	44
5.2 – DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS EM MULTIPOÇOS.....	48
5.3 – TESTE ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO	50
5.3.1 – BACTÉRIAS	50
5.3.2 – FUNGOS FILAMENTOSOS.....	55
6 - CONCLUSÕES	62
7 - REFERÊNCIAS	63
8 - APÊNDICE A	72

1 – INTRODUÇÃO

Petróleo é um termo genérico frequentemente empregado para denominar uma mistura complexa e tóxica de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos, heterocíclicos, sais e uma pequena fração de metais e compostos organometálicos, formados naturalmente, a partir da conversão anaeróbica de matéria orgânica depositada em sedimentos de baixa permeabilidade, sob condições específicas de pressão e temperatura. Neste contexto, os petroderivados representam uma das mais importantes classes de xenobióticos, responsáveis por impactos negativos ao ambiente, em especial à biota, aos corpos hídricos e ao solo (DROZDOVA et al., 2013; SIVARAMAN et al., 2011).

O solo é um ambiente caracterizado por uma alta complexidade biológica, a qual contribui para a sustentabilidade de diversos ecossistemas. Neste cenário, as reações microbianas são a chave para recuperação de solos contaminados por petroderivados, ao formarem produtos menos tóxicos e/ou mineralizá-los. Por outro lado, em ambientes com histórico antigo de contaminação por hidrocarbonetos permite de forma gradual, o estabelecimento do fenômeno de tolerância ao contaminante, tornando o sistema mais resistente a estresses adicionais (LEE; OH e KIM, 2008; ZOCCA et al. 2004).

Tratando-se de postos de gasolina, os vazamentos, especialmente dos tanques, representam a maior fonte de contaminação ambiental nestes estabelecimentos, e diferentes substâncias estão envolvidas no processo, tais como: combustíveis propriamente ditos, óleo de motor, aditivos, lubrificantes e fluidos hidráulicos, dentre outros. Parte destes contaminantes pode ser carregada pela água de chuvas, agravando mais o problema, que poderia ser minimizado se a impermeabilização fosse praticada, uma vez que a maioria destes estabelecimentos se localiza em áreas virtualmente ameaçadas (KHAN; VIROJNAGUD e RATPUKDI, 2004).

Em densidades populacionais apropriadas, a microbiota presente nas áreas impactadas por petroderivados utiliza diferentes estratégias metabólicas, visando superar a natureza recalcitrante dos hidrocarbonetos e neste contexto, o isolamento de microorganismos hidrocarbonoclásticos, pode revelar o seu potencial como agentes de biorremediação ou de produção de biomoléculas de interesse industrial.

Partindo desta premissa, a hipótese que norteou este trabalho trata da aplicação biotecnológica, de microorganismos degradadores de hidrocarbonetos, isolados de postos de

abastecimento de combustíveis automotores com histórico de contaminação, como potenciais agentes de biorremediação.

2 - OBJETIVOS

2.1 – GERAL

Caracterizar diferentes grupos de microorganismos hidrocarbonoclástico, isolados de amostras proveniente do solo ou de tanques de combustíveis desses locais, como parte de uma seleção de potenciais agente de biorremediação.

2.2 – ESPECÍFICOS

1. Conhecer o potencial dos isolados em utilizar óleo cru como fonte de carbono e energia.
2. Determinar o índice de emulsificação dos isolados em diferentes derivados do petróleo.
3. Conhecer a susceptibilidade dos isolados a alguns agentes antimicrobianos.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - PETRÓLEO

A indústria do petróleo apresenta grande importância no desenvolvimento econômico mundial, pois o setor petrolífero ainda constitui a principal fonte energética. Em função da grande demanda o aumento da produção e comercialização do petróleo e seus derivados tem gerado preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas, principalmente pela ocorrência de acidentes ou vazamentos durante as atividades relacionadas aos processos produtivos, de transporte e de armazenamento de matérias-primas e produtos. Mesmo em pequenas proporções, a contaminação por hidrocarbonetos derivados do petróleo representa um grande risco à saúde humana e ao ambiente, tendo em vista que alguns desses contaminantes são altamente tóxicos (COSTA, 2011).

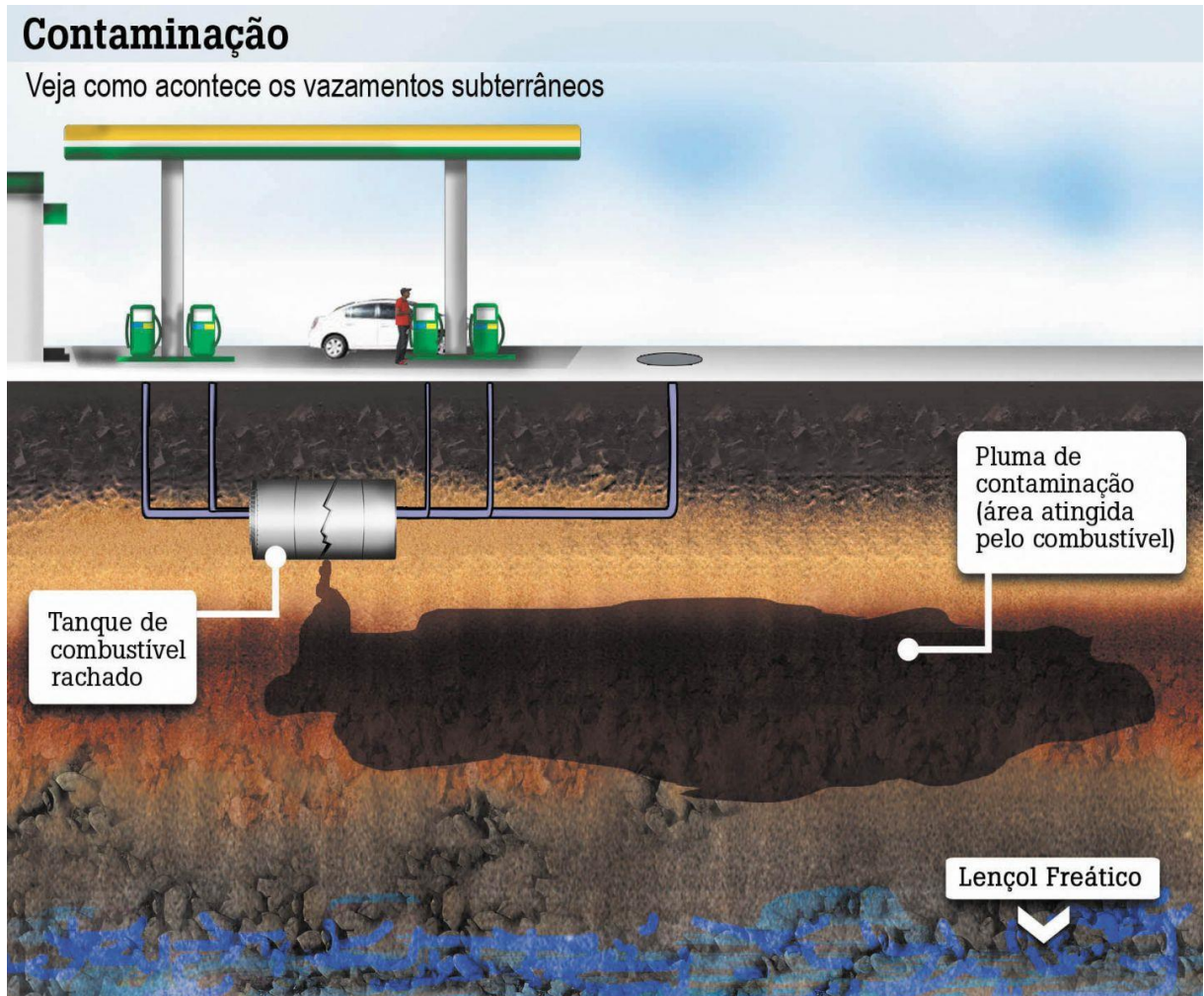
Os hidrocarbonetos do petróleo são uma mistura de compostos heterogêneos saturados, aromáticos e resinas, inevitavelmente introduzidos no ambiente por diversas fontes durante todas as fases do processamento do óleo cru e seus derivados, isto é, da extração à estocagem nos pontos de venda. Neste contexto, os postos de abastecimento de combustíveis automotores são um grande risco, em razão da localização, bem como do mau estado de conservação dos tanques de armazenamento, sujeitos à corrosão química e microbiológica, contribuindo para vazamentos e resultando na contaminação do solo e alterações na biota edáfica (LINDORFER; FAZENI e STEINMÜLLER, 2014; GAYLARDE; BENTO e KELLEY, 1999).

3.2 – CONTAMINAÇÃO POR PETRODERIVADOS

Postos de combustíveis constituem a maior fonte de contaminação de hidrocarbonetos, nas regiões urbanas. Este ambiente e seu entorno exercem significativamente pressões seletivas à biota presente, em função da natureza recalcitrante e/ou persistente da

maioria dos compostos orgânicos envolvidos, bem como do grau de mutagenicidade variável, o qual promove alterações no número e na atividade metabólica da microbiota presente (JIANG et al., 2012).

Figura 1 - Representação de contaminação do solo por um posto de combustível



Fonte: Google (2016).

A fim de minimizar os danos causados e restaurar os ecossistemas, surge à necessidade de remediar ambientes contaminados por petroderivados, empregando técnicas químicas, físicas e biológicas que visam à eliminação desses poluentes (BAPTISTA et al., 2003). Dentre as técnicas desenvolvidas, a biorremediação destaca-se por ser fundamentada em métodos naturais mais adequados para a recuperação da qualidade ambiental a partir da degradação desses contaminantes (SILVA e ESPOSITO, 2010).

3.3 - BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é o processo pelo qual organismos vivos tais como, bactérias, fungos, plantas, algas verdes ou suas enzimas são utilizados para reduzir ou remover - remediar - contaminações no ambiente. Utilizando processos biodegradáveis para tratamento de resíduos este processo é capaz de regenerar o equilíbrio do ecossistema original. O vantajoso é o fato de ser simples, barato e menos prejudicial que os processos não biológicos. A utilização de bactérias *Pseudomonas spp.* na descontaminação de ambientes contaminados por petróleo é um exemplo. Essas e outras bactérias similares oxidam vários compostos orgânicos perigosos, alterando-os em compostos não nocivos ao meio ambiente (AMABIS; MARTHO,, J.; G. R. (2010).

Consiste na utilização de microrganismos de ocorrência natural ou cultivados, para degradar ou imobilizar compostos orgânicos, em especial hidrocarbonetos de petróleo de ambientes contaminados. Microrganismos como bactérias e fungos filamentosos utilizam estes compostos orgânicos como fonte de nutrientes e energia, transformando-os em substâncias inertes, ocasionando uma redução em sua concentração ao longo do tempo (BEZERRA, 2009).

A degradação microbiana é o principal mecanismo de remoção de hidrocarbonetos da natureza e todo organismo capaz de assimilar e utilizar estes compostos, para produção de biomassa e energia é denominado por hidrocarbonoclástico. Tais microrganismos são dotados de sistemas metabólicos complexos, os quais possibilitam alterar a estrutura molecular dos hidrocarbonetos, transformando-os em compostos inertes ou os eliminado por completo. Além disso, o isolamento e a manipulação de microrganismos hidrocarbonoclásticos frequentemente representam uma importante estratégia de biorremediação de áreas negativamente impactadas (MAHJOUBI et al., 2013; BRITO et al., 2006).

Os microrganismos hidrocarbonoclásticos são descritos pela literatura há mais de um século (SÖHNGEN, 1906 *apud* BUSHNELL e HAAS, 1941), entretanto sua aplicação só ocorreu com mais frequência nas últimas duas décadas. As bactérias constituem o grupo mais importante e abundante nestes nichos, destacando o gênero *Pseudomonas* e o filo *Actinobacteria*, além de espécies do domínio *Archaea* (LIU et al., 2009). Entretanto, outros organismos também foram descritos como hidrocarbonoclásticos, dentre eles, fungos filamentosos (RODRÍGUEZ-RODRÍGUES et al., 2010), leveduras (GALÍNDZ-MAYER et al., 2008) e certas algas (WANG et al., 2013).

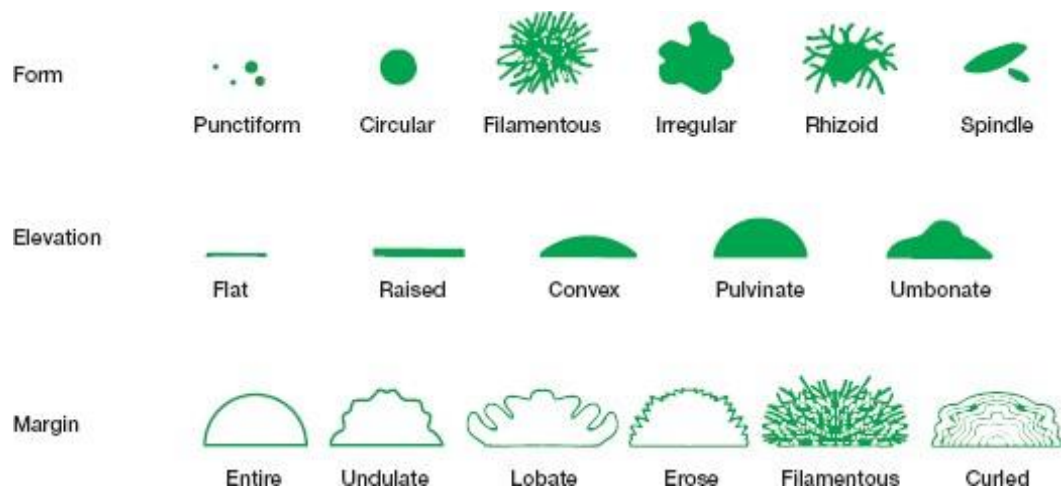
3.4 – ISOLAMENTO DE MICROORGANISMO

Isolamento consiste na obtenção de culturas puras que envolvem somente o organismo de interesse. Na fase do isolamento, ocorre a seleção de uma colônia através da observação da produção de determinado produto ou da morfologia da colônia (STANBURY, WHITAKER E HALL, 1995).

Uma cultura livre de outros microrganismos contaminantes onde o microrganismo de interesse está presente de forma homogênea é denominada cultura axênica. Um cultivo desse tipo dá oportunidade de investigação de características fisiológicas e genéticas sem a interferência de outros microrganismos e em uma densidade populacional muito maior do que a encontrada em amostras de meio ambiente. No entanto alguns fatores podem ser alterados justamente por esse motivo, pois no meio ambiente ocorre uma interação entre diversas espécies e nutrientes, podendo, por exemplo, modificar o formato, a textura e a coloração de colônias (OGUNSEITAN, 2005).

O isolamento, assim como todo o processo que irá se desenvolver futuramente, deve ser o mais econômico possível, levando-se em consideração a produtividade que será obtida pelo microrganismo e os gastos necessários para isolamento de tal microrganismo. Fatores importantes na escolha de um microrganismo são as suas características nutricionais, pois se almeja obter microrganismos que utilizem substratos baratos, que podem ser obtidos através da formulação adequada do meio de isolamento; a temperatura ótima, pois organismos com temperatura ótima de 40°C para cima facilitam o isolamento e reduz os custos de resfriamento do fermentador; ser compatível com o fermentador utilizado e com o processo de cultivo desejado; e deve ser geneticamente estável, ou quando se deseja a manipulação genética devem ser conhecidos os melhores mecanismos (STANBURY, WHITAKER e HALL, 1995).

Normalmente, as colônias de microrganismos se originam somente de uma célula ou esporo de microrganismo. Essas colônias apresentam características morfológicas diferentes, as quais permitem a distinção entre os microrganismos, como mostra a Figura 2. No entanto, para conseguir uma visualização das colônias independentes no meio sólido, é necessário a distribuição uniforme das bactérias sobre a placa de Petri. (TORTORA et al., 2006).

Figura 2 - Morfologia de colônias bacterianas

Fonte: PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, (2002).

O isolamento inicia-se com a escolha da fonte mais provável de conter o microrganismo desejado, podendo variar desde solo até águas, ar, lodo, alimentos ou órgãos. Características que um determinado organismo possui para se desenvolver em certo ambiente são usadas como fatores seletivos no processo de isolamento.

Pressão seletiva é muitas vezes utilizada no isolamento de microrganismos que se desenvolvem preferencialmente em determinado substrato, na presença de certos compostos ou no cultivo sob condições que são adversas a outros microrganismos que não são de interesse.

Quando não é possível fazer uso da pressão seletiva, utilizam-se características detectáveis como morfologia (tipo e forma da colônia) ou produção de compostos característicos de determinada espécie (como, por exemplo, a produção de antibióticos por estreptomicetos) (STANBURY, WHITAKER E HALL, 1995).

3.5 – MEIOS DE CULTURA

Para fazer o isolamento de um microrganismo, deve-se empregar o meio de cultivo mais adequado para o seu desenvolvimento. O meio de cultura é um material nutriente preparado em laboratório cuja utilização é importante para o crescimento, transporte e estocagem de microrganismos. No preparo do meio muitas vezes emprega-se o ambiente natural como modelo de composição, pois os requerimentos nutricionais dos microrganismos refletem o tipo de ambiente onde ele é encontrado (PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002).

Os meios de cultivo podem ser classificados em: meios sintéticos (quimicamente definidos) e meios complexos. Os meios sintéticos são aqueles em que a composição química exata é conhecida. Alguns microrganismos necessitam de um meio definido com muitos fatores necessário para o crescimento e são denominados fastidiosos ou muito exigentes em termos nutricionais. Meios quimicamente definidos são utilizados normalmente em trabalhos experimentais em laboratórios ou para o crescimento de seres autotróficos (TORTORA et al., 2006).

Já os meios complexos são aqueles que apresentam algum componente que tem uma composição variável. Nesse caso estão incluídos extratos de leveduras, de carne, de plantas ou produtos da digestão protéica como peptonas. Quando o meio complexo está na forma líquida é chamado de caldo nutriente e quando está na forma solidificada é chamado de ágar nutriente. Esses meios são utilizados normalmente para bactérias heterotróficas e fungos (TORTORA et al., 2006). Meios complexos também são usados quando as necessidades nutricionais de um microrganismo em particular não são conhecidas e, portanto, um meio definido não pode ser construído (PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002).

No caso de microrganismos anaeróbios deve-se utilizar um meio especial denominado meio redutor. Eles contêm reagentes como o tioglicolato de sódio que é capaz de se combinar com o oxigênio dissolvido, eliminando-o da cultura (TORTORA et al., 2006).

Meios de cultivo que propiciam o desenvolvimento de vários tipos de microrganismos são chamados de meios de uso geral, como o *tryptic soy broth*. Quando esses meios são complementados com algumas substâncias de forma a fortificá-lo, temos então um meio enriquecido.

Quando há substâncias que favorecem o crescimento de determinado organismo e/ou inibem o de outros no meio, eles passam a serem chamados de meios seletivos. Nesses meios há componentes como sais de bile e cristal violeta (inibem o desenvolvimento de

bactérias gram-positivas), substratos degradados somente por alguns tipos de microrganismos, ou antibióticos (PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002).

Os meios de cultivo também podem ser diferenciais quando é possível distinguir de alguma forma os diferentes tipos de microrganismos. Por exemplo, no ágar sangue é possível separar bactérias hemolíticas (que formam um halo ao seu redor) de não-hemolíticas (que não formam halo), ou no ágar MRS com corante azul de anilina, onde as bactérias lácteas irão ficar azuladas e outros microrganismos não.

Também existem os meios de enriquecimento, que são utilizados no isolamento de bactérias presentes em pequeno número junto com outras que estão em grande quantidade. Ele é semelhante ao meio seletivo, sendo que a diferença é que o microrganismo a ser cultivado está em pequena quantidade e seu crescimento deve ser estimulado (TORTORA et al., 2006). O Quadro 1 resume todos esses meios e em que ocasiões eles devem ser utilizados.

Quadro 1 - Meios de Cultura

Tipo	Finalidade
Quimicamente definido	Crescimento de quimioautotróficos e autotróficos e análises microbiológicas.
Complexo	Crescimento da maioria dos organismos quimio-heterotróficos.
Redutor	Crescimento de anaeróbios obrigatórios.
Seletivo	Impedir o crescimento de microrganismos não desejados; favorecer o crescimento do organismo de interesse.
Diferencial	Diferenciar colônias do organismo de interesse dos outros microrganismos.
Enriquecimento	Semelhante ao seletivo, mas com a característica importante de aumentar o número de bactérias de interesse tornando-a detectável.

