

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS FRANCISCO BELTRÃO

RAFAEL KENJI KOIKE SHIMABUKURO

BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO POR CONSÓRCIO MICROBIANO

FRANCISCO BELTRÃO

2017

RAFAEL KENJI KOIKE SHIMABUKURO

BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO POR CONSÓRCIO MICROBIANO

Trabalho de Conclusão de Curso, como requisito parcial para a conclusão do curso de Bacharelado em Engenharia ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Francisco Beltrão

Orientador: Prof. Dr. Eder da Costa dos Santos

FRANCISCO BELTRÃO

2017



TERMO DE APROVAÇÃO

Curso de Engenharia Ambiental

Trabalho de Conclusão de Curso – TCC2

Biodegradação de diesel no solo por consórcio microbiano

por

Rafael Kenji Koike Shimabukuro

Trabalho de Conclusão de Curso 2 apresentado às 10 horas e 30 min., do dia 22 de novembro de 2017, como requisito para aprovação da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão. O candidato foi arguido pela Banca Avaliadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Avaliadora considerou o trabalho APROVADO.
Banca Avaliadora:

Denise Andréia Szymczak

Coordenadora do Curso de Engenharia
Ambiental

Eder da Costa dos Santos

Professor Orientador

Davi Zacarias de Souza

Membro da Banca

Elisabete Hiromi Hashimoto

Membro da Banca

Denise Andréia Szymczak

Professor do TCC2

“A folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso de Engenharia Ambiental”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu orientador, Prof^o. Dr. Eder da Costa dos Santos, por sua paciência, total disponibilidade, companheirismo e principalmente sua orientação, que foi muito além deste trabalho e transpôs a acadêmia.

Aos professores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Francisco Beltrão, que eu tive a oportunidade de conhecer, que compartilharam um pouco de seu conhecimento, tanto científico, como pessoal. Em especial aos professores Hernan, Davi, Gabriel, Elisabete, Ivane, Ariadne e Guillermo, cujo o ensino transpôs as paredes da sala de aula.

Aos técnicos do campus, que além de auxiliarem nas atividades e nas dúvidas, também compartilharam bons momentos. Aos técnicos, Ronaldo, Camila, João, Magali, Paulo e Anderson, os meus sinceros agradecimentos.

Aos meus colegas de laboratório, Felipe, Amanda, Renata, Janice e Vivian, pelo apoio prestado nas horas difíceis, e pelas risadas compartilhadas.

Aos amigos que fiz durante essa fase da vida, Luis Guilherme, Daniel, Lucas, Gustavo, Matheus, Felipe, Thiago Higuchi, Tamara, Rafael, Tiago Seibert e Maria Alice. Um agradecimento em especial ao João Phellipe Vitale (*in memoriam*), que compartilhou do mesmo sonho, a mesma casa, os momentos de alegria e felicidade, e que com a sua risada alegre, marcou para sempre a minha vida.

Aos meus professores que passaram pela minha infância e juventude, que enfrentaram e ainda enfrentam adversidades com o objetivo de educar e impulsionar este país, os meus sinceros agradecimentos.

Aos meus amigos de infância e juventude, que hoje mesmo distantes, acompanharam toda essa jornada, Rafael, Jaqueline, Juliana, Lais e Daniele, espero que me acompanhem nas próximas jornadas.

A minha namorada, Vivian Fernanda, que com teu carinho, tua alegria e dedicação, sempre se manteve presente em todos os momentos, mesmo nos momentos difíceis. Meu mais sincero agradecimento, sei como eu sou difícil de lidar em certos momentos, e você sempre esteve presente.

A toda a minha família, tanto os mais presentes, quanto aqueles em que a distância nos separa,

os meus sinceros agradecimentos, por sempre apoiarem, e sempre se preocuparem com a minha educação. Em especial, a minha avó Kimiko Koike (*in memoriam*), que mesmo sofrendo em seus últimos momentos, sempre disse que ia estar comigo no final desta jornada, e de fato estive.

E por fim, para aqueles que escolheram viver os meus sonhos, apoiaram as minhas escolhas, e, mesmo nos meus momentos de indecisão, apoiaram cegamente em mim. A eles, que sempre lutaram para que nada me faltasse, e de fato, nunca faltou. Que sempre me amaram em todos os momentos, mesmo nos momentos em que repreendiam quando necessário. Eu lhes dedico este meu trabalho, que é fruto de todo o esforço que vocês tiveram, e que sem esse esforço, eu não poderia escrevê-lo. Os meus mais sinceros agradecimentos a vocês, meus pais, por tudo que me deram nessa vida. Amo vocês!

Rafael Kenji Koike Shimabukuro

RESUMO

SHIMABUKURO, Rafael K. K. **BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO POR CONSÓRCIO MICROBIANO**. 2017. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2017.

Combustíveis fósseis são o segundo maior grupo de contaminantes no estado de São Paulo, com maior número de áreas contaminadas, impactando diretamente o solo, os recursos hídricos e, a saúde humana. O uso de técnicas físico-químicas para a remediação dessas áreas apresenta um custo elevado. Assim, faz-se necessário a busca por métodos alternativos, como a biorremediação. O objetivo do estudo foi avaliar a capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, em solo contaminado por diesel, empregando técnicas de bioaumentação, com consórcios bacterianos, fúngicos, e uma mistura dos dois consórcios. Realizaram-se ensaios de biodegradação de diesel *in vitro* a partir da análise respirométrica, utilizando um solo previamente contaminado com uma concentração de 2% de diesel, empregando a técnica de bioaumentação, sendo que a introdução dos microrganismos, se deu de forma direta e em cápsulas. Em síntese, a bioaumentação apresentou os maiores valores de C-CO₂ acumulado (mineralização de hidrocarbonetos), superando a atenuação natural, sendo que o tratamento de bioaumentação que apresentou o menor resultado, superou a atenuação natural em 43,7%, sugerindo a eficiência do tratamento.