Fonte: TORTORA et al., (2006).

3.5.1 – MEIOS DE CULTURA PURA PARA BACTÉRIAS

Ao fazer o isolamento das culturas, não só de bactérias, mas também de outros microrganismos, deve-se fazer uma coleta de material ambiental com instrumentos estéreis. Bactérias existem em grande variedade na natureza, e cada tipo necessita de um meio de isolamento diferente. Algumas necessitam ágar suplementado com extratos de carne na concentração de 10 a 50% do volume total, outras necessitam de infusões feitas do material onde foram coletadas (solo, lama, folhas, pedras, troncos, detritos). Podem ser usados também alguns meios seletivos como ágar sangue, verde bile brilhante, MRS, ou McConkey (DEMAIN e DAVIES, 1999).

3.5.2 – MEIOS DE CULTURA PURA PARA FUNGOS

Fungos podem ser isolados de diversos materiais. Devido à sua preferência por substratos que também forneçam suporte para o seu crescimento, eles são freqüentemente encontrados em matéria em decomposição, plantas, rochas e solo. Em uma planta, por exemplo, dependendo do tecido que for coletado, pode-se encontrar diferentes tipos de fungos.

Esses microrganismos também são bastante variados, e a mudança de somente um dos constituintes de um meio de cultivo pode resultar no isolamento de um fungo diferente. Para a seleção de um meio, deve-se considerar as condições físicas do meio de origem e o tipo de fungo que se deseja. A luminosidade também é um fator importante às vezes, pois alguns fungos necessitam de luz para frutificarem (DEMAIN e DAVIES, 1999).

3.6 – ISOLAMENTO EM CULTIVO SÓLIDO

Esse método é usado para o isolamento de certos produtores de enzimas, usando meios seletivos contendo o substrato que podem ser degradados pelas enzimas produzidas pelos microrganismos desejados.

Os estudos iniciais realizado pelo bacteriologista alemão Robert Koch foram muito importantes para a obtenção de culturas puras. Antigamente, as tentativas de cultivos eram feitas somente através de meios líquidos, sendo assim muito difícil isolar microrganismos como bactérias. Em 1881, Koch fez uma tentativa de cultivo sólido em superfície de batata. Por volta do mesmo tempo, um associado de Koch, Frederick Loeffler, desenvolveu o extrato de carne peptonado para o cultivo de bactérias patogênicas, e Koch tentou solidificar esse meio (PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002). Ele conseguiu através da mistura do meio com gelatina em um suporte sólido que permitia a sua solidificação, mas tinha a desvantagem de se liquefazer à temperatura superiores a 28°C e ser degradada por várias espécies microbianas que possuem gelatinase (LECLERC et al., 1983).

Por volta do ano de 1882, passou-se a se utilizar ágar como agente solidificante, que foi descoberto por Minora Tarazaemon, um japonês dono de uma hospedaria, ao perceber que uma sopa de algas tinha gelificado após uma noite fria (PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002). Outro agente solidificante é o ácido silícico, o qual é quimicamente definido. Ele é importante na preparação de meios que devem ser rigorosamente definidos (LECLERC et al., 1983).

3.6.1 – TÉCNICA DE SEMEADURA POR ESTRIAS

Esse método também é chamado de esgotamento de alça. Por meio de uma alça metálica ou um fio de metálico ou até mesmo um *swab*, coleta-se uma pequena parcela do meio de inóculo e o espalha sobre uma placa de Petri com ágar fazendo movimentos em zigue-zague, formando um caminho na forma de estrias. Existem várias possibilidades de fazer essas estrias, sendo ela descontínua ou contínua (DROVAL, LIMA e HABU, 2001). A forma descontínua seria feita como mostrado na Figura 3, onde são feitas estrias na porção 1

da placa e em seguida flamba-se a alça; após, faz-se uma retirada de bactérias da região 1 e espalha-se sobre a região 2; flamba-se mais uma vez e espalha-se bactérias da região 2 na 3. As colônias presentes na região 3 estarão mais isoladas (TORTORA et al., 2006).

Fazendo de forma contínua, haveria primeiramente a coleta de uma pequena quantidade do meio de semeadura e iniciar-se-ia as estrias em uma das bordas da placa e percorreria o fio de platina continuamente na forma de estrias até a outra borda da placa (DROVAL, LIMA, HABU, 2001). LECLERC e colaboradores (1983) descrevem a semeadura por estrias feita em duplicata em uma mesma placa, percorrendo a alça ou fio de platina somente até o centro da placa, e do lado oposto fazendo o mesmo procedimento. As colônias isoladas estarão mais ao centro e, através da repetição, poder-se-ia obter microrganismos que estavam presentes na segunda amostra do inóculo, porém não presente na primeira.

Figura 3 - Semeadura por estrias com alça de platina



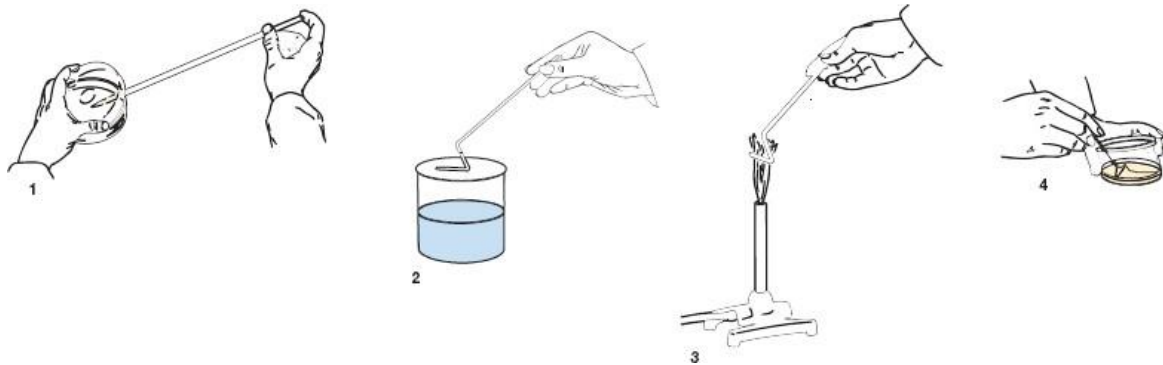
Fonte: PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, (2002).

3.6.2 – TÉCNICA DE SEMEADURA POR ESPALHAMENTO

Nessa técnica, que é mostrada na Figura 4, um pequeno volume da solução de microrganismos contendo de 30-300 células é transferido para o centro de uma placa de ágar já solidificado com o auxílio de uma pipeta estéril. Em seguida, mergulha-se uma alça de

Drigalski em álcool e a flamba de modo a manter todo o material estéril. Com o auxílio dessa alça, espalha-se aquele volume depositado por toda a superfície do ágar. As colônias cresceram espalhadas por toda a superfície do ágar. (PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002).

Figura 4 - Semeadura por espalhamento

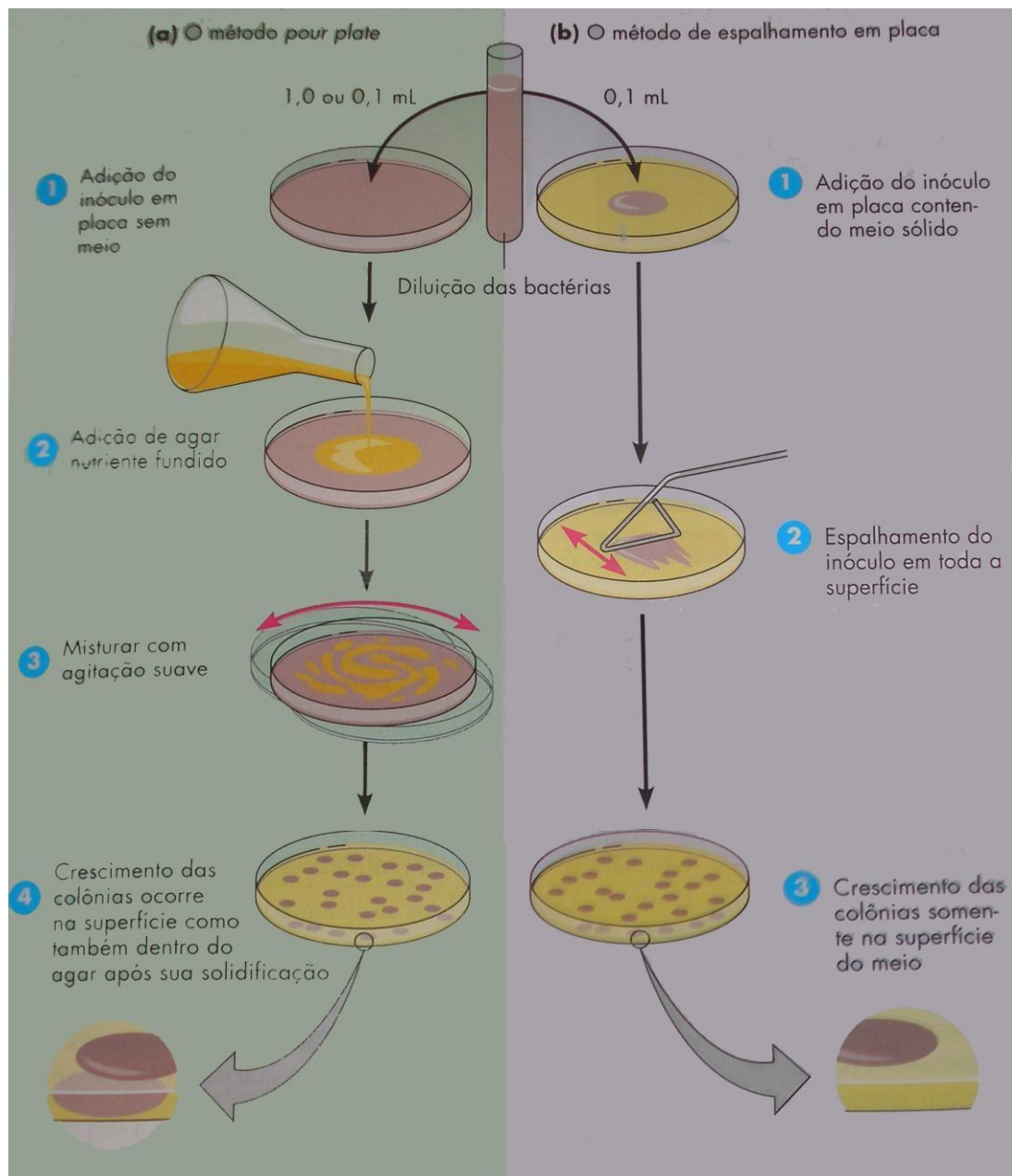


Fonte: PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002.

3.6.2 – TÉCNICA DE SEMEADURA POR DERRAMAMENTO

O método de semeadura por derramamento, ou também denominado de *pour plate* é muito utilizado para bactérias e fungos. A amostra original é diluída de forma que quando é feita a placa consegue-se colônias bem separadas. Um pequeno volume da melhor diluição é então derramado em uma placa de Petri sem ágar. Em seguida, derrama-se ágar fundido na temperatura de 45°C e mistura-se os dois com uma agitação leve da placa e deixa-se o meio solidificar.

Figura 5 - Comparação entre o método de derramamento e de espalhamento



Fonte: TORTORA et al., 2006.

Esse método permite o crescimento de colônias na superfície e dentro do ágar, pois algumas células foram misturadas no ágar durante a sua solidificação, como pode ser verificado na Figura 5, onde há a comparação do crescimento após a semeadura por *pour plate* e por espalhamento (PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002).

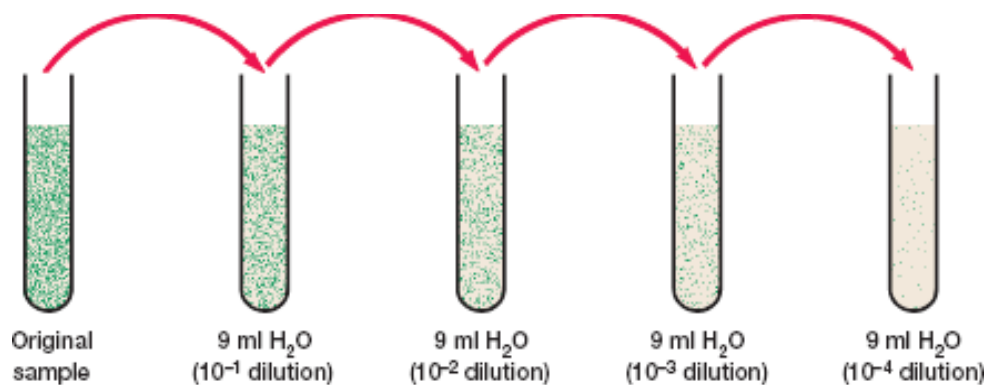
A maioria dos fungos e bactérias não é morta pela breve exposição ao ágar quente, mas microrganismos sensíveis ao calor certamente podem ser danificados pelo ágar fundido e ficarem impossibilitados de formarem colônias. Além disso, quando se deseja identificar microrganismos através da morfologia da colônia, esse método não é muito indicado, pois as colônias presentes dentro do ágar não fornecerão dados corretos. (TORTORA et al., 2006).

4 – ISOLAMENTO EM CULTIVO LÍQUIDO

Os meios de enriquecimento que propiciam um grande aumento de determinada população microbiana são geralmente líquidos. Após o crescimento avantajado então ocorre o isolamento de determinadas células. Isso pode ser feito como mostrado nas técnicas em estado sólido ou através de uma série de diluições em meio líquido.

Fazendo uma diluição em novo meio estéril, como na figura 6, espera-se que em certo momento se obterá culturas provenientes de somente uma única célula. É dessa forma que é feita o isolamento e a contagem de células de *Escherichia coli* em águas ou alimentos, por exemplo (LECLERC et al., 1983).

Figura 6 - Série de diluição para isolamento de um microrganismo.



Fonte: Adaptado de PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002.

5 - EMULSÃO

A palavra emulsão (EM) deriva do verbo latino *emulgeo*, que significa mungir, aplicando-se, de um modo geral, a todas as preparações de aspecto leitoso com as características de um sistema disperso de duas fases líquidas. Atribui-se a Grew a obtenção das primeiras emulsões para uso medicinal (PRISTA et al., 1995).

A emulsão é um sistema cineticamente estável, constituído basicamente por uma fase líquida dividida na forma de gotículas no interior de outro líquido imiscível, estabilizada por tensoativos associados ou não a co-tensoativos (OLIVEIRA et al., 2004; MCCLEMENTS, 2012; TANG et al., 2013). As emulsões podem ser obtidas de óleo em água (O / W) se gotas de óleo são dispersos em água ou água em óleo (W / O), se gotículas de água estão dispersas em óleo. O tamanho da gota está tipicamente entre 0,5 e 50 μm . Em consequência, as emulsões têm um aspecto turvo, devido ao efeito *Tyndal*, efeito óptico de espalhamento ou dispersão da luz provocado por partículas de uma dispersão coloidal (BURGUERA e BURGUERA, 2012).

Como sistemas termodinamicamente instáveis, as emulsões não se formam espontaneamente. Assim, suas propriedades dependem não apenas de condições termodinâmicas como também do método de preparo, das características de cada componente e da ordem de adição dos mesmos (LIN, KURIHARA & OHTA, 1975; SAJJADI, 2006; MCCLEMENTS, 2012; ZHANG, LIU & FAN, 2013). A sua área de superfície e a tensão interfacial é baixa e a energia livre de formação da emulsão é maior do que zero ($\Delta G > 0$) e, como tal, apresentam uma tendência a separar em seus dois componentes. A degradação física das emulsões é devido à tendência espontânea para uma área interfacial mínima entre a fase dispersa e o meio de dispersão (BURGUERA e BURGUERA, 2012).

A fase que está presente como gotículas nas emulsões é geralmente chamada de fase interna, descontínua ou dispersa, enquanto a fase na qual as gotículas encontram-se dispersas é denominada de fase externa, dispersante ou contínua. (CONSTANTINIDES, TUSTIAN e KESSLER, 2004; AULTON, 2005; MCCLEMENTS, 2012).

Para obtenção destes sistemas emulsionados, as propriedades físicoquímicas e a concentração do tensoativo são fatores relevantes para determinar o tipo de estruturas e as propriedades reológicas do sistema (FORMARIZ et al., 2010). Outra variável importante é a escolha da fase oleosa, pois, além de garantir a biocompatibilidade do sistema, deve levar a obtenção de sistemas cineticamente estáveis.

5.1 - ESTABILIDADE DAS EMULSÕES

A instabilidade física de um sistema disperso, em particular, das emulsões, é causada pela separação de fases, promovendo mudança considerável na aparência, na consistência, na redispersibilidade e na “performance” do produto (IDSON, 1993).

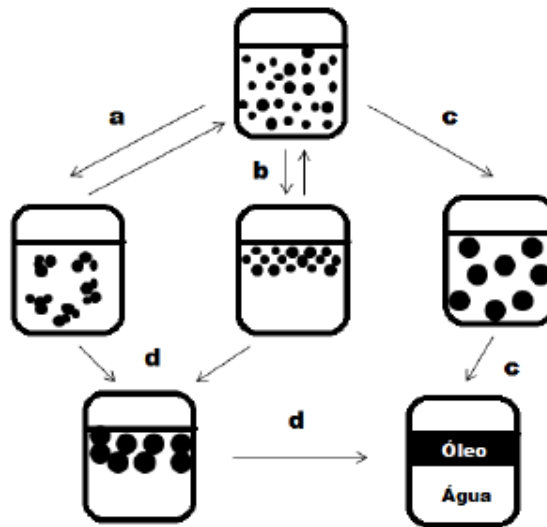
Segundo Daltin (2011) as principais propriedades que levam a separação de emulsões são:

- a diferença de densidade entre a fase óleo e a fase água que propicia a força motriz da separação de fases.
- a ascensão das gotículas de óleo em uma emulsão, decorrente da diferença de densidade entre as fases. Sendo que esta pode ser retardada pela alta viscosidade da fase contínua.
- tensão interfacial dos dois líquidos que formam a emulsão. Quanto maior a tensão interfacial dos dois líquidos que formam as emulsões, maior a energia necessária para a formação das superfícies entre as fases dessa emulsão, já que a formação de gotículas pequenas de óleo em água somente é alcançada com o aumento das superfícies.

Portanto, para manter uma emulsão estável por mais tempo, é importante evitar a coalescência das gotículas, utilizar fases com densidades mais próximas (o que nem sempre é possível) e atuar também na viscosidade da fase contínua. E também, reduzir a tensão interfacial para que se possa diminuir o tamanho das gotículas sem que seja necessária a aplicação de quantidade muito grande de energia (DALTIM, 2011).

A instabilidade pode apresentar-se sob vários mecanismos, tais como, a cremagem (*creaming*), a floculação, a coalescência ou a inversão de fases (Figura 7) (HUCK-IRIART et al., 2011; ZHANG, LIU & FAN, 2013). Pode resultar ainda, da instabilidade química como, alteração dos valores de pH, hidrólise de tensoativos, contaminação microbiana e processos fotoquímicos (AZZINI, 1999).

Figura 7 - Representação esquemática dos mecanismos de desestabilização de emulsões do tipo O/A. sendo a – floculação, b- cremagem, c- acomodação de ostwald, d- coalescência



Fonte: Adaptado de Taylor, 1998.

5.2 - EMULSIONAMENTO

Na preparação de uma emulsão, os fatores susceptíveis de influenciar os resultados finais podem ser divididos em três grupos. (DALTIM, 2011).

Grupo 1 - Variáveis de formulação: natureza do agente emulsificante e das fases aquosa e orgânica, incluindo-se a temperatura.

Grupo 2 - Variáveis de composição: proporção relativa de água e óleo e concentração do emulsionante. Estas são variáveis extensivas.

Grupo 3 - fatores mecânicos e de fluxo: tipo de equipamento utilizado, intensidade de agitação e procedimento.

A partir do momento que se tenha as condições de formulação e composição definidas, é necessário realizar o processo físico ou físico-químico para a dispersão de uma fase em outra. Há três formas básicas de proceder a um emulsionamento, cada uma delas baseadas em um princípio diferente, a primeira delas consiste em produzir agitações mecânicas e de fluxo, utilizando agitadores de hélice ou turbina, homogenizadores, moinhos coloidais, dispersores ultrassônicos e dispersores de fluxo; a segunda forma consiste em colocar as gotas da fase interna no meio da fase externa por um processo essencialmente

físico, como a condensação de vapor por redução da temperatura ou a formação de dispersões por precipitação de soluções saturadas. Este processo é utilizado em casos e substâncias bastante específicos. E a terceira forma é a emulsificação espontânea, em que ocorre a formação de gotículas de fase interna em uma fase externa sem a necessidade de grande agitação mecânica (DALTIM, 2011).

Estudos de estabilidade devem ser realizados durante as diferentes etapas do desenvolvimento da formulação, a fim de fornecer dados que irão permitir a seleção do produto que será seguro, estável e efetivo (CADWALLADER, 1989). Segundo Rieger (1996), para a rápida avaliação da estabilidade da emulsão, as condições de estresse mais utilizadas são a centrifugação e a temperatura. O teste de centrifugação é de grande interesse, já que possibilita informação muito rápida e comparável sobre as propriedades de estabilidade de diferentes emulsões (WITTERN et al., 1985).

A centrifugação permite verificar a estabilidade, possibilitando observar rapidamente a separação de fases da dispersão, avaliando a coalescência ou a cremação, podendo dessa forma, prever se o produto irá separar em função do tempo. É uma ferramenta que permite avaliar, em curto espaço de tempo, possíveis instabilidades físico-químicas das formulações. Neste teste, pode-se constatar rapidamente a separação das fases da dispersão avaliando a coalescência ou cremação exibidas pelas formulações (AZZINI, 1999; CADWALLADERR, 1989; IDSON, 1993b; SILVA & SOARES, 1996).

O aumento da temperatura aumenta a solubilidade em água de emulsionantes aniônicos e reduz a solubilidade dos tensoativos não iônicos. Além disso, o aumento de temperatura diminui a viscosidade do sistema emulsionado, o que aumenta a taxa de coalescência e a quebra de emulsão (DALTIM, 2011).

4 – MATERIAS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Bioengenharia e Microbiologia ambiental, localizados em, Centro De Tecnologia-CT e Biotecnologia, respectivamente, na Universidade Federal da Paraíba.

4.1 - MATERIAIS

Os materiais escolhidos para este trabalho são:

- Diesel Comum;
- Gasolina Comum;
- Amostra de solo próximo as bombas de abastecimento;
- Óleo lubrificante de motor à combustão;
- Óleo de algodão ;

4.2 - MÉTODOS

4.2.1 – PONTOS DE COLETA

As coletas foram realizadas em postos de gasolina na Região Metropolitana de João Pessoa-PB. Deu-se preferência por estabelecimentos cujo estado de conservação fosse comprometido, atendendo os critérios estabelecidos pelos pesquisadores, a saber: 1- estado de conservação visualmente comprometido: considerando a fácil identificação de ferrugem nas bombas e/ou estruturas metálicas de sustentação, pisos quebrados ou rachados, presença de manchas de óleo e/ou vazamento de combustíveis ou vazamento de água; e 2- localização do estabelecimento, caracterizado por: presença de corpos hídricos e vegetação no entorno e

fluxo grande de clientes. Correspondendo ao perfil delineado, o total de 7 postos foi selecionado, sumarizados no quadro 2, quanto à localização de acordo com o sistema de posicionamento global localização do Google®.

Quadro 2 - Localização dos pontos de coleta com sucesso no isolamento

Posto de gasolina	Localização	Total de isolados
1	7°07'58"S 34°51'37"W	3
2	7°07'42"S 34°52'06"W	2
3	7°06'51"S 34°53'24"W	3
4	7°10'57"S 34°54'03"W	1
5	7°08'32"S 34°55'15"W	2
6	7°07'48"S 34°51'04"W	2
7	7°07'40"S 34°51'41"W	4

Fonte: Google maps (2015).

4.2.2 - AMOSTRAS

Nos postos de gasolina foram obtidos dois tipos de amostras: do solo arenoso e do combustível estocado nos tanques, coletados diretamente da bomba, gasolina comum e óleo diesel adicionado de biodiesel. As amostras foram coletadas na parte da manhã, sob condições assépticas segundo metodologias descritas por Genhardt et al. (1994) e Passman (2003). Do solo foram tomadas porções cerca de 80-100g entre a superfície e 15 cm de profundidade, da área central, próximo às bombas e/ou da área do entorno do posto, considerada nesse estudo, toda área descoberta, limitadas por muros, cercas ou vias de tráfego (Figura 8).

Figura 8 - Pontos considerados para coleta das amostras de solo nos postos de gasolina: área central próxima às bombas (A) e entorno (B). Figura adaptada de Tankstellen



Fonte : <<http://images.modhoster.de/system/files/0049/6659/huge/tankstelle-zum-einbauen.jpg>>. Acessado em 30 maio 2015.

As amostras foram acondicionadas em coletores apropriados esterilizados. Dos combustíveis líquidos, cerca de 1,0-1,5L das amostras foram adquiridas e tomadas diretamente das bombas para sistemas coletores compostos de frasco pluma âmbar, dotado de batoque e tampa rosqueada e um funil de vidro, previamente autoclavados. O material era encaminhado diretamente para o processamento das análises microbiológicas no Laboratório de Microbiologia Ambiental.

4.2.3 - ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E ISOLAMENTO

As amostras do solo e dos combustíveis foram tratadas visando obter culturas mistas pelo método do enriquecimento empregado por Del'Arco e de França (1999). Cerca de 10 g do solo proveniente das áreas de coleta foram transferidos para frascos contendo 100 mL de caldo nutriente e incubadas sob agitação de 150 rpm, durante 24h à 30°C. Após o período, uma alíquota do caldo, no qual a microbiota se desenvolveu promovendo turvação do meio foi

diluída e semeada por esgotamento, por sobre a superfície do meio apropriado, adicionado de antibiótico, conforme o grupo de interesse: bactérias heterotróficas (agar nutriente + 50 mg/L de nistatina) e fungos filamentosos e leveduras (agar Sabouraud + 50 mg/L de amoxicilina). As placas foram incubadas à 30°C por 48 a 72h, respectivamente e as colônias obtidas foram isoladas, purificadas e mantidas em agar inclinado, sob refrigeração à 4°C, com manutenção por meio de repiques periódicos.

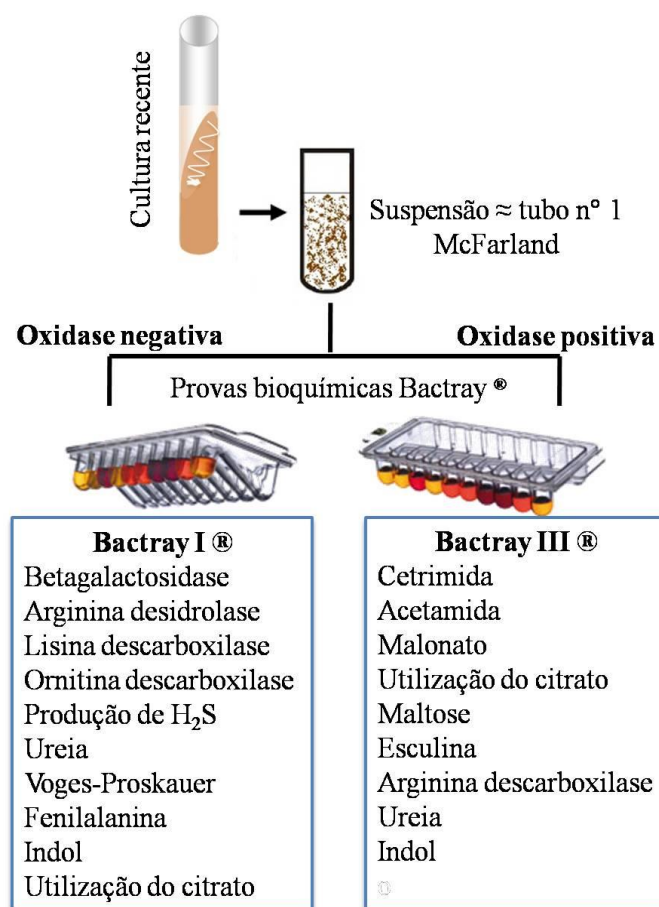
Para a obtenção de culturas mistas das amostras de gasolina e óleo diesel, foi utilizado o método descrito por Brown et al. (2010). Sistemas de isolamento foram confeccionados em frascos cônicos com capacidade para 500 mL de modo que proporção de óleo, água e meio fosse de 100:25:25. Sendo assim, a mistura dos sistemas de isolamento era formada por 50 mL do combustível, 12,5 mL de água destilada e 12,5 mL de meio mineral, com a seguinte composição: K_2HPO_4 (0,5g/L); $(NH_4)_2SO_4$ (0,5 mg/L); $MgSO_4$ (0,5 g/L); $FeCl_2$ (10 mg/L); $CaCl_2$ (10 mg/L); $MnCl_2$ (0,1 mg/L) e $ZnSO_4$ (0,01 mg/L); traços de extrato de levedura e vitaminas do complexo B2, pH 7,2±0,2. Para as amostras contendo gasolina, foi adicionado à mistura, NaCl 10g/L. Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm por 14 a 30 dias à 30°C, até a formação de massa microbiana na interface da fase oleosa com a fase aquosa e/ou turbidez na fase aquosa.

A viabilidade da microbiota desenvolvida foi conhecida por meio da transferência de uma alíquota da fase aquosa dos sistemas de isolamento para tubos contendo meio enriquecido (caldo nutriente adicionado de antibióticos) e incubados por 24h à 30°C. A observação da turbidez caracterizava a viabilidade e os isolados foram obtidos por meio da semeadura por estriamento nos meios para bactérias e fungos. As colônias foram purificadas e mantidas sob refrigeração à 4°C, com manutenção realizada por meio de repiques periódicos.

4.2.4 – IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Nesta etapa, foi utilizado o *kit* Bactray® de identificação bioquímica (Laborclin, Pinhais, Brasil), cujo procedimento de utilização está apresentado na Figura 9, abaixo.

Figura 9 - Protocolo de identificação bioquímica dos isolados bacterianos.



Fonte - Elaboração própria , (2015).

Inicialmente foi realizado um teste para atividade da enzima citocromo oxidase, aplicando uma amostra de cultura recente por sobre a fita reagente (Laborclin, Pinhais, Brasil) à temperatura ambiente. A coloração azul formada em até dois minutos indicou resultado positivo para o teste, enquanto o não surgimento de coloração, um resultado negativo. Em seguida, foram confeccionadas suspensões das culturas recentes, equivalentes ao tubo nº 1 da escala de McFarland ($\approx 3 \times 10^8$ UFC/mL) e 1 mL da suspensão transferido para a bandeja contendo os substratos referente ao resultado positivo para atividade da citocromo oxidase (Bactray III®) ou negativo (Bactray I®). Os sistemas foram levados para incubação à 37°C por 24h e o resultado comparado à uma tabela cuja sequência numérica identificou a espécie com certeza considerada, excelente se $\geq 99,9\%$; muito boa se $\geq 99\%$, boa se $\geq 90\%$ e aceitável se $\geq$

80%, disponível no sistema de identificação versão *web Bactray* Laborclin disponível em: <<http://www.laborclin.com.br/bactray/default.asp>>.

4.2.5 – IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

A identificação foi realizada pela, Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa, Centro de biotecnologia, UFPB. Utilizou-se o método do microcultivo (GENHARDT et al., 1994). Inicialmente os micro-organismos foram repicados em tubos de ensaio contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose, onde a cultura foi mantida à temperatura ambiente durante 15 dias e em seguida, sob refrigeração à 4° C.

Fragmentos da cultura fúngica foram inoculados no centro da placa de Petri, contendo o meio de cultura específico. Em seguida, as placas foram mantidas em temperatura ambiente. As observações foram realizadas por 15 dias em intervalos de 48h, exceto no último dia, quando o intervalo foi de 24h. As mensurações foram conduzidas com régua milimetrada e empregadas para a construção de um gráfico para a observação do crescimento radial.

Para avaliação das microestruturas foi realizada a técnica de cultura em lamínula. Fragmentos da colônia fúngica foram colocados estrategicamente sobre o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose, contidos em placas de Petri, e cobertos com uma lamínula previamente flambada. Após o crescimento, as lamínulas foram retiradas a cada 24 horas e colocadas invertidas sobre uma lâmina contendo o corante lactofenol azul de algodão e observada ao microscópio óptico.

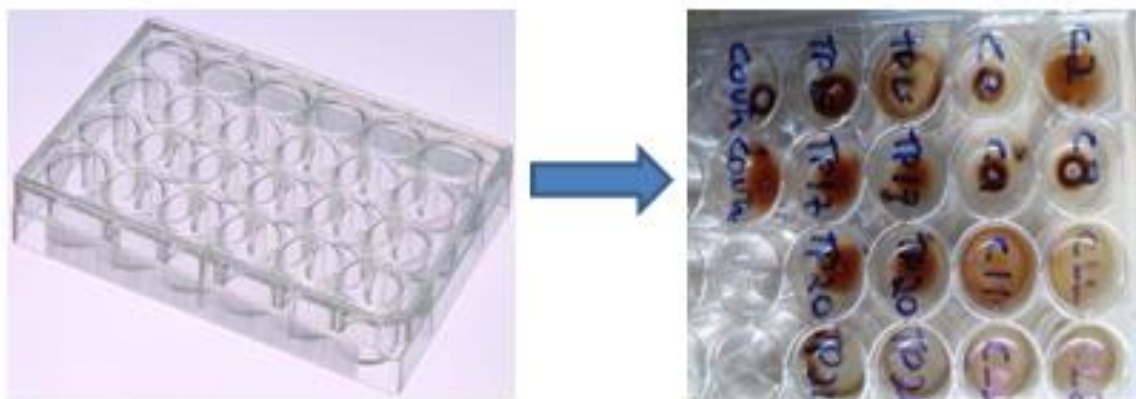
4.2.6 – DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO

Foram realizados dois ensaios de caracterização do potencial de utilização dos hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia à temperatura ambiente. Apenas as linhagens identificadas foram testadas.

4.2.7 – TESTE DE COLAPSO DA GOTA DE ÓLEO

O primeiro teste, qualitativo, verificou a utilização de óleo lubrificante em sistema de microdiluição segundo o método descrito por Hanson, Desai e Desai (1993). Cada poço na placa foi preenchido com 1,5 mL do meio mineral e posteriormente foram transferidos 25 μ L da suspensão microbiana originada de cultura recente, 10 μ L de óleo lubrificante usado e 1,5 μ L da solução indicadora 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). O sistema foi incubado à temperatura ambiente por até 10 dias, com observações periódicas, em intervalos de 24h até o desaparecimento da coloração azul do indicador. O resultado do teste foi considerado positivo pela alteração da coloração de azul para incolor, assim como pelo colapso da gota do óleo.

Figura 10 - Ilustração do procedimento de degradação de hidrocarbonetos em multipoços.

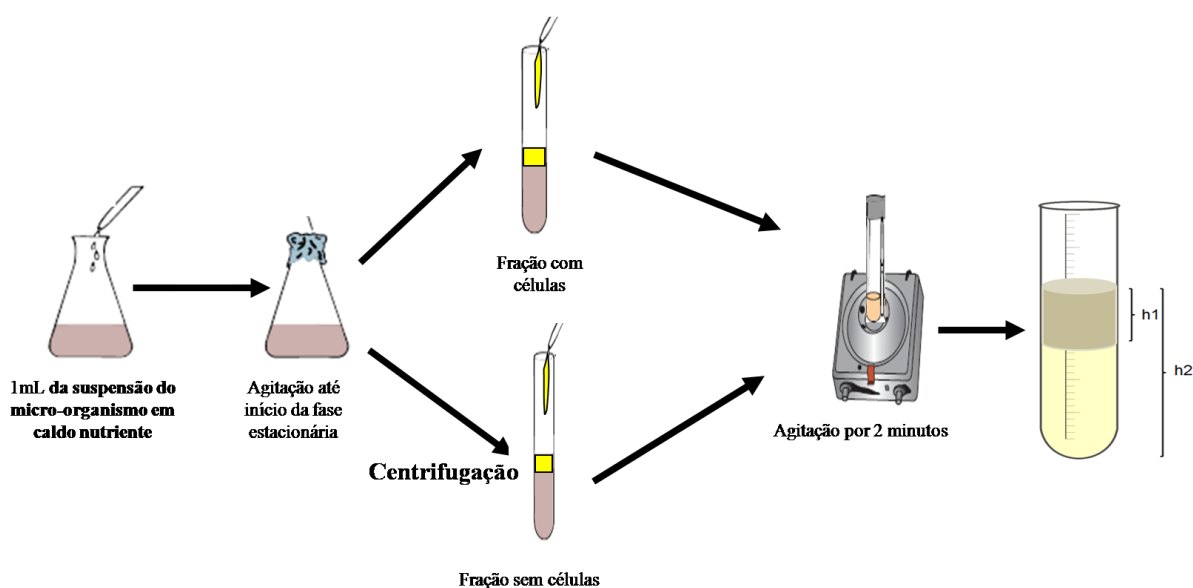


Fonte: Elaboração própria.

4.2.8 – ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

O segundo ensaio determinou o índice de emulsificação (E_x) utilizando o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987), conforme apresentado na Figura 11, abaixo.

Figura 11 - Protocolo do ensaio de emulsificação do óleo



Fonte : Elaboração Própria

O teste é realizado em tubos de ensaio contendo as fases aquosa e oleosa, na proporção 3:2, respectivamente. A presença de agentes emulsificantes e ou surfactantes na fase aquosa foi estudada de duas formas, uma fração contendo as células íntegras do fermentado (F1) e a segunda, sem células (F2), correspondente ao sobrenadante após centrifugação do fermentado a 1006 xg por 5 minutos. Para a fase oleosa foram utilizados óleo diesel e óleo lubrificante usado. O controle do teste empregou óleo de algodão gentilmente cedido pela Embrapa-Algodão. Com as fases aquosa e oleosa misturadas, os tubos foram agitados vigorosamente por 2 minutos e em seguida deixados em repouso. A cada 24h por um período de 3 dias seguidos, foram coletadas os valores da altura da camada de emulsão e altura do volume total. O E_{24-72} foi determinado a partir da medida da altura da

camada da emulsão, dividida pela altura do volume total no tubo, multiplicado por 100, equação (1).

O índice de emulsificação foi obtido pela seguinte relação:

$$E_{24} = \frac{H_{emulsão}}{H_t} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

E_{24} = índice de emulsificação após 24h (%)

$H_{emulsão}$ = Altura da emulsão

H_t = Altura total

Com o objetivo de avaliar a estabilidade por um tempo maior para a emulsão formada, o índice de emulsificação também foi verificado para o tempo de 48 e 72 horas para cada ensaio.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS HIDROCARBNOCLÁSTICOS

5.1.1 – BACTÉRIAS

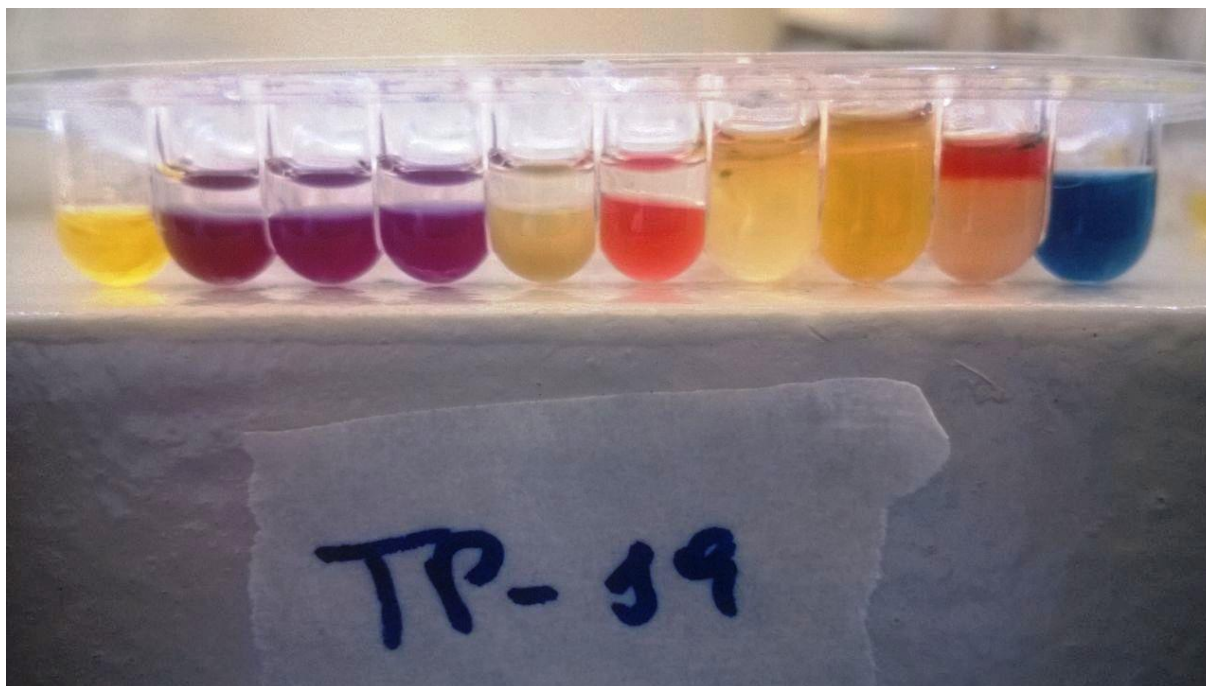
Foram isoladas oito linhagens bacterianas provenientes do solo de quatro postos de combustíveis e estão apresentados no Quadro 3, abaixo.