Palavras-chave: Combustíveis fósseis. BTEX. Hidrocarbonetos. Biorremediação. Bioaumentação. Encapsulamento.

ABSTRACT

SHIMABUKURO, Rafael K. K. **DIESEL BIODEGRADATION IN SOIL BY MICROBIAL CONSORTIUM**. 2017. 66 f. Course Completion Work (Graduation). Environmental Engineering College. Federal University of Technology - Paraná. Francisco Beltrão 2017.

Fossil fuels are the second largest group of contaminants from state of São Paulo, with greater number of contaminated areas, directly impacting the soil, water resources and human health. The use of physico-chemical techniques for the remediation of these areas presents a high cost. Thus, it is necessary to search for alternative methods, such as bioremediation. The objective of the study was to evaluate the degradation capacity of petroleum hydrocarbons in soil contaminated by diesel, using bioaugmentation techniques, with bacterial, fungal consortia, and a mixture of the two consortia. In vitro diesel biodegradation tests were carried out from the respirometric analysis, using a previously contaminated soil with a concentration of 2% of diesel, using the technique of bioaugmentation, and the introduction of the microorganisms occurred directly and in capsules. In summary, the bioaugmentation presented the highest values of accumulated C-CO₂ (hydrocarbon mineralization), surpassing the natural attenuation, and the bioaugmentation treatment that presented the lowest result, exceeded the natural attenuation in 43.7%, suggesting the efficiency treatment.

Keywords: Fossil fuels. BTEX. Hydrocarbons. Bioremediation. Bioaugmentation. Encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico com os grupos de contaminantes – dezembro 2016.....	23
Figura 2. Custo do tratamento por m ³ de solo por diferentes tratamentos..	24
Figura 3. Gráfico com a utilização de técnicas de remediação implantadas para remediação de áreas contaminadas no estado de São Paulo – dezembro de 2016.	25
Figura 4. Via de degradação aeróbia do benzeno (continua).	27
Figura 5. Via de degradação aeróbia do benzeno (conclusão).	28
Figura 6. Via de degradação aeróbia do tolueno..	29
Figura 7. Via de degradação aeróbia do tolueno pela ação da enzima tolueno 4-monooxigenase.	30
Figura 8. Via de degradação aeróbia do tolueno via enzima xileno monooxigenase.....	31
Figura 9. Via de degradação aeróbia do etilbenzeno.....	32
Figura 10. Via de degradação aeróbia do o- xileno e m- xileno.....	33
Figura 11. Via de degradação aeróbia do p- xileno.....	34
Figura 12. Preparo de placas de Petri com os três meios utilizados para o crescimento de microrganismos do solo contaminado.	37
Figura 13. Ensaio em microcosmos para a análise da evolução de C-CO ₂ (respirometria). ...	40
Figura 14. Microcosmos utilizados nos ensaios de respirometria, onde pode ser visto os recipientes plásticos contendo NaOH para captura química do CO ₂ liberado.....	41
Figura 15. Local de amostragem com histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo.	44
Figura 16 Microrganismos presentes no solo contaminado, utilizando 3 meios de cultura diferentes	45
Figura 17. Cepa fúngica isolada em meio mineral seletivo.....	46
Figura 18. Cepa bacteriana isolada em meio mineral seletivo	46
Figura 19. Colônias de um isolado fúngico utilizado na análise de curva de crescimento.	48
Figura 20. Gráfico gerado da curva de crescimento dos consórcios microbianos. CB – Consórcio bacteriano; CF – Consórcio fúngico; CBF – Consórcio bacteriano + fúngico; CC – Consórcio Controle.....	49
Figura 21 Cápsulas com consórcio bacteriano.	51
Figura 22 Cápsulas com consórcio fúngico.....	51
Figura 23 Cápsulas com consórcio misto (bactérias + fungos).	52
Figura 24 Medição das cápsulas após produção das mesmas.	52
Figura 25 Solo no início do experimento, sem a formação do biofilme.	55
Figura 26. Formação do biofilme após sete dias de experimento.	56
Figura 27. Gráfico com os resultados da respirometria. Os valores de C – CO ₂ foram acumulados. As barras nos pontos mostram o erro padrão dos tratamentos.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas químicas dos hidrocarbonetos monoaromáticos e suas características	19
Tabela 2. Padrão de potabilidade para substâncias para consumo humano. Fonte: Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde	20
Tabela 3. Tabela valores orientados para solo e água subterrânea	21
Tabela 4. Quadro com a relação de número de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo no ano de 2016.	22
Tabela 5. Tratamentos realizados na análise da respirometria e a quantidade de microrganismos inoculados	39
Tabela 6. Características das cepas isoladas.....	47
Tabela 7. Características físico-químicas do solo sem histórico de contaminação	54
Tabela 8: Matéria orgânica no solo agrícola	54
Tabela 9: Granulometria do solo agrícola	54
Tabela 10. Desempenho dos tratamentos na análise respirométrica e o desempenho comparado a atenuação natural	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BTEX	Bezeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno (diferindo dependendo do radical metil)
CO ₂	Dióxido de carbono
HAP	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HCL	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
PCB	Polychlorinated Biphenyl
pH	Potencial hidrogênionico
TPH	Total Petroleum Hydrocarbon
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE ACRÔNIMOS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
EPA	Environmental Protection Agency
OSPAR	Oleoduto Santa Catarina – Paraná
REPAR	Refinaria Presidente Getúlio Vargas