Quadro 3 - Bactérias isoladas nas amostras originadas dos postos de gasolina

Origem	Linhagem	Certeza do kit de identificação bioquímica (%)
Posto 1(gasolina)	<i>Acinetobacter baumannii</i> TP15	100,0
Posto 6 (solo)	Linhagem TP16	NI
Posto 6 (solo)	<i>Aeromonas hydrophila</i> TP17	100,0
Posto 3 (solo)	Linhagem TP18	NI
Posto 7 (solo)	Linhagem TP19	NI
Posto 7 (solo)	<i>Citrobacter freundii</i> TP20	99,9
Posto 7 (solo)	<i>Burkholderia cepacia</i> TP21	100,0
Posto 7 (solo)	Linhagem TP22	NI

NI – não identificada pelo kit Bactray®

Figura 12 - Processo de identificação da bactéria TP-19, utilizando o Kit battery 3



Fonte: Elaboração própria, (2015).

A metade dos isolados foi identificada como bacilos Gram-negativos, sendo três deles, não fermentadores (TP15, TP17 e TP21) e uma enterobactéria (TP20). A literatura sobre os organismos ditos hidrocarbonoclásticos é ampla e todos os gêneros identificados já foram descritos utilizando diferentes hidrocarbonetos, incluindo óleo cru e petroderivados (PRINCE, 2005). Por outro lado, a outra metade dos isolados bacterianos hidrocarbonoclásticos não pode ser identificada pelo *kit* bioquímico, entretanto, tratavam-se de bacilos Gram-negativos oxidase positiva.

5.1.2 – FUNGOS

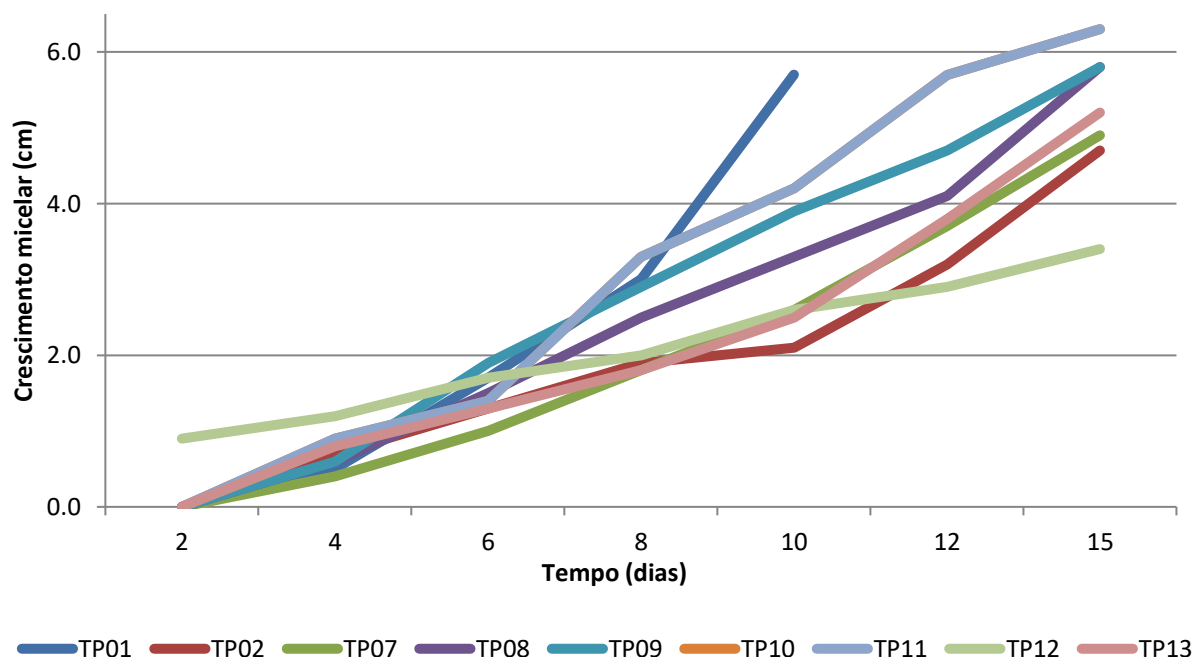
Nas condições oferecidas neste estudo, foi possível obter 9 isolados de pelo menos três gêneros distintos do Filo Ascomycota (Quadro 4).

Quadro 4 - Fungos filamentosos isolados nos postos de gasolina

Origem	Linhagem
Posto 2 (óleo diesel)	<i>Paecilomyces</i> sp TP01
Posto 1 (solo)	<i>Penicillium</i> sp TP02
Posto 1 (solo)	<i>Penicillium</i> sp TP07
Posto 2 (óleo diesel)	<i>Paecilomyces</i> sp TP08
Posto 4 (solo)	<i>Aspergillus</i> sp TP09
Posto 5 (solo)	<i>Aspergillus</i> sp TP10
Posto 5 (solo)	<i>Aspergillus</i> sp TP11
Posto 3 (solo)	<i>Aspergillus</i> sp TP12
Posto 3 (solo)	<i>Aspergillus</i> sp TP13

O crescimento micelial dos isolados fúngicos, com exceção de TP01 (*Paecilomyces* sp.) foi avaliado durante 15 dias em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose (figura 13). O isolado TP01 apresentou um crescimento mais rápido. Ao oitavo dia de crescimento ocupou toda a superfície do meio de cultura contido na placa de Petri. Estes resultados indicaram que o meio de cultura utilizado foi eficaz para induzir o crescimento e esporulação em temperatura ambiente ($\pm 30^{\circ}\text{C}$), pois garantiram o suprimento nutricional necessário para os diferentes isolados fúngicos, favorecendo o desenvolvimento *in vitro*.

Figura 13 - de crescimento micelar em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose

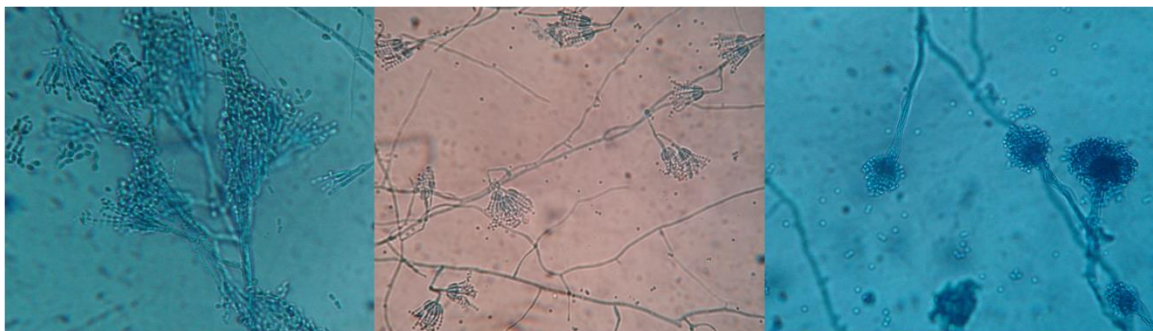


Fonte – Elaboração Própria, (2015).

As estruturas vegetativas e reprodutivas presentes nos diferentes isolados fúngicos foram analisadas pela técnica de cultura em lamínula. Para todos os isolados, nas primeiras 24 horas foram evidenciados apenas a formação do micélio ramificado. A partir das 48 horas foi constatada a diferenciação micelial onde foram identificadas diferenças morfológicas entre as estruturas vegetativas e reprodutivas dos diferentes isolados.

Os isolados TP01 e TP08, provenientes do óleo diesel apresentaram conidióforos simples e em ramos verticilados com duas a quatro fiálides. As fiálides apresentam uma porção basal intumescida e uma porção alongada as quais produzem e sustentam os conídios elipsóides. Características identificadas em espécies do gênero *Paecilomyces*. Os isolados TP02 e TP07 apresentaram-se biverticilados, com conidióforos, métulas e fiálides rugosos, nas quais estão distribuídos conídios esféricos. Estruturas características do gênero *Penicillium*. Nos isolados TP09, TP10, TP11, TP12 e TP13 foram identificados estruturas características do gênero *Aspergillus* tais como: conidióforos simples distribuídos em forma de cachos e dispostos sobre uma vesícula, conforme a Figura 14 abaixo.

Figura 14 - Aspectos microscópicos destacando as estruturas micelares e reprodutivas das linhagens TP01 (*Paecilomyces* sp.), à esquerda; TP02 (*Penicillium* sp.), ao centro; e TP11 (*Aspergillus* sp.), à direita.



Fonte - Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa, Centro de biotecnologia, UFPB.

Os conídios são elementos reprodutivos de origem assexuada capazes de resistir às condições adversas, e de germinar sob condições favoráveis, garantindo a propagação da espécie (VIDOTTO, 2004). Os diferentes tipos morfológicos de conídios encontrados nos isolados de *Paecilomyces* sp, *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp são caracterizados como ectosporos porque são formados nas extremidades de hifas especiais, denominadas de conidióforos (BERGAMIN FILHO et al., 1995). A disposição dos conidióforos, estruturas onde estão depositados os conídios e a forma dos conídios são características taxonômicas essenciais para distinguir as espécies dentro dos distintos gêneros (ALVES, 1998).

Paecilomyces sp, *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp são gêneros pelos quais a literatura registrou como fungos filamentosos hidrocarbonoclásticos, isolados de amostras de solos contaminados, petroderivados ou do óleo cru (CHAGAS-SPINELLI et al., 2010; MANCERA-LÓPEZ et al., 2008).

5.2 – DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS EM MULTIPOÇOS

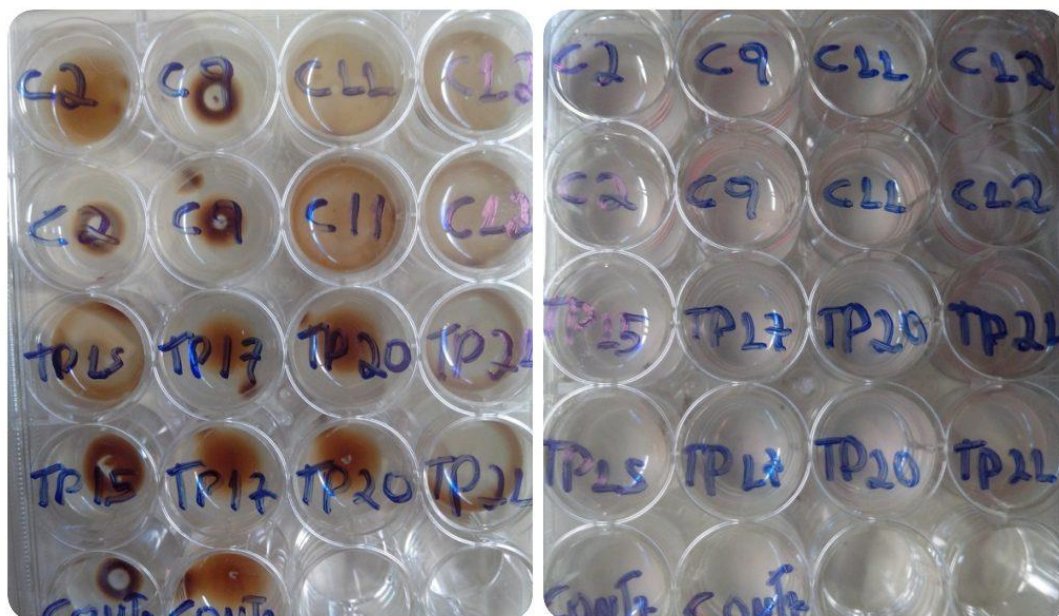
O ensaio avaliou de forma qualitativa o potencial de degradação de oito linhagens. Dos isolados identificados, 4 bactérias (TP15, TP17, TP20 e TP21) e 4 fungos filamentosos (TP02, TP09, TP11 e TP12) foram submetidos ao teste em placas de microdiluição. A escolha das linhagens foi baseada no fato do isolamento em solo, à exceção de TP15 (*A. baumannii*), proveniente de amostra de gasolina comum. A habilidade das linhagens em utilizar diferentes hidrocarbonetos foi detectada pela observação do desaparecimento da coloração azulada do indicador 2,6-diclorofenol indofenol – DCPIP (Figura 15), ocorrida entre 48 e 96h após o início do bioprocessamento (Quadro 5).

Quadro 5 - Tempo observado para o meio perder a coloração azul do indicador*

Linhagens	Óleo lubrificante usado	Óleo diesel
<i>Penicillium</i> sp. TP02	Dia 3	Dia 2
<i>Aspergillus</i> sp. TP09	Dia 4	Dia 3
<i>Aspergillus</i> sp. TP11	Dia 2	Dia 3
<i>Aspergillus</i> sp. TP12	Dia 2	Dia 3
<i>Acinetobacter baumannii</i> TP15	Dia 3	Dia 2
<i>Aeromonas hydrophila</i> TP17	Dia 3	Dia 2
<i>Citrobacter freundii</i> TP20	Dia 3	Dia 3
<i>Burkholderia cepacia</i> TP21	Dia 3	Dia 4

* DCPIP - 2,6-diclorofenol indofenol

Figura 15 - Descoloração tempo dependente do 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) por diferentes linhagens microbianas durante o crescimento em óleo lubrificante usado (esquerda) e óleo diesel (direita) ao terceiro dia do ensaio.



Fonte – Elaboração própria

Observou-se que apenas a linhagem TP20 (*C. freundii*) consumiu igualmente os hidrocarbonetos em 72h. Por outro lado, em 50% das linhagens, maior tempo foi demandado para utilização do óleo lubrificante e cerca de 38% para o óleo diesel. Este último por ser composto por um maior número de moléculas alifáticas quando comparado ao óleo lubrificante, uma fração mais pesada obtida nas operações de refino do óleo cru, rica em naftenos. Preferencialmente micro-organismos utilizam hidrocarbonetos nesta ordem: n-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos de baixa massa molecular > alcanos cíclicos (LEAHY e COLWELL, 1990).

Entre os fungos filamentosos, a degradação do óleo lubrificante ocorreu em menor tempo, se comparada ao óleo diesel. Duas linhagens de *Aspegillus* sp (TP11 e TP12) sobressaíram ao *Penicillium* sp (TP02). Isto é explicado pelo fato do primeiro substrato ter mais compostos aromáticos em sua composição, os quais enzimas inespecíficas fúngicas agem, desestabilizando as ligações químicas, utilizando-os preferencialmente como fonte de carbono (ROMERO et al., 2010). As linhagens TP02 e TP09 careceram de mais tempo para degradar o óleo lubrificante, sugestivo da preferência por parte destas linhagens, por compostos alifáticos.

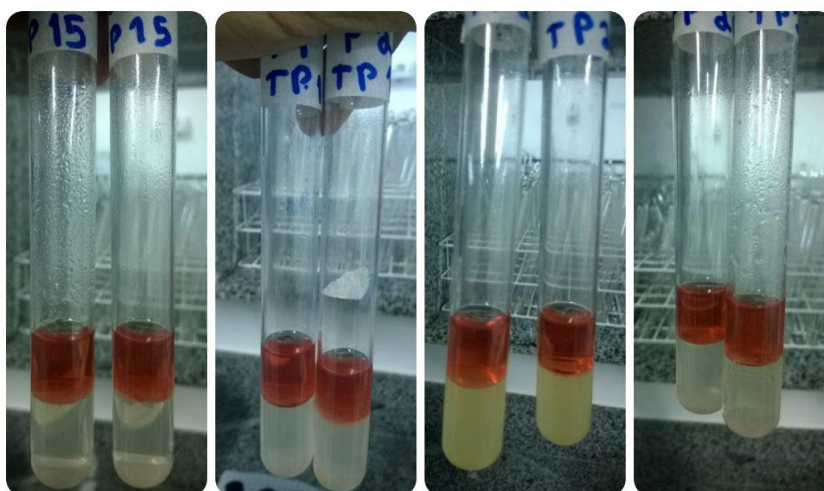
As linhagens bacterianas demandaram mais tempo para degradar o óleo de motor (72h) se comparado ao óleo diesel (de 48 a 96h), exceto TP21 (*Burkholderia cepacia*) que pode ter sido mais sensível aos aditivos presentes no óleo diesel ou ter relação a origem do seu isolamento, um posto de gasolina (posto 7) apresentando vazamentos de óleo visíveis, sugestivo de exercer pressão seletiva na microbiota residente.

5.3 – TESTE ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

5.3.1 – BACTÉRIAS

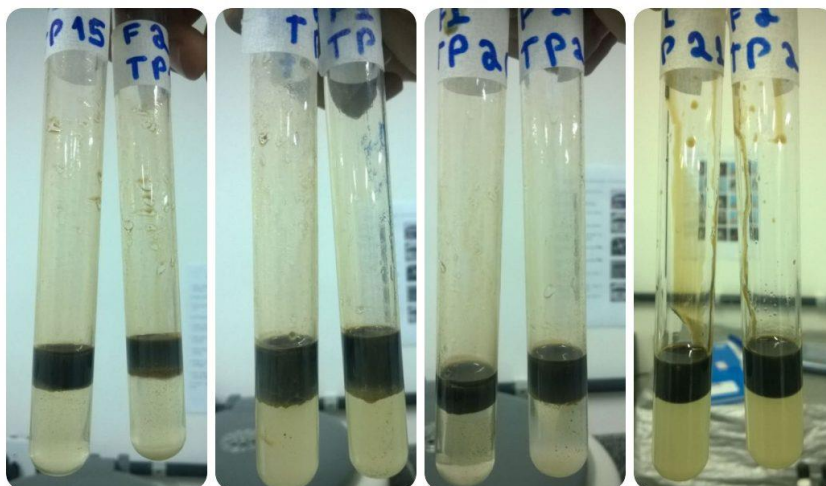
O ensaio prestou-se para uma avaliação quantitativa do potencial degradador das mesmas linhagens (TP15, TP17, TP20 E TP21) testadas nos sistemas de microdiluição. Duas frações aquosas foram avaliadas, uma contendo células (F1) e sem células (F2). Os aspectos dos tubos de ensaio para as primeiras 48h do experimento, então representados nas Figuras 16, 17 e 18, respectivamente.

Figura 16 - Formação da emulsão em óleo diesel e fração com células (F1) e sem células bacterianas (F2), respectivamente, às 48h do início do ensaio.



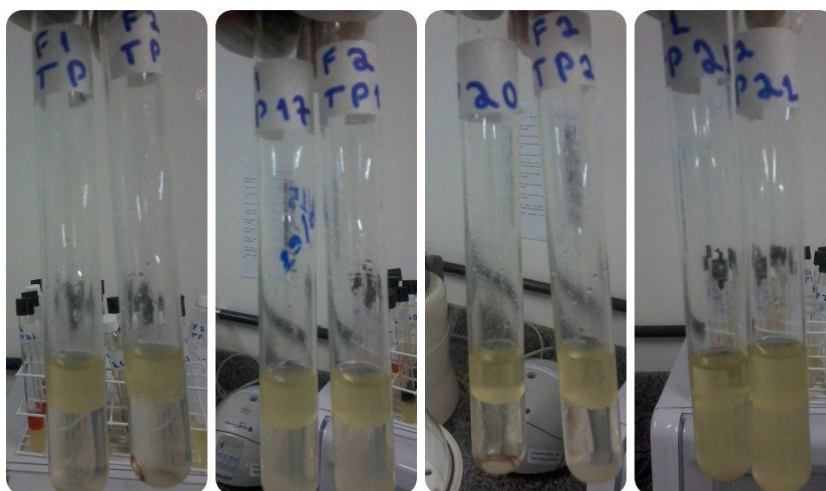
Fonte - Elaboração própria, (2015).

Figura 17 - Formação da emulsão em óleo de motor e fração com células (F1) e sem células bacterianas (F2), respectivamente, às 48h do início do ensaio.



Fonte - Elaboração própria, (2015).

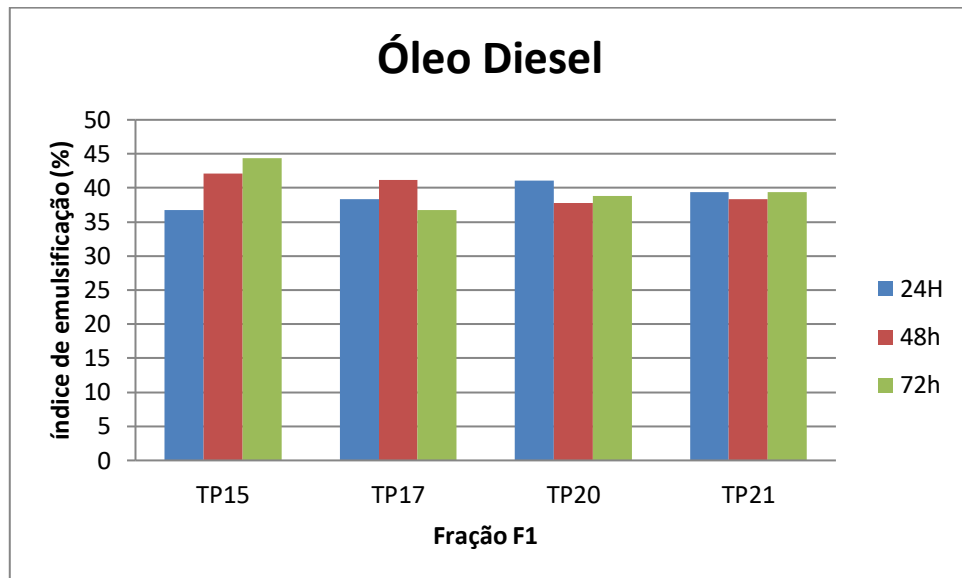
Figura 18 - Formação da emulsão em óleo de algodão e fração com células (F1) e sem células bacterianas (F2), respectivamente, às 48h do início do ensaio.



Fonte - Elaboração própria, (2015).

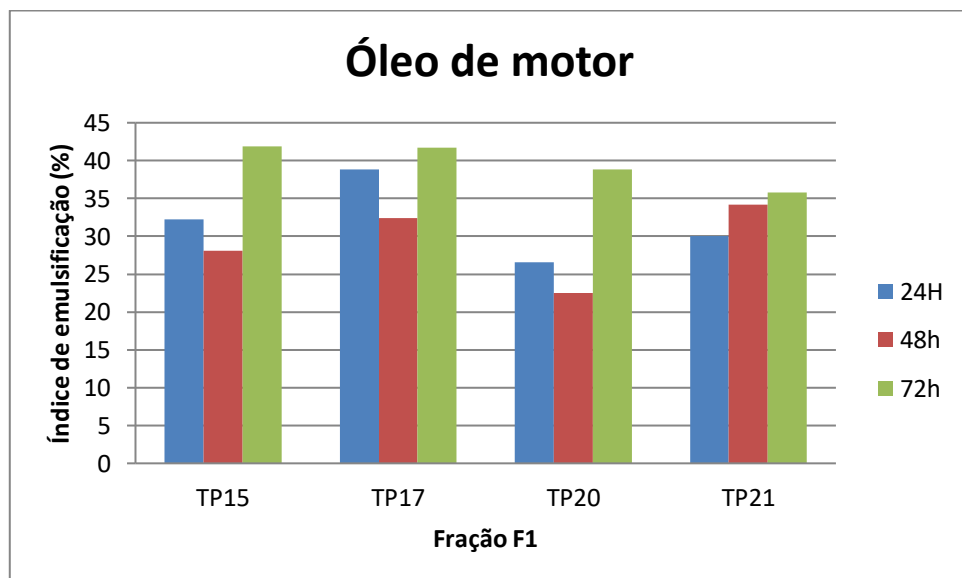
Os resultados dos índices de emulsificação para o experimento em um tempo total de até 72h, com as linhagens bacterianas nas frações F1 estão apresentados nas Figuras 19, 20 e 21, respectivamente.

Figura 19 - Índice de emulsificação do óleo diesel em linhagens bacterianas nas frações F1



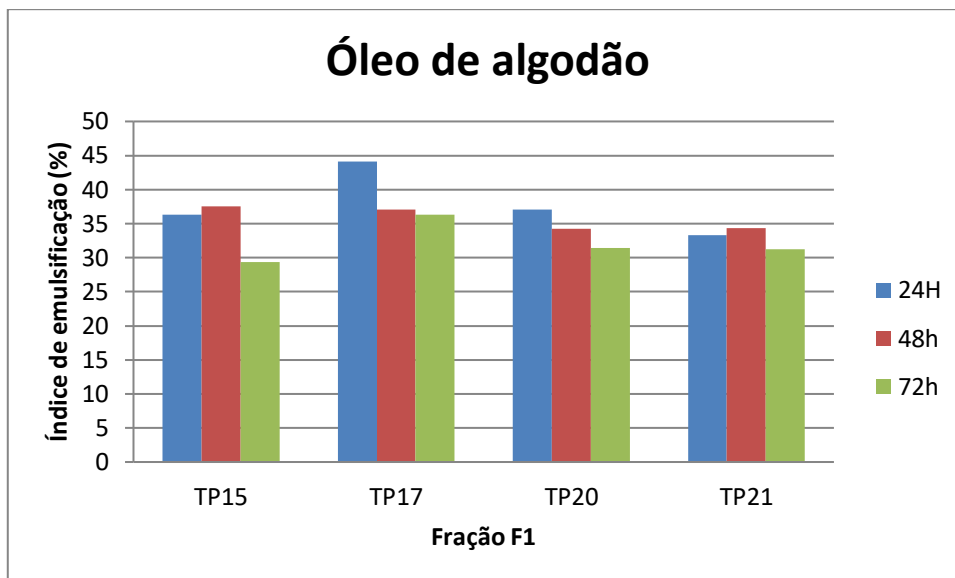
Fonte - Elaboração própria, (2015).

Figura 20 - Índice de emulsificação do óleo de motor em linhagens bacterianas nas frações F1



Fonte - Elaboração própria, (2015).

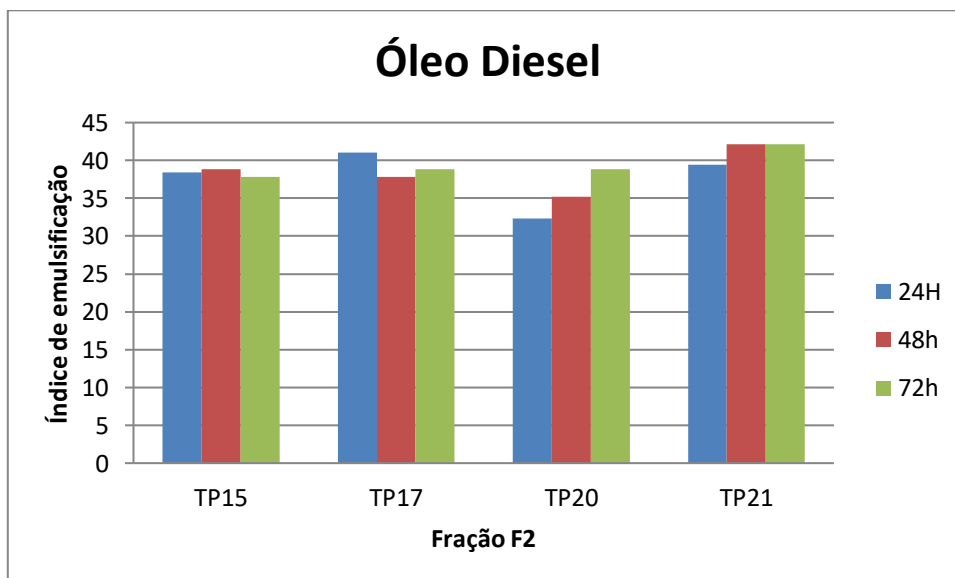
Figura 21 - Índice de emulsificação do óleo de algodão em linhagens bacterianas nas frações F1



Fonte - Elaboração própria, (2015).

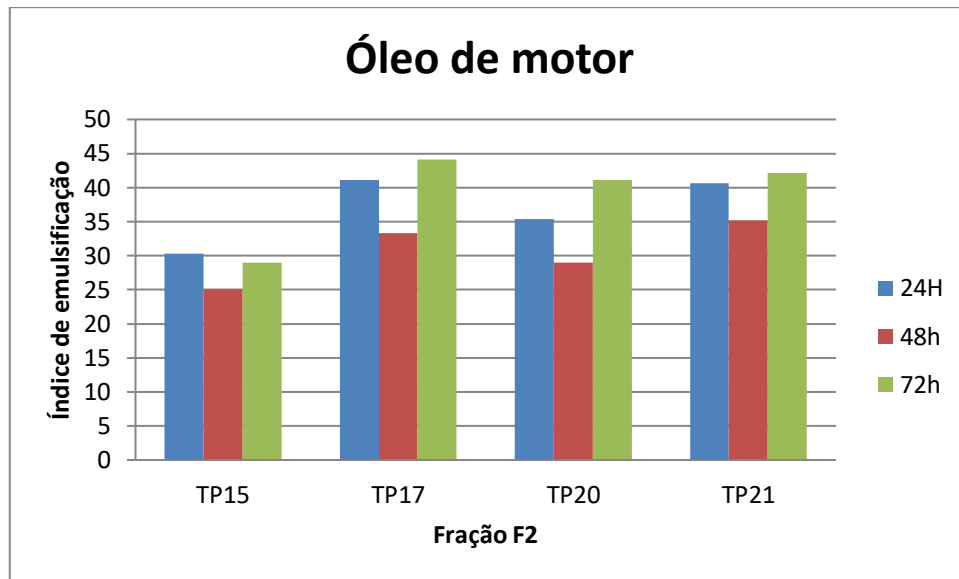
Os resultados dos índices de emulsificação para o experimento em um tempo total de até 72h, com as linhagens bacterianas nas frações F2 estão apresentados nas Figuras 22, 23 e 24, respectivamente.

Figura 22 - Índice de emulsificação do óleo diesel em linhagens bacterianas nas frações F2



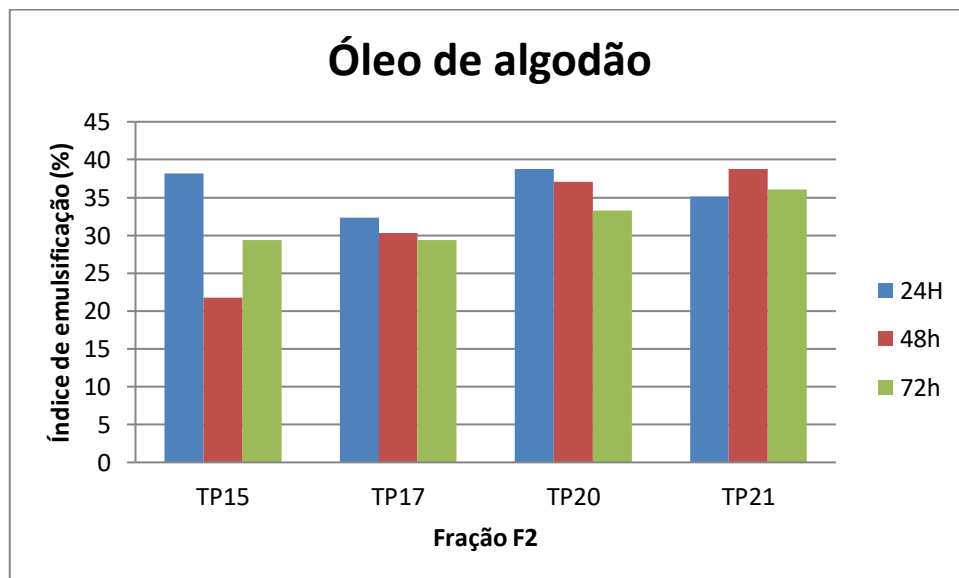
Fonte - Elaboração própria, (2015).

Figura 23 - Índice de emulsificação do óleo de motor em linhagens bacterianas nas frações F2



Fonte - Elaboração própria, (2015).

Figura 24 - Índice de emulsificação do óleo de algodão em linhagens bacterianas nas frações F2



Fonte - Elaboração própria, (2015).

As linhagens bacterianas apresentaram um índice de emulsificação crescente tanto para o óleo diesel como para o óleo lubrificante, atingindo valores iguais ou superiores a 40% em 72h. especialmente nas linhagens TP17, TP21 e TP20, observou-se que os melhores resultados foram alcançados nas frações sem as células, entretanto similares aos obtidos com a fração contendo as células íntegras. Este resultado pode ser explicado pela síntese e excreção de agentes tensoativos, bem como constituintes da parede dessas bactérias (COOPER e GOLDENBERG, 1987).

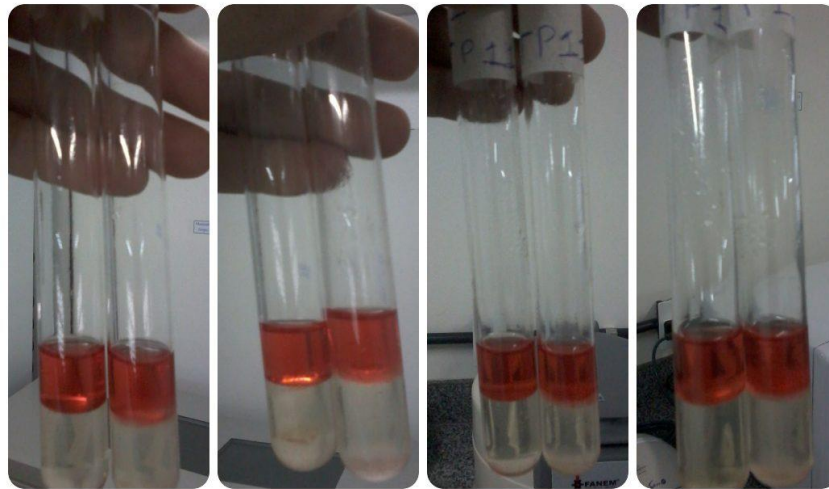
Os principais tensoativos produzidos por micro-organismos pertencem a diferentes classes de moléculas cujas propriedades podem ser emulsificantes e/ou surfatantes. Tais substâncias interagem diretamente com o óleo ou na interface óleo/água facilitando a dissolução e assimilação dos hidrocarbonetos, sem prejuízos para a bactéria. Todo biosurfatante é um bioemulsificante, entretanto, nem todo bioemulsificante é um biosurfatante (SINGH; VAN HAMME e WARD, 2007).

É importante ressaltar que os maiores índices de emulsificação em t=72h coincidem com os resultados do ensaio nos sistemas de microdiluição, ou seja, no terceiro dia, o indicador DCPIP modificou de azul para incolor. No controle, o índice de emulsificação foi discretamente inferior, possivelmente em função da presença do gossipol no óleo de algodão, substância naturalmente encontrada, sem efeito tóxico em bactérias, especialmente Gram-negativas, porém mais pronunciada frente a fungos filamentosos (WANG et al., 2009).

5.3.2 – FUNGOS FILAMENTOSOS

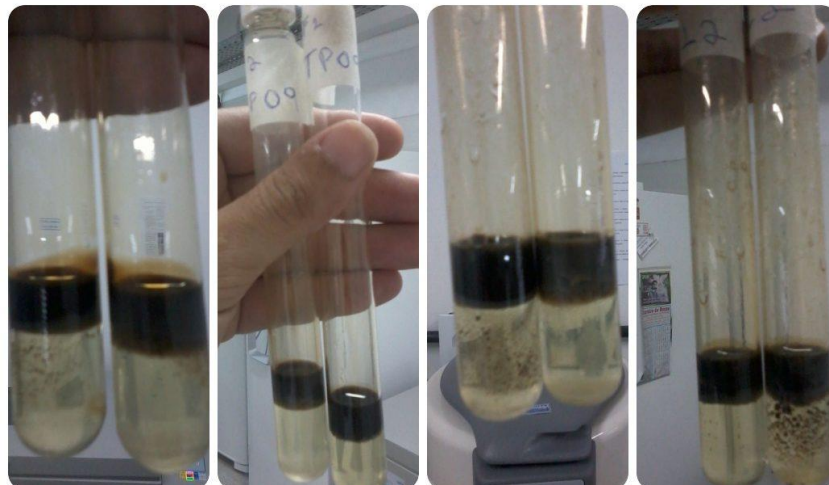
Devido a problemas técnicos, ficou impedido a realização do teste de degradação com os fungos até 72h. Então, aplicou-se o mesmo protocolo experimental para as linhagens fungicas (TP02, TP09, TP11 e TP12), onde os aspectos nos tubos de ensaio para as primeiras 48h do experimento, são representadas na Figuras 25, 26 e 27, respectivamente.

Figura 25 - Formação da emulsão em óleo diesel e fração com células (F1) e sem células bacterianas (F2), respectivamente, às 48h do início do ensaio



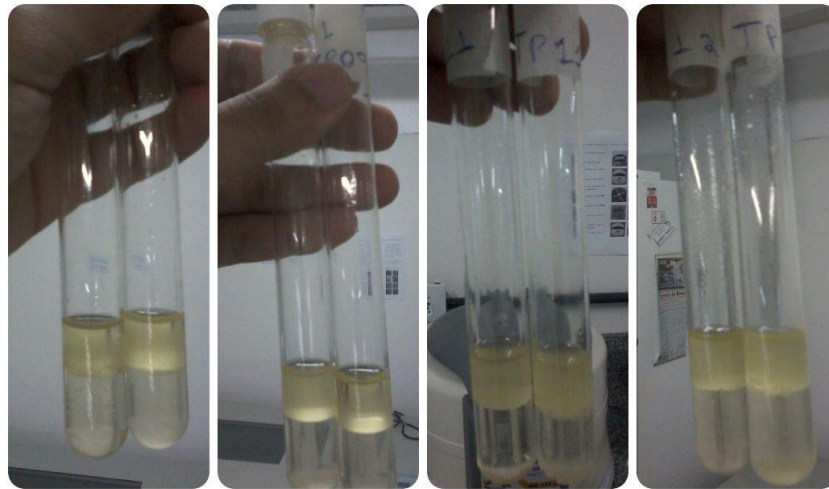
Fonte - Elaboração própria, (2015).

Figura 26 - Formação da emulsão em óleo de motor e fração com células (F1) e sem células bacterianas (F2), respectivamente, às 48h do início do ensaio



Fonte - Elaboração própria, (2015).