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 HISTÓRICO.....	17
3.2. HIDROCARBONETOS.....	17
3.2. CONTAMINAÇÃO DO SOLO POR HIDROCARBONETOS.....	19
3.3. BIORREMEDIAÇÃO.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE DIESEL.....	36
4.1.1 Local e características da amostragem.....	36
4.1.2 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados.....	36
4.2 BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO.....	37
4.2.1 Montagem dos consórcios microbianos.....	37
4.2.2. Confeção de cápsulas contendo microrganismos.....	38
4.2.3. Biodegradação de diesel no solo (microcosmos).....	38
4.3. ANÁLISE DE CRESCIMENTO, CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO E ESTATÍSTICA.....	42
4.3.1 Análise de crescimento.....	42
4.3.2 Cinética de degradação.....	42
4.3.3 Análise estatística.....	42
4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
5.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE DIESEL.....	44
5.1.1 Local e características da amostragem.....	44
5.1.2 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados.....	45
5.2 BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO.....	48
5.2.1 Montagens dos consórcios microbianos.....	48
5.2.2. Encapsulamento dos consórcios microbianos.....	50
5.2.3 Montagem dos microcosmos.....	53
5.3.2 Cinética de degradação.....	56

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	59
6. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS	61
Apêndice.....	65
Apêndice 01: Meio mineral Tanner.....	65
Apêndice 02: Ágar nutriente.....	66
Apêndice 03: Batata Dextrose Ágar	66
Apêndice 04: Meio solo.....	66

1. INTRODUÇÃO

De acordo com Pompermayer (2010), no Brasil, cerca de 85% do combustível consumido pelo setor de transporte, provém de fontes não renováveis derivados do petróleo. Os combustíveis derivados de petróleo, são formados majoritariamente por hidrocarbonetos, sendo que a fração aromática, representa aproximadamente, 20% de sua composição (GENTNER et al., 2012).

Dentro da fração aromática dos combustíveis fósseis, em especial, o diesel, o grupo BTEX formados pelos hidrocarbonetos, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, são nocivos à saúde humana. (BALTRÉNAS ET AL., 2011).

O benzeno é um composto carcinogênico, enquanto o restante do grupo BTEX, não possuem comprovação da sua carcinogenicidade, mas, apresentam toxicidade aos seres humanos. Por serem compostos voláteis, adentram no organismo através da respiração (DURMUSOGLU, TASPINAR, KARADEMIR, 2010).

O BTEX apresenta mobilidade na sub-superfície, percolando até atingir o lençol freático, possibilitando ser consumido por pessoas que utilizam a água de poços artesianos, ou de redes de distribuição que captam a água subterrânea para abastecer os municípios (COSTA, NUNES, CORSEUIL, 2009).

Somente no estado de São Paulo, cerca de 75% das suas 5662 áreas contaminadas identificadas no ano de 2016, eram decorrentes de atividades de postos de combustíveis, sendo os combustíveis automotivos, o segundo grupo contaminante no estado, de acordo com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2017).

A remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos, majoritariamente, utiliza-se de técnicas físico-químicas, porém, a utilização desse tratamento convencional encarece os custos da operação, sendo o tratamento biológico, uma alternativa para tornar o processo menos oneroso (OLLER, MALATO, SÁNCHEZ-PÉREZ, 2011).

A biorremediação, é um tratamento biológico, que tem como base o emprego de microrganismos autóctones (presentes *in loco*) ou alóctones (cepas isoladas), que possuam capacidade de degradar contaminantes, utilizando-o como fonte de carbono para as suas rotas metabólicas (SILVA ET AL., 2009).

Uma das técnicas de biorremediação, é a bioaugmentação, na qual realiza-se a introdução de microrganismos no ambiente contaminando, quando a microbiota do local, não consegue degradar o contaminante (XIN et al, 2013). A bioaugmentação pode ser feita por meio de

inoculação de microrganismos isolados, ou, na forma de consórcio, na qual há uma mistura de microrganismo, no qual os consórcios estão mais próximos as situações reais do que os experimentos em laboratório (TYAGI, DA FONSECA, DE CARVALHO, 2011).

O presente trabalho, avaliou a capacidade de degradação de consórcios microbianos, quando expostos a um solo contaminado com diesel, através da técnica de bioaumentação, através da inoculação de células livres, e de encapsulamento microbiano.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de degradação de microrganismos autóctones e alóctones de um solo com histórico de contaminação por diesel, através de técnicas de biorremediação de áreas contaminadas por diesel.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Isolar microrganismos com capacidade de degradação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos;
- Verificar a taxa de crescimento de microrganismos alóctones (isolados), *in vitro*, expostos a diesel;
- Estimar a degradação de diesel, no solo, mediada por consórcios microbianos, submetidos às técnicas de bioaumentação direta e em cápsulas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRICO

Civilizações da antiguidade, como: fenícios, egípcios, gregos e romanos, já utilizavam o petróleo para diversas funções, seja para a impermeabilização de barcos, construção de estradas, iluminação, armas de guerra, e, para outros fins. Atualmente, a demanda do uso do petróleo pela indústria petroquímica e seu uso como fonte de energia, tem apresentado problemas cada vez mais constantes devido a áreas contaminadas (CORIOLANO, DE MORAIS FILHO, 2016).

Somente no ano de 2008, foram consumidos cerca de 86 milhões de barris de petróleo por dia no mundo, sua demanda tornou os hidrocarbonetos de petróleo contaminantes majoritários tanto na sua prevalência, como também em quantidade (TYAGI, DA FONSECA, DE CARVALHO, 2011).

De acordo com Pompermayer (2010), as fontes renováveis fazem parte de cerca de 12,9% da matriz energética mundial, porcentagem que sobe para 45% no Brasil, sendo considerado uma das matrizes mais limpas. Esse valor cai para 15%, quando o combustível é utilizado para o setor de transporte, e que, quando comparado a outros países, é um ótimo índice, já que no Brasil utiliza-se do etanol como uma alternativa à combustíveis fósseis, e, a adição de etanol anidro na composição da gasolina auxilia no desempenho do país.

3.2. HIDROCARBONETOS

A composição do petróleo varia de acordo com o local de extração, mas, aproximadamente 80% dela é formada por hidrocarbonetos, que se subdividem em hidrocarbonetos alifáticos (n-alcenos, isoalcenos e alcenos cíclicos), e hidrocarbonetos aromáticos (nafteno-aromáticos, monoaromáticos e poliaromáticos) (GENTNER et al., 2012).

Os hidrocarbonetos alifáticos são aqueles em que a estrutura de carbono está na forma de cadeias abertas ou fechadas, e os hidrocarbonetos aromáticos possuem anel benzênico em sua estrutura (CERQUEIRA et al., 2011).

Os hidrocarbonetos alifáticos, estão presentes na gasolina e no óleo diesel, sendo facilmente degradados quando se encontram no ambiente, quando comparados aos hidrocarbonetos aromáticos. Isso ocorre pelo fato que os carbonos estão arranjados em uma forma linear, o que facilita a oxidação e a quebra da cadeia. Eles possuem uma solubilidade de três à cinco vezes maior que os hidrocarbonetos aromáticos em meio aquático (DE LIMA-MORALES, 2016).

Os hidrocarbonetos aromáticos são compostos hidrofóbicos, que possuem baixa solubilidade em água, o que dificulta a degradação pelos microrganismos em função da baixa biodisponibilidade (disponibilidade às células microbianas) (MNIF, ELLOUZE-CHAABOUNI, GHRIBI, 2013).







Os hidrocarbonetos monoaromáticos, sub-grupo dos aromáticos, estão presentes em grandes quantidades nos combustíveis fósseis (gasolina e diesel). São compostos lipossolúveis e voláteis, possibilitando a absorção pelos seres vivos. (SILVA et al., 2009).

O óleo diesel é uma mistura complexa obtida a partir do refino do petróleo, formada basicamente por alcanos, hidrocarbonetos aromáticos, e, por uma pequena quantidade de isoprenóides, enxofre, nitrogênio, e compostos oxigenados. Sua composição é de aproximadamente 68% compostos alifáticos e 20% aromáticos (GENTNER et al., 2012).

A gasolina, que também é obtida através do refino do petróleo, possui uma composição de hidrocarbonetos que é próxima de 47% (percentagem em peso) de alcanos de cadeia linear e ramificada, 10% de alcenos, 3 a 5% de cicloalcanos e 35% em hidrocarbonetos aromáticos, além da adição de outros aditivos como o etanol. Dentro da fração dos aromáticos, está contida os compostos BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e os três tipos de xileno), que podem variar de acordo com o fabricante (CHEN, LAI, TIEN, 2008).

O benzeno destaca-se por ser uma substância carcinogênica (Figura 01) de acordo com a EPA (Agência de Proteção Ambiental) dos Estados Unidos, enquanto os outros componentes do BTEX, não teve a sua real comprovação, porém são novíços aos seres humanos, sendo tóxicos e irritantes (Tabela 1) (ESPLUGUES et al., 2010).

Tabela 1. Estruturas químicas dos hidrocarbonetos monoaromáticos e suas características. Fonte: (DÖRR, 2008).

	benzeno ^(a)	tolueno ^(b)	etilbenzeno ^(b)	o-xileno ^(d)	m-xileno ^(d)	p-xileno ^(d)
Sinônimos	benzol	metilbenzeno fenilmetano toluol	feniletano etilbenzol	1,2-dimetilbenzeno o-metiltolueno 1,2-xileno	1,3-dimetilbenzeno m-metiltolueno 1,3-xileno	1,4-dimetilbenzeno p-metiltolueno 1,4-xileno
Estrutura química						
CAS number	71-43-2	108-88-3	100-41-4	95-47-6	108-38-3	106-42-3
Massa molecular (g/mol)	78,11	92,14	106,17	106,17	106,17	106,17
Solubilidade em água (20 °C) (mg/L)	1770	520	150	170	200	200
Densidade específica (20 °C) (g/mL)	0,877	0,867	0,867	0,880	0,864	0,861
Pressão de vapor (25 °C) (mmHg)	74,6	22	7	7	8,29	9
Viscosidade (20 °C) (cP)	0,647	0,580	0,678	0,802	0,608	0,635
Ponto de fusão (°C)	5,5	-95	-95	-25,2	-47,8	13,2
Ponto de ebulição (°C)	80,1	110,6	136	144,5	139,1	138,4
Temperatura de ignição (°C)	498	480	432	463	527	528
Classificação de risco	classe 3 carcinogênico	classe 3	classe 3	classe 3	classe 3	classe 3
Características	inflamável tóxico	inflamável nocivo	inflamável nocivo	Inflamável nocivo irritante	inflamável nocivo irritante	inflamável nocivo irritante

A forma mais comum de contaminação biológica, ocorre pela inalação do composto volatizado, ao ser emitido para o ambiente na queima do combustível. Outras formas de contaminação, é através do contato com a pele ocasionado pelo manejo direto, e na ingestão de águas que podem estar contaminadas com BTEX, podendo lesionar o sistema nervoso central, e em uma exposição aguda, ocasionar o óbito (BRITO, 2004).