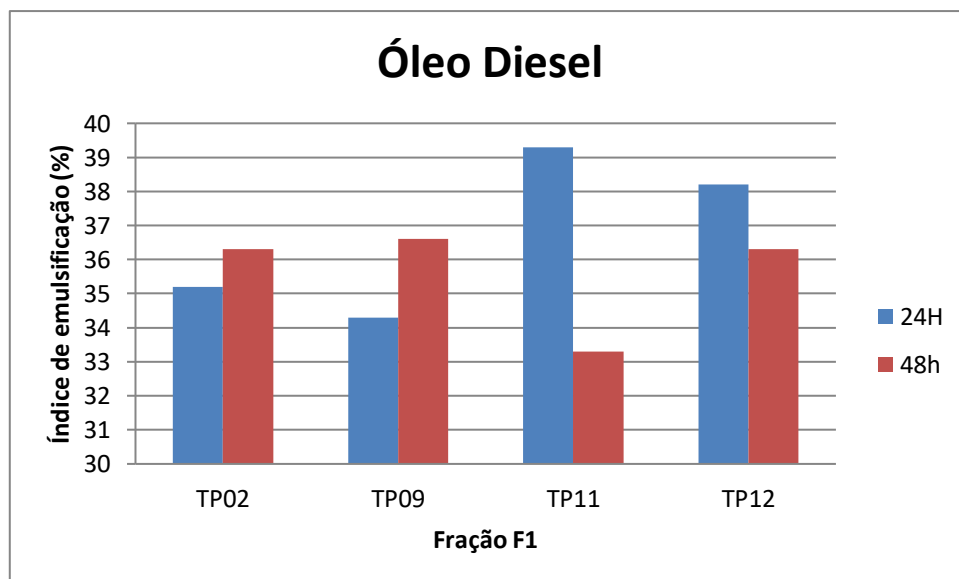
Figura 27 - Formação da emulsão em óleo de algodão e fração com células (F1) e sem células bacterianas (F2), respectivamente, às 48h do início do ensaio



Fonte - Elaboração própria. (2015).

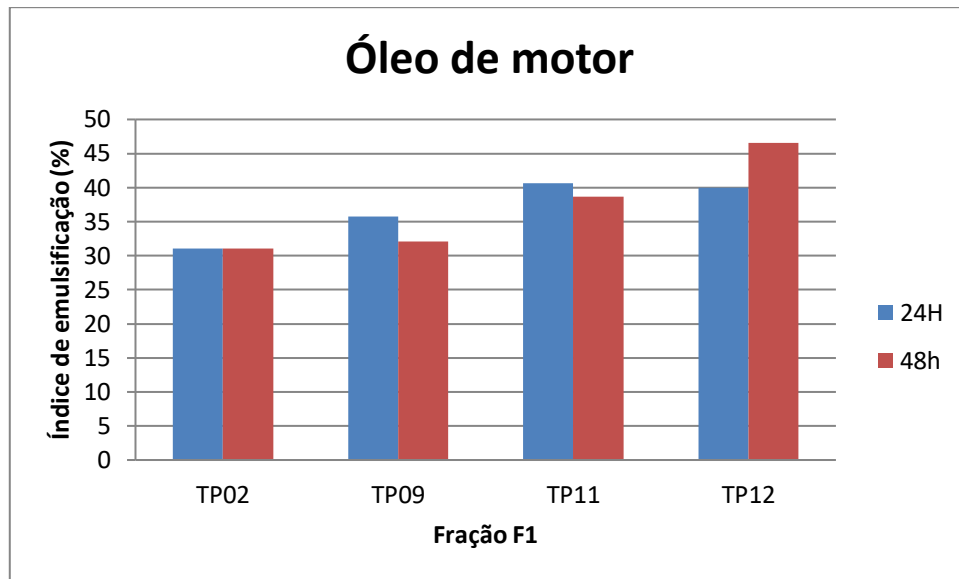
Os resultados dos índices de emulsificação para o experimento em um tempo total de até 48h, com as linhagens fungicas nas frações F1 estão apresentadas nas figuras 28, 29 e 30, respectivamente.

Figura 28 - Índice de emulsificação do óleo Diesel em linhagens bacterianas nas frações F1



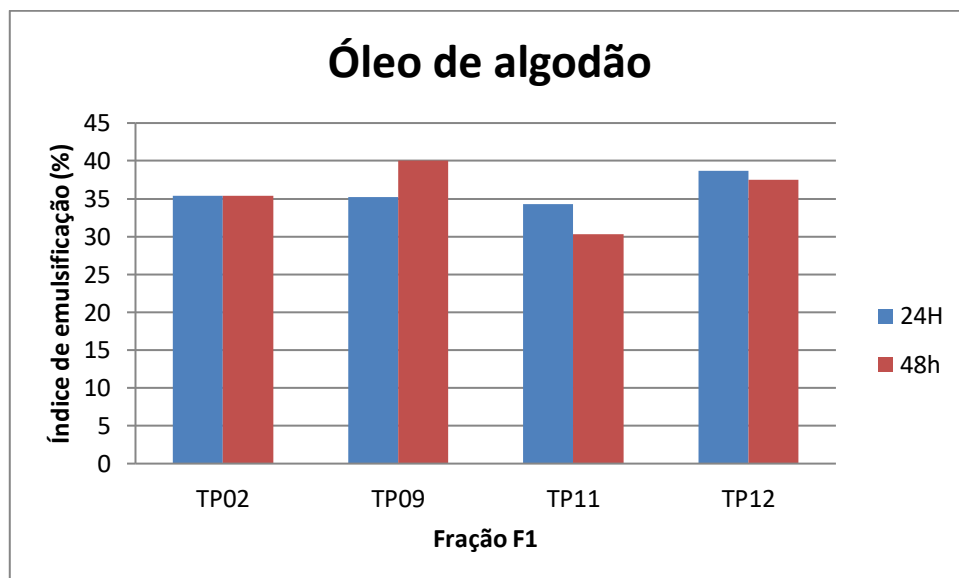
Fonte - Elaboração própria , (2015).

Figura 29 - Índice de emulsificação do óleo de motor em linhagens bacterianas nas frações F1



Fonte - Elaboração própria , (2015).

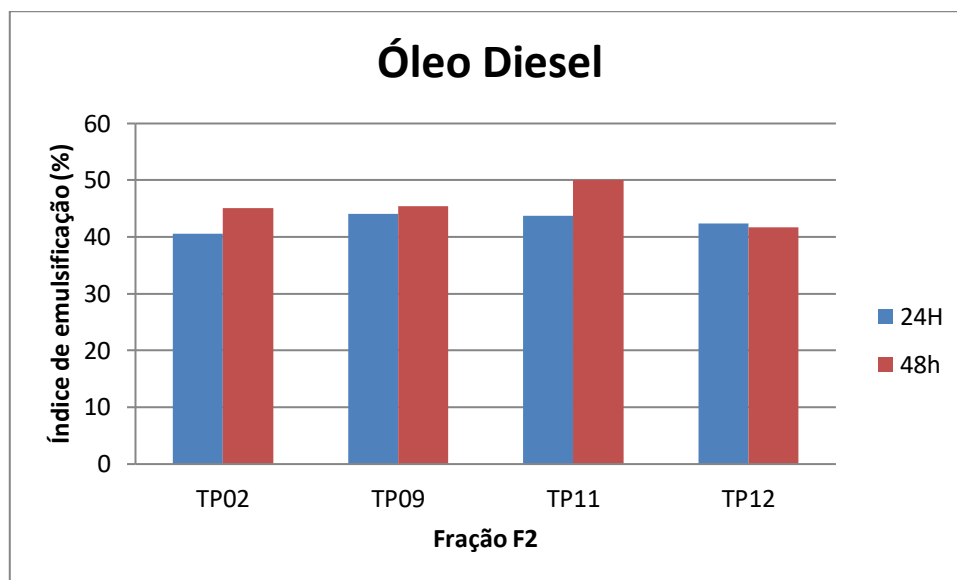
Figura 30 - Índice de emulsificação do óleo de algodão em linhagens bacterianas nas frações F1



Fonte - Elaboração própria , (2015).

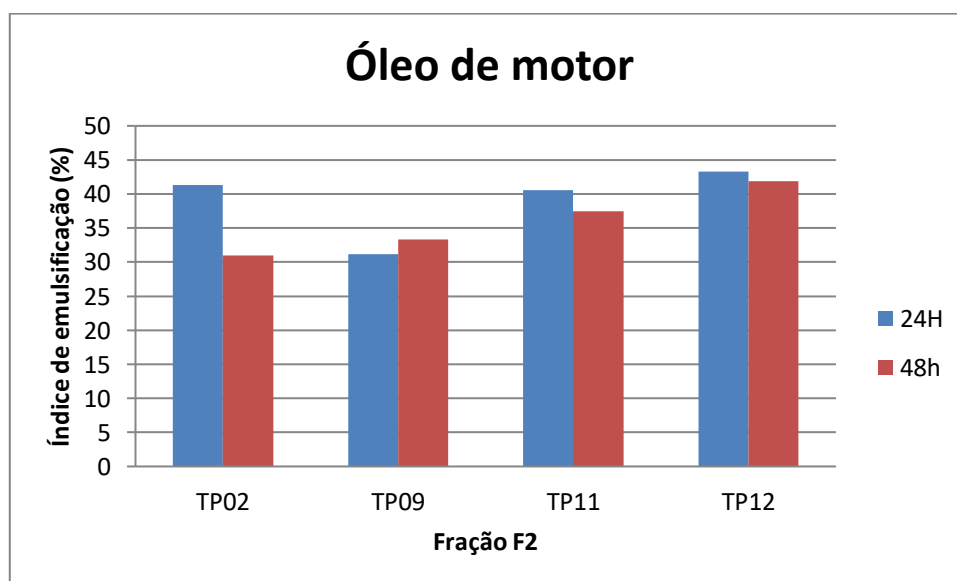
Os resultados do índices de emulsificação para o experimento em um tempo total de até 48h, com as linhagens fungicas nas frações F2 estão apresentadas nas figuras 31, 32 e 33, respectivamente.

Figura 31 - Índice de emulsificação do óleo Diesel em linhagens bacterianas nas frações F2



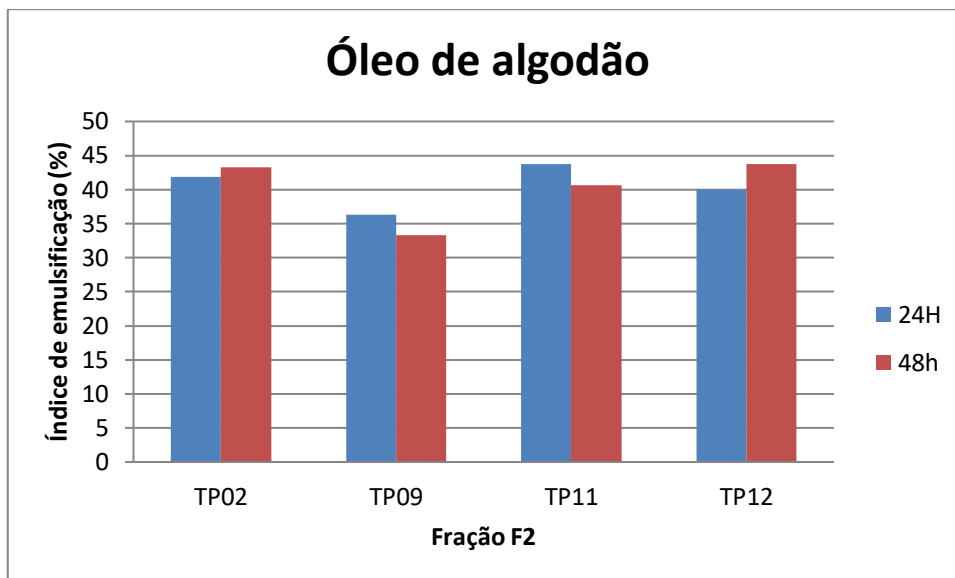
Fonte - Elaboração própria , (2015).

Figura 32 - Índice de emulsificação do óleo de motor em linhagens bacterianas nas frações F2



Fonte - Elaboração própria , (2015).

Figura 33 - Índice de emulsificação do óleo de algodão em linhagens bacterianas nas frações F2



Fonte - Elaboração própria, (2015).

Os resultados revelaram que o gênero *Aspergillus* mostrou um potencial degradador superior ao *Penicillium*. O maior índice de emulsificação dentre os micro-organismos testados foi observado na linhagem TP11, acima de 50% em t=48h, porém o padrão observado divergiu ao verificado com as bactérias, ou seja, valores inferiores a 40% e redução da estabilidade da emulsão em função do tempo, particularmente na fração com células. Isto é justificado pelo fato dos fungos serem mais sensíveis ao óleo combustível, embora sejam dotados de enzimas inespecíficas capazes de atacar moléculas complexas presentes nos petroderivados (BALLAMINUT e MATHEUS, 2007).

Por outro lado, além da linhagem TP11, TP12 atingiu índices de emulsificação em menor tempo do que o observado nas bactérias. As emulsões foram mais estáveis na presença do óleo lubrificante, para as frações com e sem células. Isto se deu possivelmente ao fato da produção de enzimas e pela presença de agentes emulsificantes na parede celular desses organismos, o que aumenta a afinidade do grupo por hidrocarbonetos (JENNINGS, 1995). Além disso, o fato da adaptação aos hidrocarbonetos presentes no óleo reproduzindo o ambiente encontrado nos postos de gasolina também deve ser considerado.

Embora o Brasil regulamente o licenciamento ambiental de postos de combustíveis e serviços, dispondo sobre a prevenção e controle da poluição, grande parte destes estabelecimentos ainda constituem um grande risco, em razão da localização, bem

como do mau estado de conservação dos tanques de armazenamento, sujeitos à corrosão química e microbiológica, contribuindo para vazamentos e resultando na contaminação do solo e alterações na biota edáfica (LINDORFER; FAZENI e STEINMÜLLER, 2014; CONAMA, 2000).

Um achado surpreendente do estudo foi a obtenção de duas linhagens de *Paecilomyces* sp. nas amostras de óleo diesel. Isto implica diretamente sobre o estado de conservação dos tanques, sinalizando o risco de contaminação do produto armazenado e por consequência, anunciando um impacto ambiental iminente. Segundo Passman et al. (2001), a ocorrência de micro-organismos hidrocarbonoclasticos nos tanques de armazenamento se fundamenta em dois aspectos: a presença de água e a capacidade de utilização do carbono proveniente do combustível. Em complemento, Gaylarde; Bento e Kelley (1999) afirmaram que a presença de uma zona intermediária entre o combustível estocado e a água carregada pela chuva constitui um meio favorável para o crescimento microbiano em tanques. A água também pode ter origem em outras diferentes fontes, tais como, a fração na composição do próprio combustível, o resíduo produzido nas operações de limpeza, impermeabilização ineficaz, condensação de gotículas do ar e penetração durante o procedimento de reposição nos tanques.

6 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, chegou-se as seguintes conclusões:

Foram identificadas bactérias Gram-negativas e fungos filamentosos (Ascomycota), isolados de amostras de solo, gasolina comum e óleo diesel coletadas nos postos de combustíveis.

Oito de um total de 17 linhagens foram testadas quanto a utilização de petroderivados como fonte de carbono e energia, em um intervalo de tempo de 48h à 96h, produziram resultado positivo na degradação dos hidrocarbonetos na presença do indicador DCPIP (2,6-diclorofenol indofenol) juntamente com o colapso da gota de óleo.

As linhagens testadas apresentaram melhores desempenhos na degradação ao óleo lubrificante usado em detrimento ao óleo diesel, no teste do índice de emulsificação.

Nas condições experimentais empregadas na seleção de micro-organismo hidrocarbonoclásticos, 3 bactérias e 2 fungos, obtiveram bons resultados e foram considerados potenciais candidatos como agentes de biorremediação.

A bactérias *Aeromonas hydrophila* foi considerada a com maior potencial biorremediador e entre os fungos, *Aspergillus* sp. se mostrou mais eficiente que *Penicillium* sp. como agente de biorremediação.

O isolamento de micro-organismos hidrocarbonoclásticos em áreas com longo histórico de contaminação, tais como postos de gasolina, cenário desta pesquisa, implica além dos possíveis prejuízos ao estabelecimento e dos consumidores, o fato de revelar potenciais agentes de biorremediação de áreas impactadas por petroderivados. Estudos futuros com os isolados poderão caracterizá-los com respeito ao potencial biodegradador e possível aplicação visando a remoção de hidrocarbonetos do petróleo em solos.

7 - REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998.

BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. *Braz J Microbiol.* v. 38, n. 2, p. 248-252, 2007.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de Fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995.

BRITO, E. M. S.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M. A. C.; WASSERMAN, J. C. A.; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res Microbiol.* v. 157, n. 8, p. 752-762, 2006.

BROWN, L. M.; McCOMB, J. P.; VANGSNESS, M. D.; BOWEN, L. L.; MUELLER, S. S.; BALSTER, L. M.; BLECKMANN, C. A. Community dynamics and phylogenetics of bacteria fouling jet A and JP-8 aviation fuel. *Int Biodeterior Biodegradation.* v. 64, p. 253-261, 2010.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J Bacteriol.* v. 41, n. 5, p. 653-673, 1941.

CHAGAS-SPINELLI, A. C. O.; KATO, M. T.; LIMA, E. S.; GAVAZZA, S. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *J Environ Man.* v. 113, p. 510-516, 2010.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução nº 273, de 29 de novembro de 2000. Estabelece diretrizes para o licenciamento ambiental de postos de combustíveis e serviços e dispõe sobre a prevenção e controle da poluição. DOU: Brasília-DF, n. 5, Seção 1, páginas 20-23, 8 jan 2001.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol.* v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

DEL'ARCO, J. P.; DE FRANÇA, F. P. Biodegradation of crude oil in sandy sediment. *Int Biodeterior Biodegradation.* v. 44, n. 2-3, p. 87-92, 1999.

DROZDOVA, S.; RITTER, W.; LENDL, B.; ROSENBERG, E. Challenges in determination of petroleum hydrocarbons in water by gas chromatography (hydrocarbon index). *Fuel*. v. 113, p. 527-536, 2013.

GALÍNDEZ-MAYER, J.; RAMÓN-GALLEGOS, J.; RUIZ-ORDAZ, N.; JUÁREZ-RAMÍREZ, C.; SALMERÓN-ALCOCER, A.; POGGI-VARALDO, H. M. *Biochem Eng J*. v. 38, n. 2, p. 147-157, 2008.

GAYLARDE, C.C.; BENTO, F.M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Rev Microbiol*. v. 30, n. 1, p. 1-10, 1999.

GENHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KIEG, N. R. Methods for general and molecular bacteriology. 1st ed. Washington: American Society for microbiology, 1994.

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

JENNINGS, D. H. The physiology of fungal nutrition. 1st. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, 622p.

JIANG, Y.; LI, Y.; KANG, X. J.; ZHOU, Q.; ZHOU, X.; ZHU, Y. Characteristics of leakage pollution of Longpan road gas station and Its enlightenment. *J Environ Protec*. v. 3, n. 1, p. 49-54, 2012.

KHAN, E.; VIROJNAGUD, W.; RATPUKDI, T. Use of biomass sorbents for oil removal from gas station runoff. *Chemosphere*. v. 57, n. 7, p. 681-689, 2004.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Rev*. v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

LINDORFER, J.; FAZENI, K.; STEINMÜLLER, H. Life cycle analysis and soil organic carbon balance as methods for assessing the ecological sustainability of 2nd generation biofuel feedstock. *Sust Energy Techonol Assess*. v. 5, Mar, p. 95-105, 2014.

MAHJOUBI, M.; JAOUANI, A.; GUESMI, A.; AMOR, S. B.; JOUINI, A.; CHERIF, H.; NAJJARI, A.; BOUDABOUS, A.; KOUBAA, N.; CHERIF, A. [Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential](#). *New Biotechnol*. v. 30, n. 6, p. 723-733, 2013.

MANCERA-LÓPEZ, M. G.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CHÁVEZ-GOMEZ, B.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; BARRERA-CORTÉS, J. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *Int Biodeterior Biodegradation*. v. 61, n. 2, p. 151-160, 2008.

PASSMAN, F.J.; McFARLAND, B.L.; HILLYER, M. J. Oxygenated gasoline biodeterioration and its control in laboratory microcosms. *Int Biodeterior Biodegradation*. v. 47, p. 95-106, 2001.

PRINCE, R. C. The microbiology of marine oil spill remediation. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Ed.) *Petroleum microbiology*. 1st. ed., Washington: ASM Press. Cap. 16, p. 317-335, 2005.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C.E.; RODRÍGUEZ, E.; BLANCO, R.; CORDERO, I.; SEGURA, D. Fungal contamination of stored automobile-fuels in a tropical environment. *J Environ Sci*. v. 10, p. 1595-1601, 2010.

ROMERO, N. C.; URRUTIA, M. I.; REINOSO, H. E.; KIERNAN, M. M. Benzo[a]pyrene degradation by soil filamentous fungi. *J Yeast Fungal Res*. v. 1, n. 2, p. 25-29, 2010.

SIVARAMAN, C.; GANGULY, A.; NIKOLAUSZ, M.; MUTNURI, S. Isolation of hydrocarbonoclastic bacteria from bilge oil contaminated water. *Int J Environ Sci Tech*. v. 8, n. 3, p. 461-470, 2011.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactant in microbiology and biotechnology part 2: application aspects. *Biotechnol Adv*. v. 25, n. 1, p. 99-121, 2007.

VIDOTTO, V. Manual de micologia médica. São José: Tecmedd, 2004.

WANG, X.; HOWELL, C. P.; CHEN, F.; YIN, J.; JIANG, Y. Gossypol – A polyphenolic compound from cotton plant. *Adv Food Nutr Res*. v. 58, p. 215-263, 2009.

WANG, H.; WANG, C.; LIN, M.; SUN, X.; WANG, C.; HU, X. [Phylogenetic diversity of bacterial communities associated with bioremediation of crude oil in microcosms](#). *Int Biodeterior Biodegrad*. v. 85, Nov, p. 400-406, 2013.

ALBUQUERQUE, H. S. et al. “Estudo da eficiência de sistemas microemulsionados na recuperação avançada de petróleo”. *Anais do 4º PDPETRO*, 2007.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. “Recommended practice for field testing water-based drilling fluids”, 13A, 1993.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. “Glossary of drilling fluid and associated terms,” 2ª edição, Bulletin D 11, 1979.

AMORIM, L. V. et al. “Rheological behavior of suspensions of bentonite clays: effects of the type of tool, speed and stirring time”. *Cerâmica*, v. 48, n. 308, p. 234-238, 2002.

ANNIS R. M.; SMITH V. M. “Drilling Fluids Technology”, *Revised Edition Exxon Company U.S.A.*, 1996.

ARAÚJO, M. M. “Preparação e caracterização de sistemas emulsionados lipídicos contendo praziquantel”. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

AUDIBERT-HAYET, A.; DALMAZZONE, C. “Surfactant system for water-based well fluids”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 288, n. 1-3, p. 113-120, 2006.

AZZINI, R. G. “Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos”. São Paulo, 1999, 169 p. dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BABADAGLI, T. et al. “A laboratory feasibility study of dilute surfactant injection for the Yibal field, Oman”. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 48, n. 1-2, p. 37-52, 2005.

BARROS NETO, E. L. “Extração de Cobre Utilizando Microemulsões: Otimização e Modelagem”. 138p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal: DEQ/PPGEQ, 1995.

BERTHOD, A. “Structures physico-chimiques des milieux disperses, micelles émulsions et microémulsions”. *Journal de chimie physique*, v. 80, p. 407-424, 1983.

BEZERRA, E. M.; RIBEIRO, P. R.; LOMBA, R. F. T.; SANTOS, O. L. A.; “Aspectos Teóricos e Experimentais Sobre o Controle de Poços com Fluidos de Perfuração Sintéticos”. ENAHPE 2006 - Encontro Nacional de Hidráulica de Perfuração e Completação de Poços de Petróleo e Gás Pedra Azul, Domingos Martins – ES, 29 a 31 de agosto de 2006.

BHARGAVA, H.N.; NARURKAR, A.; LIEB, L.M. “Using microemulsions for drug delivery”. *Pharmaceutical Technology*, v.3, p.46-54, 1987.

BINKS, B. P. et al. “Stability of oil-in-water emulsions in a low interfacial tension system”. *Langmuir*, v. 16, n. 3, p. 1025-1034, 2000.

BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. “Analytical applications of emulsions and microemulsions”. *Talanta*, v. 96, p. 11– 20, 2012.

CAENN, R., CHILLINGAR, G. V., “Drilling fluids: state of the art”, *Journal of Petroleum Science and Engineering* 14 221, 230, 1996.

CAENN, R.; CHILLINGAR, G. V. “Drilling Fluids : State of the Art.. Journal of Petroleum Science and Engineering”. USA: Westport technology Center; Civil engineering department, University of Southern California. June 1995.

CONDE, A. L., PONZETO, E. E ROSA, F., “Tensoativos: Conceitos Gerais e Suas Aplicações em Tintas”. Oxiteno, Artigos Técnicos ART TV007 – 08/03, 2003.

CONDE, A. L., “Tensoativos e Suas Aplicações em Couros. Oxiteno, Couros Artigos Técnicos”, 2003b. Disponível em <<http://www.oxiteno.com.br>> Acesso em: janeiro de 2018.

CONSTANTINIDES, P. P.; TUSTIAN, A.; KESSLER, D. R. “Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 1243–1255, 2004.

COSTA, J. M. R. et al. “Getting purified organoclays by ionic and non-ionic surfactant aiming use in oil based drilling fluids”. *Cerâmica*, v. 58, n. 348, p. 419-435, 2012.

DALTIN, D. “Tensoativos: Química, propriedades e aplicações”. 1 ed. Blucher, 2011.

DARLEY, H.C.H.; GRAY, G.R. “Composition and Properties of Drilling and Completion Fluids”. Fifth Edition, Gulf Publishing Company, Houston, Texas, 1998.

DELPECH, M. C.; MIRANDA, G. S.; SANTO, W. L. E. “Dispersões aquosas a base de nanocompósitos de poliuteranos e argilas hidrofílicas brasileiras: síntese e caracterização”. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 21, n. 4, p. 315-320, 2011.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL (DNPM), Bentonita Sumário Mineral Brasileiro (2015).

FORMARIZ, T. P.; SILVA JUNIOR, A. A. da; SCARPA, M. V.; OLIVEIRA, A. G. de. “Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer”. *Infarma* v.16, n 1-2, 2004.

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V.; SILVA JUNIOR, A. A. da; EGITO, E. S. T.; TERRUGI, C. H. B.; FRANZINI, C. M.; SARMENTO, V. H. V.; OLIVEIRA, A. G. “Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin”. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, v. 77, p. 47 – 53, 2010.

HUCK-IRIART, C.; ÁLVAREZ-CERIMEDO, M. S.; CANDAL, R. J.; HERRERA, M. L. “Structures and stability of lipid emulsions formulated with sodium caseinate”. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. v. 16, p. 412–420, 2011.

IDSON, B. “Stability testing of emulsions”, *I. Drug & Cosmetics Industry* V. 151, n. 1, p.27-28,29, 1993.

JACHNIK, R.P. 1994, “Variance in environmental legislation. Cause and effect on Drilling Fluid Research and Use”. SPE International Petroleum Conference & Exhibition of Mexico, SPE 28740, Veracruz, Mexico, 10-13 October 1994.

JACHOWICZ, J.; BERTHIAUME, M. D. “Microemulsions vs. macroemulsions in hair care products”. *Cosmetics and toiletries*, v. 108, n. 3, p. 65-72, 1993.

JORDAM, J. W., HOOK, B. J. FINLAYSON, C. M. “Organophilic bentonitas. II. Organic liquid gels”. *J. Phy. Coll. Chem.*, v. 54, n. 8, p. 1196-1207, 1950)

JOSÉ, C. L. V., “Characterization and adsorption of phenol by organophilic clays”, *International Latin-American Conference on Powder Technology* v. 3, 2001

KHAN, A. “Phase science of surfactants”. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 1, n. 5, p. 614-623, 1996.

LAWRENCE, M. J.; REES, D. G. “Microemulsions-based as novel drug delivery systems”. *Advanced Drug Delivery Review*, v. 45, p. 89-121, 2000.

LIN, T. J.; KURIHARA, H.; OHTA, H. “Effects of phase inversion and surfactant location on the formation of O/W emulsions”. *Journal of Society of Cosmetics Chemists*, v. 26, p. 121 – 139, 1975.

MACHADO, J.C.V., “Reologia e escoamento de fluidos”, Rio de Janeiro: Interciência, 2002a.

MACHADO, J. C. V. “Fluido de perfuração. Programa Trainees Petrobrás” – UM-BA/ST/EP 2002b.

MCCLEMENTS, D. J. “Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems”. *Advances in Colloid and Interface Science*. v. 174, p. 1–30, 2012.

MCCLEMENTS, D. J. “Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles”. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. v.17, p. 235–245, 2012.

MARTINS, A. B.; FERREIRA, H. S.; FERREIRA, H. C.; NEVES, G. A. “Desenvolvimento de argilas bentoníticas organofilizadas para uso em fluidos não aquosos de baixo conteúdo aromático”. 4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, Campinas, SP, (2007).

MAHTO, V., SHARMA, V.P., “Rheological study of a water based oil well drilling fluid”, *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 45 123 – 128, 2004.

MOULIK, S. P.; PAUL, B. K. “Structure, dynamics and transport properties of Microemulsions”. *Advance in Colloid Interface Science*, v.78, p. 99-195, 1998.

NETA, L. S. F. “Obtenção e estudo das propriedades de um novo fluido (gel) de fraturamento hidráulico biocompatível”. Monografia, UFRN. Natal, RN, Fevereiro, 2003.

OLIVEIRA, A. C. “Avaliação da aplicação de microemulsão, nanoemulsão e solução de tensoativo na recuperação avançada de petróleo”. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2015.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.C.; FORMARIZ, T.P. “Microemulsões: estrutura e aplicação como sistema de liberação de fármacos”. *Química Nova*, v. 27, n.1, p. 131-138, 2004.

PAUL, B. K., MOULIK, S. P. "Uses and applications of microemulsions". *Curren science*, 80, p. 990-1001, 2001

PATAKFALVI, R.; DÉKÁNY, I. "Structural properties of cationic surfactant/pentanol/water systems and their interaction with negatively charged layer silicates". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 183, p. 715-724, 2001.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. In: _____. "Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica", 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981, v. 1, p. 179-210 e 1125-81.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. "Tecnologia Farmacêutica", 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 1995.

RODRIGUES, Liana Alvares. "Síntese de nanopartículas de óxido de nióbio hidratado via microemulsão inversa". 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RIBEIRO, H.M. "Teorias de estabilidade de emulsões cosméticas". *Cosmetics & Toiletries* (ed. Port.), v. 14, n. 4, p. 88-92, 2002.

RIGO, M.; BEZERRA, J. R. M. V.; CÓRDOVA, K. R. V. "Study of temperature effect on rheological parameters of the butia pulp (*Butia eriospatha*)". *Ambiência*, v. 6, n. 1, p. 25-36, 2010.

SAJJADI, S. "Nanoemulsion Formation by Phase Inversion Emulsification: On the Nature of Inversion", *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, v. 22, n13, 2006.

SANTANNA, V. C. "Obtenção e estudo das propriedades de um novo fluido de fraturamento hidráulico biocompatível". Tese de Doutorado. UFRN. Natal, RN, 2003. 144 f. il.

SCHAFFEL, S. B. "A questão ambiental na etapa de perfuração de poços marítimos de óleo e gás no Brasil". Rio de Janeiro, 2002.

SCHRAMM, G. "A practical Approach to Rheology and Reometry". 2ª Ed. Gbreeder HAAKE GmbH, Karlsruhe, Federal Republic of Germany, 1988.

SHEN, Y, "Preparations of Organobentonite using Noionic Surfactans", *Chemosphere*, 41 (2001) 989-995.

SHIROMA P. H., “Estudo do comportamento reológico de suspensões aquosas de bentonita e CMC: influência da concentração do NaCl”. São Paulo, 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química).

SILVA, G. C. “Sistema microemulsionado: Caracterização e aplicação na indústria do petróleo”. 2011. p25. Tese (Doutorado em Química). Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.

SILVA, E.C.; SOARES, I.C. “Tecnologia de emulsões”. *Cosmetics & Toietries* (ed. Port.), v.8, n. 5, p. 37-46, 1996.

SOUZA SANTOS, P., “Tecnologia de argilas”, Ed. Edgard Blücher, Vol 3, São Paulo, 1992.

SOUZA, D. R. Q. A. et al. “Influência do cotensoativo em sistemas microemulsionados na quebra de emulsão de petróleo”. *RUnPetro-ISSN 2316-6681*, v. 4, n. 2, p. 33-42, 2016.

TANG, S. Y.; SHRIDHARAN, P.; SIVAKUMAR, M. “Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions – Comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer”. *Ultrasonics Sonochemistry*. v. 20, p. 485–497, 2013.

TAYLOR, P. “Ostwald ripening in emulsions”. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 75, p. 107 – 163, 1998.

TENJARLA, S. “Microemulsions: overview and pharmaceutical applications”, *Critical Reviews Therapeutic Drug Carrier Systems*, 16, p. 461-521, 1999.

THOMAS, J.E., organizador. “Fundamentos de Engenharia de Petróleo”. Rio de Janeiro, Editora Interciência, PETROBRAS, 2001.

THOMAS, Perfuração. “In:Fundamentos de Engenharia do Petróleo”. Editora Interciência. Rio de Janeiro, 2002. Pg 81-87.

TRIGGIA, A. A., CORREIA, C. A., FILHO, C. V., XAVIER, J. A.D., MACHADO, J. C. V., THOMAS, J. E., ROSSI, N. C. M., PITOMBO, N. E. S., GOUVEA, P. C. V.M., CARVALHO, R. S., BARRAGAM, R. V., “Fundamentos da engenharia de petróleo”, Ed. Interciência, PETROBRAS, 2001.

URBAN, M. C. C.; MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D. “Development and validation of HPLC method for analysis of dexamethasone acetate in microemulsions”. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 45, n. 1, 2009.

VALENÇA, P. H. A. et al. “Extração de Cloretos em Cascalho de Petróleo Utilizando Microemulsões”. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, v. 1, n. 2, p. 7823-7830, 2015.

VALENZUELA-DÍAZ, F. R. “Preparation of organophilic clays from a Brazilian smectitic clay”. In: *Key Engineering Materials. Trans Tech Publications*, 2001. p. 203-207.

VAN OLPHEN, H., “An introduction to clay colloid chemistry”, Krieger Publishing Company, Second Edition, Malabar, Florida, 1991.

VIDAL, Emanuella Layne Ferreira et al. “Aplicação de novos polímeros catiônicos como inibidores de argila em fluidos de perfuração à base de água”. Anais do 4o PDPETRO, Campinas, SP, 2007.

VITAL, G. S. “Seleção de tensoativos e influência de um estabilizante para a otimização de formulações de fluidos de perfuração à base de óleo vegetal”, Monografia de fim de Curso. Natal: UFRN, 2005, 50p.

WINSOR, P. A. “Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes”. *Transactions of the Faraday Society*, v. 44, p. 376-398, 1948.

WITTERN, K.P.; ANSMANN, A.; HUTTINGER, R.; BILLEK, D.; CHARLET, E.; HOENEN, L.; KUCZERA, K.; MOTITSCHKE, L.; QUACK, J.; SEIB, K.; UMBACH, I.; WOLFF, G. “Stability testing of cosmetic emulsions”. v. 100, n. 10, p. 33-39, 1985.

XIN, X.; ZHANG, H.; XU, G.; TAN, Y.; ZHANG, J.; LV, X. “Influence of CTAB and SDS on the properties of oil-in-water nano-emulsion with paraffin and span 20/Tween 20”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 418, p. 60–67, 2013.

YANG, Y.; LESER, M. E.; SHER, A. A.; MCCLEMENTS, D. J. “Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale)”. *Food Hydrocolloids*. v. 30, p. 589 – 596, 2013.

ZHANG, X.; LIU, J.; FAN, Z. “Stability of etofenprox in water emulsion induced by block copolymer and surfactant”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 422, p. 191– 198, 2013.

APÊNDICE A

Guedes et al. Int. Journal of Engineering Research and Application www.ijera.com
ISSN : 2248-9622, Vol. 8, Issue 4, (Part -I) April 2018, pp.50-55

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

Identification of Ascomycetes Recovered From Petrol Stations in the Metropolitan Region of João Pessoa-PB, Brazil

Thaffarel Pereira Guedes*, Tarcísio Tarcio Corrêa Bonifácio*, Rafael Dourado*, Thiago Gonçalves Cavalcanti*, Diogo Simas Bernardes Dias**, Adna Cristina Barbosa de Sousa***, Ulrich Vasconcelos****

*(Laboratório De Microbiologia Ambiental, CBIOTEC/UFPB, João Pessoa-PB, Brasil)

**(Centro De Tecnologia Mineral, Cidade Universitária, Rio De Janeiro-RJ, Brasil)

***Laboratório De Genética Molecular E Biotecnologia Vegetal, CBIOTEC/UFPB, João Pessoa-PB, Brasil)

****Laboratório De Microbiologia Ambiental, CBIOTEC/UFPB, João Pessoa-PB, Brasil)

Corresponding Author: Ulrich Vasconcelos (u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br)

ABSTRACT

Petroderivatives from petrol stations constantly contaminate the urban environment and are responsible for significant negative impacts on it. Fungi are one of the main groups responsible for the degradation process of these compounds in soils. The aim of this work was to isolate and identify filamentous fungi from three petrol stations in the Metropolitan Region of João Pessoa, a municipality in Northeast Brazil. The microorganisms, isolated from the soil and diesel oil samples, stored in the tanks, were identified by coverslip technique using Sabouraud-Dextrose Agar. Eight fungal isolates were obtained from three different genera of the Ascomycota: *Paecilomyces* (strains TP01 and TP08), *Penicillium* (strains TP02 and TP07) and *Aspergillus* (strains TP04, TP05, TP06 and TP13). A Simple test of hydrocarbonoclastic activity indicated that the strains recovered from soil and fuel samples were recognized for their potential as bioremediation agents, so that they can be used in further tests aimed the removal of petroleum hydrocarbons, particularly in soil.

Keywords: Hydrocarbonoclastic fungi, Paraíba, Urban pollution.

Date Of Submission: 31-03-2018

Date Of Acceptance 16-04-2018

I. INTRODUCTION

Petroleum Is A Generic Term Often Used To Denote A Complex And Toxic Mixture Of Aliphatic, Aromatic And Heterocyclic Hydrocarbons. It Also Constitutes A Small Fraction Of Naturally Formed Metals And Organometallic Compounds From The Anaerobic Conversion Of Organic Matter Deposited In Low Permeability Sediments Under Specific Pressure And Temperature Conditions [1]. Given This, Petroderivatives Represent One Of The Most Important Classes Of Xenobiotics, Responsible For Negative Impacts On The Environment, Especially Biota, Water Bodies And Soil [2][3].

Petrol Stations Are The Largest Source Of Hydrocarbon Contamination In Urban Areas. This Environment And Its Surroundings Exert Significant Selective Pressures On The Biota Present, Due To The Recalcitrant And/OR Persistent Nature Of Most Of The Organic Compounds Involved, As Well As The Degree Of Variable Mutagenicity, Which Promotes Changes In The Number And Metabolic Activity Of The Present Microbiota [4].

Filamentous Fungi Present Two Major Advantages Over Other Microorganisms When

Used As Soil Bioremediation Agents. The First Advantage Refers To The Morphological Characteristics Inherent To The Group, Such As Size And Structure, Enabling Greater Mechanical Contact With Neighboring Areas And On The Surface Of The Soil, Resulting From An Average Displacement Of Hyphae By About 1 Cm² Per Day [5][6].

The Second And No Less Important Advantage Of Filamentous Fungi On Bacteria Concerns The Non-Specificity Of Their Enzymes. It Is Known That The Enzymatic System Of Filamentous Fungi Involves Three Main Groups: Lignin Peroxidases, Manganese Peroxidases And Laccases. They Are Needed For The Degradation Process Given The Complex Molecules, Such As Carotenoids, Lignin, Alkaloids And Terpenoids, Occurring In Vegetal Material, Which Is The Main Substrate Of These Microorganisms [7][8][9].

Enzymes Are Released In High Concentrations In An Attempt To Overcome The Sorption Or Complexation Losses Of The Substrate. Given This, The Filamentous Fungi Promote The First Attack On Petroleum Hydrocarbons, Conferring An Ecological Role Of Extreme Importance By Allowing The Formation

Guedes et al. *Int. Journal of Engineering Research and Application* www.ijera.com
ISSN : 2248-9622, Vol. 8, Issue 4, (Part -I) April 2018, pp.40-43

Of Less Toxic And/Or More Soluble Metabolites That Can Be Used By Other Microorganisms, Including Other Fungal Species, As Well As By Bacteria [10][11].

Thus, The Aim Of This Work Was To Isolate And Identify Potentially Hydrocarbonoclastic Filamentous Fungi Recovered From Soil And Diesel Oil Stored In Tanks Of Petrol Stations.