3.2. CONTAMINAÇÃO DO SOLO POR HIDROCARBONETOS

A percolação de combustíveis em solo urbano, gera preocupação, uma vez que os compostos presentes nos combustíveis automotivos derivados de petróleo, apresentam mobilidade neste ambiente, podendo atingir o lençol freático, e conseqüentemente, aumentando o risco de ingestão de compostos nocivos à saúde humana e de animais por meio do consumo da água contaminada (HEIDERSCHIEDT, PEREIRA, BURGHARDT, 2016).

Em seu estudo, Brito (2004) apontou que na cidade de Joinville no estado de Santa Catarina, dos 65 postos de serviço existentes na cidade, apenas um não possuía nenhum tipo de

vazamento.

De acordo com a tabela abaixo (Tabela 2), as concentrações de benzeno, xileno, etilbenzeno e tolueno, não devem ultrapassar os valores permitidos, pois apresentam risco à saúde humana.

Tabela 2. Padrão de potabilidade para substâncias para consumo humano. Fonte: Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011).

Parâmetro	Valores máximos permitidos
Benzeno	5 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Etilbenzeno	0,2 mg.L^{-1}
Tolueno	0,17 mg.L^{-1}
Xileno	0,3 mg.L^{-1}

Em julho de 2000, aproximadamente quatro milhões de litros de óleo cru, vazaram do Oleoduto Santa Catarina – Paraná (OSPAR) no Rio Iguaçu, tornando-se um dos maiores acidentes ambientais do estado, juntamente com outro acidente que ocorreu no ano seguinte, na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), onde 52 mil litros de óleo vazaram de um oleoduto, e as concentrações de HAP chegaram a 1416 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (AGOSTINIS et al., 2017).

De acordo com Tyagi (2010), quando ocorre um acidente que libera grandes quantidades do combustível no ambiente, a remoção/remediação do local é feita imediatamente, acionado pelas autoridades. Porém, em casos onde se estoca combustíveis (gasolina ou diesel), como nas refinarias ou nos postos de serviço, a liberação pode ser lenta, o que dificulta a detecção, e, enquanto o vazamento não é descoberto ele é contínuo, aumentando a contaminação do solo e a possibilidade de contaminar águas subterrâneas.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), órgão consultivo e deliberativo do Brasil, orienta os valores de prevenção do BTEX presentes no solo e na água na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3. Tabela valores orientados para solo e água subterrânea (CONAMA 420/09)

		Solo (ppm de peso seco) (1)					Água subterrânea (ppb)
				Investigação			
Substâncias	CAS nº	Referência de qualidade	Prevenção	Agrícola APMax	Residencial	Industrial	Investigação
Benzeno	71-43-2	na	0,03	0,06	0,08	0,15	5*
Estireno	100-42-5	na	0,2	15	35	80	20*
Etilbenzeno	100-41-4	na	6,2	35	40	95	300**
Tolueno	108-88-3	na	0,14	30	30	75	700**
Xilenos	1330-20-7	na	0,13	25	30	70	500**

Legenda:

PPM – Partes por milhão;

PPB – Partes por bilhão;

(1) – Para comparação com valores orientadores, utilizar as recomendações dos métodos 3050b (exceto para o elemento mercúrio) ou 3051 da USEPA-SW-846 ou outro procedimento equivalente, para digestão ácida de amostras de solos na determinação das substâncias inorgânicas por técnicas espectrométricas.

na – Não se aplica para substâncias orgânicas.

* Padrões de potabilidade de substâncias químicas que representam risco à saúde definidos na Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde.

** Valores calculados com base em risco à saúde humana, de acordo com o escopo desta Resolução. Diferem dos padrões de aceitação para consumo humano definidos na Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde e dos valores máximos permitidos para consumo humano definidos pelo Anexo I da Resolução CONAMA nº 396/2008.

A norma técnica ABNT 16161/2015, estabelece os requisitos gerais que os tanques metálicos, destinados ao armazenamento subterrâneo de combustíveis inflamáveis devem possuir. Porém, o número de áreas contaminadas devidos a vazamentos de combustível de postos de serviço, correspondem a uma fração elevada quando comparada com os outros fatores no estado de São Paulo.

A CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), órgão responsável pelas diretrizes das leis ambientais de São Paulo, divulgou que somente no ano de 2016, das 5662 áreas contaminadas identificadas naquele ano, 4137 áreas estavam contaminadas devido às atividades de postos de serviço, e o restante dividido nas demais setores tais como, indústria (1002), comércio (300), resíduo (172), acidentes (28), desconhecido (20) e agricultura (3)

(Tabela 03). Portanto, aproximadamente 75% das áreas contaminadas somente no estado de São Paulo, é, devido a vazamentos que ocorrem de postos de serviço, e envolvem a contaminação do solo por BTEX (CETESB, 2017).

A mesma companhia, divulgou informações sobre áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo (Tabela 4) e também discrimina o número de áreas contaminadas de acordo com o poluente.

Tabela 4. Quadro com a relação de número de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo no ano de 2016. Fonte: (CETESB 2016)

Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado de São Paulo - dezembro de 2016						
Região	Atividade					Total
	Comercial	Industrial	Resíduos	Postos de combustíveis	Acidentes/ Desconhecida/ Agricultura	
São Paulo	109	341	51	1.533	16	2.050
RMSP - outros	61	252	29	626	11	979
Interior	93	299	62	1.503	19	1.976
Litoral	32	46	25	264	3	370
Vale do Paraíba	5	64	5	211	2	287
Total	300	1.002	172	4.137	51	5.662

Como podemos observar na figura abaixo (Figura 1), os combustíveis automotivos são o segundo grupo de contaminante encontrados no estado de São Paulo, ficando atrás somente dos solventes aromáticos, que também são hidrocarbonetos, mas utilizados para outras funções, que não seja no consumo pelo setor de transporte.

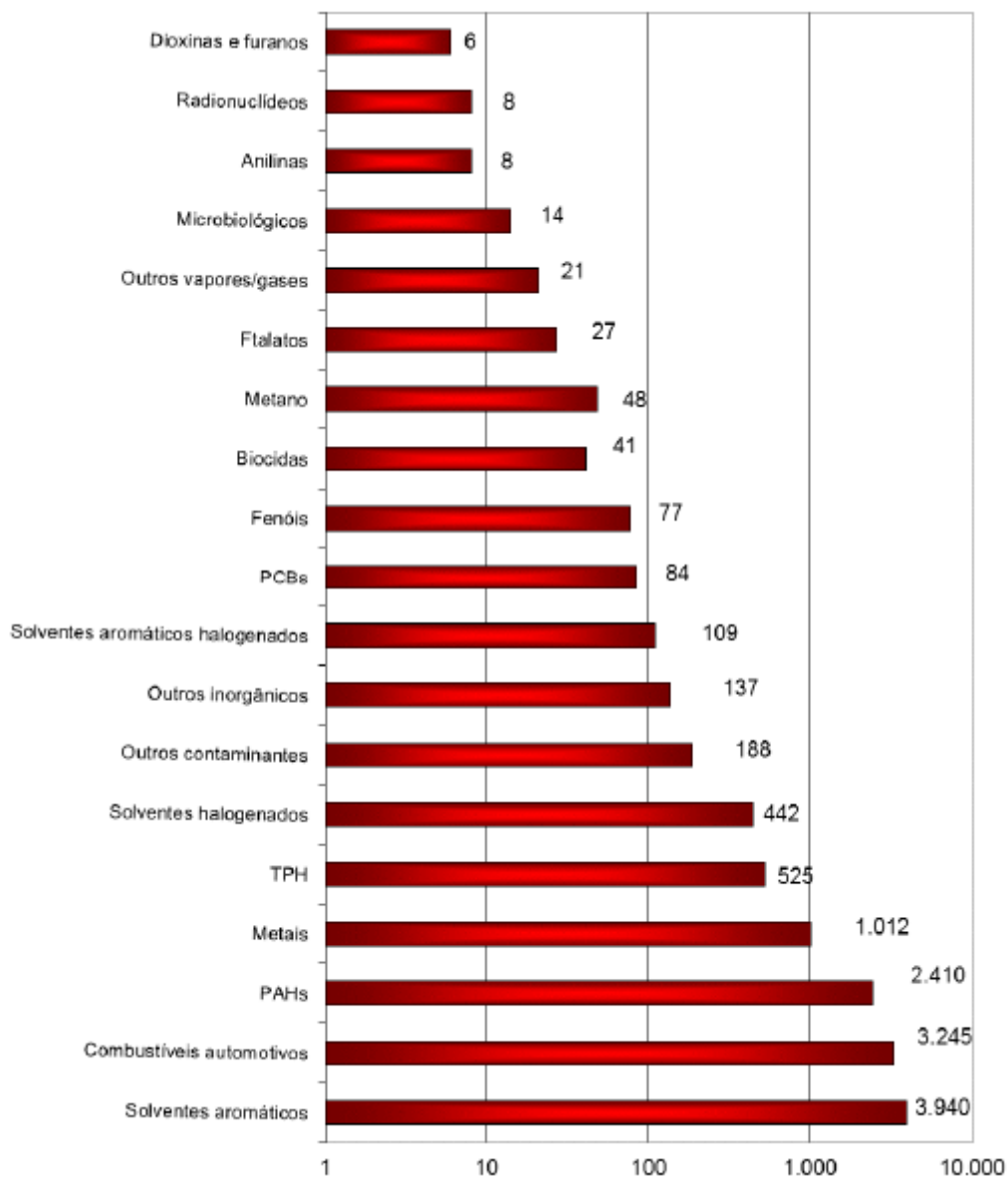


Figura 1. Gráfico com os grupos de contaminantes – dezembro 2016. Fonte: (CETESB 2016)

Um dos fatores que contribuem com esse alto índice de contaminações dos postos de serviço é o tempo de vida útil de um tanque de armazenamento, que é de aproximadamente 25 anos, porém indica-se o uso até 15 anos. No Brasil, muitas vezes o tempo de uso ultrapassa essa estimativa, aumentando os riscos de derramamento de combustível no solo (BRITO, 2004).