II. EXPERIMENTAL MATERIALS AND METHODS

2.1. Samples And Collection Points

The Study Included Two Types Of Samples, Collected In Appropriate Sterilized Containers And Under Aseptic Conditions, At Three Petrol Stations In The Metropolitan Region Of João Pessoa, A Municipality Located In The Northeast Region Of Brazil (Table 1). For The Soil Samples, About 50 g Were Taken Between The Surface And At A 15 cm Depth, Near The Pumps Or In The Surrounding Area. Samples Of 1L Of Fuel Were Purchased.

Tab. 1 Location Of Collection Points For Soil And Fuel Samples.

Site	Global Position System
01	7°07'58"S 34°51'37"W
02	7°07'42"S 34°52'06"W
03	7°06'51"S 34°53'24"W

2.2 Isolation Of Hydrocarbonoclastic Filamentous Fungi

Soil Fungi Were Isolated According To The Modified Method Described By Ben Said Et Al. (2008) [12]. About 10 g Of Soil Were Transferred To Vials Of 500 mL Capacity Containing 100 mL Of Nutrient Broth And Incubated At Room Temperature For 15 Days. Then, Samples Were Inoculated At The Central Point Of The Surface Of Sabouraud-Dextrose Agar (SDA) To Which Had Been Added 50 mg/L Of Amoxicillin. After An Incubation Period Of 3 To 5 Days At 30°C, The Colonies Were Transferred To Tubes Containing Agar And Kept Under Refrigeration At 4°C.

Isolates From Diesel Oil Were Obtained Using A System Using The Method Described By Brown Et Al. (2010) [13]. A Volume Of The Fuel (50 mL) Was Transferred To A 500 mL Vial Containing 12.5 mL Of Sterile Distilled Water And 12.5 mL Of Mineral Broth, With The Following Composition: K₂HPO₄ (0.5 g/L); (NH₄)₂SO₄ (0.5 g/L); MgSO₄ (0.5 g/L); FeCl₂ (10 mg/L); CaCl₂ (10 mg/L); MnCl₂ (0.1 mg/L) And ZnSO₄ (0.01 mg/L), pH 7.2±0.2, To Which Had Been Added Traces Of Yeast Extract And Vitamins (7.2±0.2). The System Was Incubated For 14 Days Under Agitation Of

150 RPM At 30°C, And The Fungal Isolate Was Obtained As Described For The Soil Samples.

2.3 Identification Of Filamentous Fungi

Identification Was Performed By The Coverslip Technique [14]. Initially The Microorganisms Were Collected In Test Tubes Containing SDA, Where The Culture Was Kept At Room Temperature For 15 Days And Then Under Refrigeration At 4°C.

Fragments Of The Fungal Culture Were Inoculated In The Center Of The SDA Surface. The Plates Were Then Maintained At Room Temperature. Observations Were Performed Over 15 Days At 48h Intervals, Except On The Last Day, When The Interval Was 24h. The Measurements Were Carried Out With A Millimeter Ruler And Were Used To Construct A Graph For Radial Growth Observation.

For The Evaluation Of The Microstructures, The Coverslip Plate Culture Technique Was Performed. Fragments Of The Fungal Colony Were Strategically Placed On The Surface Of The SDA In The Petri Dishes And Covered With A Pre-Flanged Coverslip. After Growth, The Coverslips Were Removed Every 24 Hours And Placed Inverted On A Slide Containing Violet Crystal Dye And Observed Under An Optical Microscope. All The Experiments Were Carried Out At The Laboratory Of Environmental Microbiology Of The Biotechnology Center Of The Federal University Of Paraíba.

2.4. Hydrocarbonoclastic Activity Test

A Rapid Oil Drop Collapse Test Was Carried Out Using Microdilution Plates Containing 1.5 mL Of Mineral Broth, 25 mL Of Fungal Suspension (10⁸ CFU/mL), 10 mL Of Oil (Diesel And Lubricating Oil) And 1.5 mL Of A 10% Solution Of 2,6-Dichlorophenol Indophenol 10% (DCPIP). The Plates Were Incubated At Room Temperature For 10 Days With Observations Each 24h Until The Vanishing Of The Blue Color [15].

III. RESULTS AND DISCUSSION

Under The Conditions Offered In This Study, It Was Possible To Obtain Eight Isolates From At Least Three Different Genera Of The Ascomycota (Table 2).

The Mycelial Growth Of Fungal Isolates, With The Exception Of TP13, Was Evaluated For 15 Days In SDA (Fig. 1). The Isolate TP01 Showed A Faster Growth. On The Eighth Day Of Growth, It Occupied The Entire Surface Of The Culture Medium Contained In The Petri Dish.

Tab. 2 Origin, Identification Of Fungal Isolates And Oil Drop Collapse Time

Strains	Source	Genera	Oil Drop Collapse (Days)	
			LO	D
TP01	Fuel	<i>Paecilomyces</i> Sp	3	2
TP02	Soil	<i>Penicillium</i> Sp	2	3
TP04	Soil	<i>Aspergillus</i> Sp	3	4
TP05	Soil	<i>Aspergillus</i> Sp	2	3
TP06	Soil	<i>Aspergillus</i> Sp	2	3
TP07	Soil	<i>Penicillium</i> Sp	2	3
TP08	Fuel	<i>Paecilomyces</i> Sp	2	3
TP13	Soil	<i>Aspergillus</i> Sp	2	3

LO – Lubricating Oil, D – Diesel

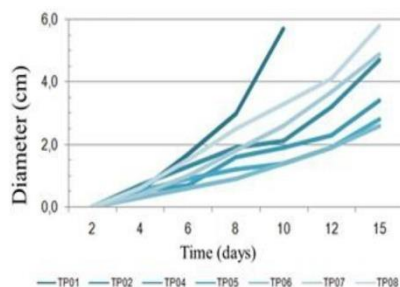


Fig. 1 Size Of Seven Fungal Colonies For 15 Days In Sabouraud-Dextrose Agar.

These Results Indicated That The Culture Medium Used Was Effective In Promoting Growth And Sporulation At Room Temperature ($\pm 30^{\circ}\text{C}$), As It Provided The Nutritional Supply Required For The Different Fungal Isolates, Favoring *In Vitro* Development.

Fig. 2 Illustrates The Macroscopic Appearance Of Colonies TP01 And TP05, Exhibiting Variations In Texture And Staining. The TP01 Colony Presented Aerial Mycelium Of Cottony Appearance, Containing Few Conidia And A Brown To Cream Pigmentation (Front And Back Of The Colony). The TP05 Colony Showed A Velvety Dark Green Appearance With White Borders, A Mass Of Greenish-Colored Conidia And A Creamy Pigmentation On The Back Of The Colony.

The Vegetative And Reproductive Structures Present In The Different Fungal Isolates Were Analyzed By The Coverslip Technique. For All Isolates, Only The Formation Of The Branched Mycelium Was Displayed In The First 24 Hours. From The 48 Hours, The Mycelial Differentiation Could Be Observed, Where Morphological Differences Between The Vegetative And

Reproductive Structures Of The Different Isolates Were Identified.

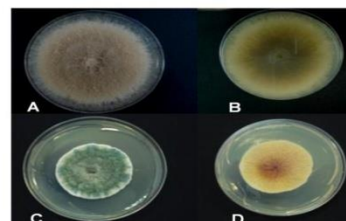


Fig. 2 Macroscopic Aspects Of Two Isolates In Sabouraud-Dextrose Agar. TP01, Front (A) And Back (B) And Soil: TP05, Front (C) And Back (D).

The TP01 And TP08 Isolates From Diesel Oil Presented Single Conidiophores And Verticillate Twigs With Two To Four Phialides. The Phialides Displayed An Intumescent Basal Portion And An Elongated Portion Which Produced And Sustained The Ellipsoid Conidia. These Characteristics Identified The Species As The Genus *Paecilomyces*.

The Isolates TP02 And TP07 (Soil) Were Biverticillated, With Conidiophores, Metulae And Rough Phialides, In Which Spherical Conidia Were Distributed. These Structures Are Characteristic Of The Genus *Penicillium*. In The TP04, TP05, TP06 And TP13 Isolates Collected From The Soil, Characteristic Structures Of The Genus *Aspergillus* Were Identified, For Example, As Simple Conidiophores Distributed In The Form Of Bunches And Arranged On A Vesicle.

Conidia Are Reproductive Elements Of Asexual Origin Capable Of Withstanding Adverse Conditions, And Germinating Under Favorable Conditions, Ensuring The Propagation Of The Species [16]. The Different Morphological Types Of Conidia Found In The Isolates Of *Paecilomyces* sp, *Aspergillus* sp And *Penicillium* sp Are Characterized As Ectospores Because They Are Formed At The Extremities Of Special Hyphae, Called Conidiophores [17]. The Arrangement Of The Conidiophores, The Structures Where The Conidia Are Deposited And The Form Of The Conidia Are Essential Taxonomic Characteristics To Distinguish The Species Within The Different Genera [18].

Paecilomyces sp, *Aspergillus* sp And *Penicillium* sp Are Considered Eucarpic Fungi [19], With Characteristics Easily Identified In Leaflet Culture. Reproductive Structures Appeared Only In One Part Of The Somatic Structures, The Remaining Part Being The Vegetative Form. In General, The Somatic Structures Are Different From The Reproductive Ones And They Have A Diversification Of Forms On Which Species Classification Is Also Based [20].

All The Genera For Which The Isolates Were Identified Have Been Reported In The Literature As Bioremediation Agents Of Soils Contaminated By Petroderivatives Or Crude Oil, Either As Axenic Cultures Or In Consortia [21][22].

In Light Of This, Our Study Aimed To Obtain Hydrocarbonoclastic Organisms For Bioremediation Studies. The Type Of Impacted Area Chosen For The Collections Was Decided Based On The Premise That At The Petrol Stations, Where Conservation Status Was Visually Compromised, The Contamination History Would Guarantee Already Adapted Organisms.

In The Hydrocarbonoclastic Activity Test, With The Exception Of The Strains Recovered From Fuel Samples, The Lubricating Oil Drop Collapsed Before The Diesel Oil (Table 2). This Suggests A Preferential Use Of C20-C40 Aliphatic Compounds As Sole Source Of Carbon, As Well As The Possible Interference Of The Preservatives Added To Diesel Oil On The Growth Of Microorganisms Is This Fuel Mixture [11]. In Addition, The Fungal Strains Isolated From The Diesel Were More Adapted To This Fuel Than The Strains Recovered From Soil Samples.

Although Brazilian Regulates The Environmental Pollution Prevention And Control Of Petrol Stations [23], Most Of These Facilities Still Represent A Great Risk Due To The Location And The Poor State Of Conservation Of Their Storage Tanks. These Tanks Are Subject To Chemical And Microbiological Corrosion, Contributing To Leaks And Resulting In Soil Contamination And Changes In Soil Biota [24].

A Surprising Finding Of The Study Was The Obtaining Of Two *Paecilomyces* sp. In The Diesel Samples. This Is An Explicit Sign Of The State Of Conservation Of The Tanks, Signaling The Risk Of Contamination Of The Stored Product And, Consequently, Revealing An Imminent Environmental Impact [25]. According To Literature, The Occurrence Of Hydrocarbonoclastic Microorganisms In Storage Tanks Is Based On Two Aspects: The Presence Of Water And Ability Of The Microorganisms To Use Carbon From The Fuel [26].

The Presence Of An Intermediate Zone Between Stored Fuel And Water Carried By Rain Is A Favorable Medium For Microbial Growth In Tanks [27]. Additionally, Water May Also Originate From Other Sources, Such As The Fraction In The Composition Of The Fuel Itself, The Residue Produced In The Cleaning Operations, Ineffective Waterproofing, Condensation Of Air Droplets And Infiltration During The Replacement Procedure In The Tanks [25].

The Detection Of Filament Fungi In Diesel Also Indicates That Other Micro-Organisms,

Such As Bacteria And Yeast, May Be Present, Which Implies Possible Damage To The Facility And To The Consumer. Future Studies With The Isolates Will Be Able To Characterize Them With Respect To The Biodegradable Potential For Their Use In Tests Aiming At The Removal Of Petroleum Hydrocarbons In Soils.

IV. CONCLUSIONS

All Strains Of Filamentous Fungi Recovered At Petrol Stations Were Recognized For Their Potential As Bioremediation Agents. On The Other Hand, Obtaining Fungi In The Stored Fuel Samples Reflects The Conditions Of The Storage Tanks, Where The Degree Of Contamination Is Not Known, Nor The Possible Consequences Involved, With Respect To The Environmental Impacts, Corrosion Of The Tanks And Deterioration Of Stock.

Acknowledgments

This Work Was The Result Of A Study On The Degradation Of Petroleum Hydrocarbons In Soil By Microorganisms Isolated From Impacted Environments, Funded By CNPq (Process n° 477305/ 2013-0), Which The Authors Thank The Support. The English Text Of This Paper Has Been Revised By Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), Rsadip - TESL (Cambridge University).

REFERENCES

- [1] J.G. Speight And N.S. El-Gendy, Petroleum Composition And Properties, In J.G Speight And N.S. El-Gendy (Ed.), *Introduction To Petroleum Biotechnology*, 1 (Huston, TX: Gulf Publishing Company, 2018), 1-39.
- [2] S. Drozdova, W. Ritter, B. Lendl And E. Rosenberg, Challenges In Determination Of Petroleum Hydrocarbons In Water By Gas Chromatography (Hydrocarbon Index). *Fuel*, 113, 2013, 527-536.
- [3] C. Sivaraman, A. Ganguly, M. Nikolausz And S. Mutnuri, S. Isolation Of Hydrocarbonoclastic Bacteria From Bilge Oil Contaminated Water. *International Journal Of Environmental Science & Technology*, 8(3), 2011, 461-470.
- [4] Y. Jiang, Y. Li, X.J. Kang, Q. Zhou, X. Zhou, Y. Zhu. Characteristics Of Leakage Pollution Of Longpan Road Gas Station And Its Enlightenment. *Journal Of Environmental Protection*, 3(1), 2012, 49-54.
- [5] X. Li, P. Li, X. Lin, C. Zhang, Q. Li And Z. Gong. Biodegradation Of Aged Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) By Microbial Consortia In Soil And Slurry

- Phases. *Journal Of Hazardous Materials*, 150(1), 2008, 21-26.
- [6] S. Boonchan, M.L. Britz And G.A. Stanley. Degradation And Mineralization Of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons By Defined Fungal-Bacterial Cocultures. *Applied And Environmental Microbiology*, 66(3), 2000, 1007-1019.
- [7] A. D'Annibale, F. Rosetto, V. Leonardi, F. Federici And M. Petruciolli. Role Of Autochthonous Filamentous Fungi In Bioremediation Of A Soil Historically Contaminated With Aromatic Hydrocarbons. *Applied And Environmental Microbiology*, 72(1), 2006, 28-36.
- [8] C. Novotný, K. Svobodová, R. Erbanová, T. Cajthaml, A. Kasinath, E. Lang And V. Šásek. Ligninolytic Fungi In Bioremediation: Extracellular Enzyme Production And Degradation Rate. *Soil Biology And Biochemistry*, 36(10), 2004, 1545-1551.
- [9] R. Canet, J.G. Birnstingl, D.G. Malcolm, J.M. Lopez-Real And A.J. Beck. Biodegradation Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs) By Native Microflora And Combinations Of White-Rot Fungi In A Coal-Tar Contaminated Soil. *Bioresource Technology*, 76(2), 2001, 113-117.
- [10] U. Vasconcelos, F.P. França And F.J.S. Oliveira. Removal Of High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Química Nova*, 34(2), 2011, 218-221.
- [11] N.C. Romero, M.I. Urrutia, H.E. Reinoso And M.M. Kiernan. Benzo[a]Pyrene Degradation By Soil Filamentous Fungi. *Journal Of Yeast And Fungal Research*, 1(1), 2010, 25-29.
- [12] O. Ben Said, M.S. Goñi-Urriza, M. El Bour, M. Dellari, P. Aissa And R. Duran. Characterization Of Aerobic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria From Bizerte Lagoon Sediments, Tunisia. *Journal Of Applied Microbiology*, 104(4), 2008, 987-997.
- [13] L.M. Brown, J.P. McComb, M.D. Vangsness, L.L. Bowen, S.S. Mueller, L.M. Balster And C.A. Bleckmann. Community Dynamics And Phylogenetics Of Bacteria Fouling Jet A And JP-8 Aviation Fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(3), 2010, 253- 261.
- [14] P. Genhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood And N.R. Kieg. *Methods For General And Molecular Bacteriology* (Washington: American Society For Microbiology, 1994).
- [15] K.G. Hanson, J.D. Desai And A.J. Desai. A Rapid And Simple Screening Technique For Potential Crude Oil Degrading Microorganisms. *Biotechnology Techniques*, 7(10), 1993, 745-748.
- [16] R. Teertstra, M. Tegelaar, J. Dijksterhuis, E.A. Golovina, R.A. Ohm And A.B. Wösten. Maturation Of Conidia On Conidiophores Of *Aspergillus Niger*. *Fungal Genetics Biology*, 98(1), 2017, 61-70.
- [17] T.N Taylor, M. Krings And E.L. Taylor. Ascomycota. In T.N. Taylor, M. Krings And E.L. Taylor (Ed.), *Fossil Fungi*, 8 (Cambridge, MA: Academic Press, 2015), 129-172.
- [18] E. Aranda, P. Godoy, R. Reina, M., Badia-Fabregat, M. Rosell, E. Marco-Urrea And I. Garcia-Romera. Isolation Of Ascomycota Fungi With Capability To Transform PAHs: Insights Into The Biodegradation Mechanisms Of *Penicillium Oxalicum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 122(8), 2017, 141-150.
- [19] C.J. Alexopoulos, C.W. Mims And M. Blackwell. *Introductory Mycology* (Indianapolis, IN: Wiley, 2007).
- [20] K. Elena And A.C. Pappas. Pathogenicity And Vegetative Compatibility Of *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Phaseoli* In Greece. *Journal Of Phytopathology*, 150(8-9), 2002, 495-499.
- [21] A.C.O. Chagas-Spinelli, M.T. Kato, E.S. Lima And S. Gavazza. Bioremediation Of A Tropical Clay Soil Contaminated With Diesel Oil. *Journal Of Environmental Management*, 113, 2010, 510-516.
- [22] M.G. Mancera-López, F. Esparza-García, B. Chávez-Gómez, R. Rodríguez-Vázquez, G. Saucedo-Castañeda And J. Barrera-Cortés. Bioremediation Of An Aged Hydrocarbon-Contaminated Soil By A Combined System Of Biostimulation-Bioaugmentation With Filamentous Fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(2), 2008, 151-160.
- [23] CONAMA – Brazilian Environmental Council. Resolução N° 273, De 29 De Novembro De 2000.
- [24] J. Lindorfer, K. Fazeni And H. Steinmüller. Life Cycle Analysis And Soil Organic Carbon Balance As Methods For Assessing The Ecological Sustainability Of 2nd Generation Biofuel Feedstock. *Sustainable Energy Technologies And Assessments*, 5(1), 2014, 95-105.
- [25] R. Dourado, T.P. Guedes, T.T.C. Bonifácio, T.G. Cavalcanti, R.A. Travassos And U. Vasconcelos. Determination Of Microbial Contaminants Recovered From Brazilian Petrol Stations. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 16(3), 2017, 984-991.

Guedes et al. *Int. Journal of Engineering Research and Application* www.ijera.com
 ISSN : 2248-9622, Vol. 8, Issue 4, (Part -I) April 2018, pp.40-43

- | | |
|--|--|
| <p>[26] F.J. Passman, B.L. Mcfarland And M.J. Hillyer. Oxygenated Gasoline Biodeterioration And Its Control In Laboratory Microcosms. <i>International Biodeterioration & Biodegradation</i>, 47(2), 2001, 95-106.</p> | <p>[27] C.C. Gaylarde, F.M. Bento And J. Kelley. <i>Microbial Contamination Of Stored Hydrocarbon Fuels And Its Control</i>. <i>Revista De Microbiologia</i>, 30(1), 1999, 1-10.</p> |
|--|--|

Guedes et al. "Identification of Ascomycetes Recovered From Petrol Stations in the Metropolitan Region of João Pessoa-PB, Brazil" *International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA)*, vol. 8, no. 4, 2018, pp. 50-55