3.3. BIORREMEDIAÇÃO

Após um período de exposição aos poluentes, ocorre a predominância de microrganismos no local, resistentes a toxicidade, e até mesmo, em muitos casos, adquirem a capacidade de utilizar o poluente como fonte de carbono, utilizando vias metabólicas que possibilitam a degradação destes compostos em substâncias com um grau menor grau de toxicidade, ou até mesmo a sua completa mineralização, sendo está uma das características da atenuação natural (DEON et al, 2012).

Ao ocorrer o caso de contaminação por diesel, inicia-se processo de atenuação natural, no qual é a remediação passiva do ambiente, onde os microrganismos indígenas capazes de degradar o contaminante, começam a utilizar ele como fonte de carbono, além de outros fatores como, a volatilização, diluição, adsorção, entre outros. Porém o longo período necessário para que esses processos ocorram, e o fato de que muitos microrganismos autóctones não apresentam capacidade de degradar o diesel, torna o processo inadequado (MEGHARAJ et al., 2011)

Ao analisar que a atenuação natural, não será eficiente para a remediação da área contaminada, emprega-se outros tratamentos, como as técnicas físico-químicas, como exemplo, a oxidação química e aterro do solo contaminado. Porém são técnicas dispendiosas e agressivas ao ambiente, e, em comparação com a biorremediação, os tratamentos físico-químicos, apresentam um elevado custo (Figura 2) (ANDRADE et al, 2010).

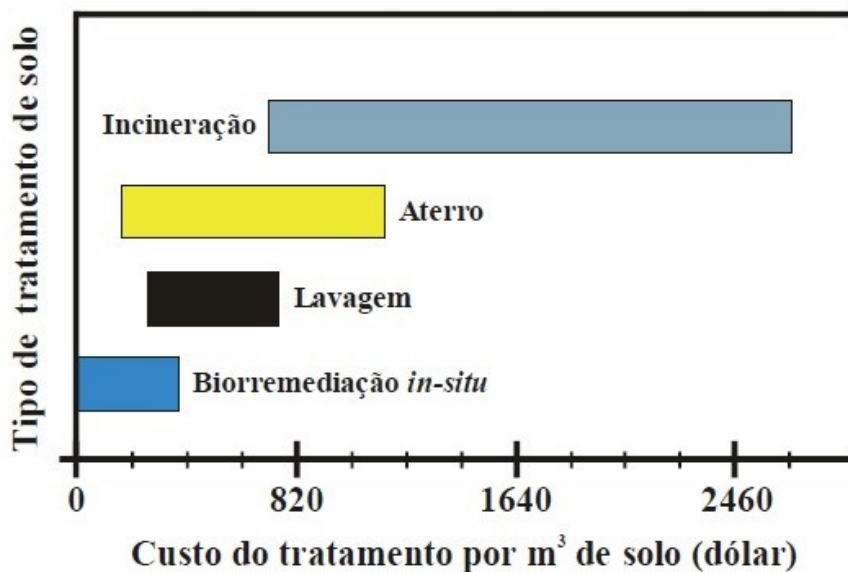


Figura 2. Custo do tratamento por m³ de solo por diferentes tratamentos. Fonte: (ANDRADE et al, 2010).

Apesar da diferença de custo entre as técnicas voltadas a remediação, no estado de São Paulo, a biorremediação é a décima primeira técnica mais utilizada para tratar áreas contaminadas (Figura 3) (CETESB, 2017). Uma das possíveis explicações é que as técnicas físico-químicas possuem um maior respaldo técnico-científico, enquanto as pesquisas de biorremediação ainda são incipientes.

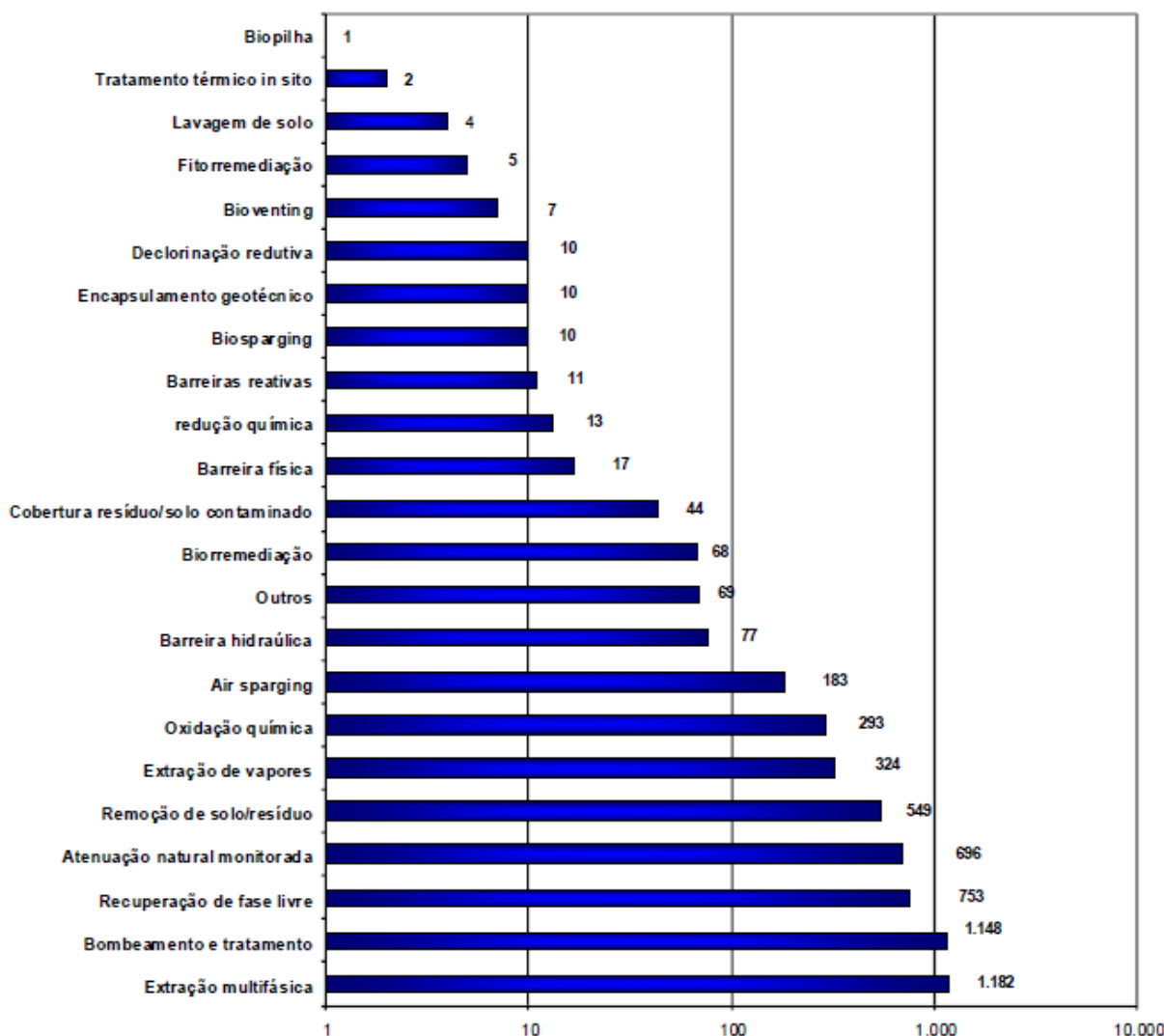


Figura 3. Gráfico com a utilização de técnicas de remediação implantadas para remediação de áreas contaminadas no estado de São Paulo – dezembro de 2016. Fonte: (CETESB, 2017)

A biorremediação é uma alternativa aos métodos tradicionais, na qual se utiliza a atividade microbiana, de maneira intencional, visando à degradação dos contaminantes, até apresentarem valores abaixo dos limites permitidos ou até mesmo sua completa mineralização (SILVA et al., 2009).

As bactérias mais utilizadas para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo são: *Rhodococcus erythropolis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* e *Mycobacterium frederikbergense*, enquanto os fungos mais utilizados são:

Cladosporium, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Cladophialophoria* e *Trichoderma asperellum* (STELIGA, JAKUBOWICZ, KAPUSTA, 2012).

A biorremediação pode ser executada *in situ* ou *ex situ*, porém na maioria dos casos é realizada *in situ* o que diminui os custos da execução, em comparação com os métodos tradicionais de remediação, além de oferecer um menor risco de exposição aos poluentes para os executores do projeto, bem como promove a restauração ecológica do ambiente, e apresenta um menor grau de perturbação no ambiente (JUWARKAR, 2010).

Os tratamentos de biorremediação englobam vários métodos que corroboram com a sua eficácia, sendo alguns deles a bioestimulação que busca estimular o crescimento do número de células de microbianas presentes no local, aumentando a velocidade da biodegradação. O outro método é a bioaumentação, na qual é realizada a inserção de microrganismos alóctones, em um local contaminado, com o propósito de aumentar a população microbiana com capacidade de degradação do poluente, e, quando os microrganismos indígenas não apresentam capacidade de degradar o contaminante (ANDRADE, 2010).

No processo de bioaumentação, podem ser utilizados cepas isoladas, ou a mistura de cepas para a formação de consórcios microbianos, no qual a mistura de culturas tem demonstrado vantagens em relação a utilização de cepas isoladas, já que o consórcio, apresenta interações sinérgicas entre os seus membros, no qual pode auxiliar na completa degradação do contaminante (CERQUEIRA et al., 2011).

A biodegradação dos hidrocarbonetos, sejam eles alifáticos ou aromáticos, normalmente seguem um certo padrão, no qual os microrganismos tem maior facilidade em degradar os poluentes na seguinte ordem: n-alcenos, alcenos de cadeia ramificada, alcenos de cadeia ramificada, monoaromáticos, cicloalcenos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e asfaltenos (fração pesada do fluído de petróleo) (TYAGI, DA FONSECA, DE CARVALHO, 2011).

Durante o processo de biorremediação, existem variáveis que afetam diretamente a taxa de biodegradação dos microrganismos, das quais pode-se destacar: a quantidade e a variedade de microrganismos presentes no local, a temperatura, o pH, a umidade, a salinidade, o teor de oxigênio, a granulometria, o tipo de solo e a quantidade de nutrientes (ANDRADE, 2010).

O processo de oxidação dos hidrocarbonetos acontece basicamente com um ataque das enzimas dioxigenases ou monooxigenases ao anel aromático, no qual se quebra a ressonância do mesmo, desestabilizando a molécula, formando o catecol. Após a formação do catecol, a via metabólica finaliza na formação do piruvato, no qual é consumido no ciclo de Krebs (MAZZEO

et al, 2010).

As figuras a seguir, demonstram visualmente, as vias de degradação aeróbias do benzeno (Figura 4 e 5), do tolueno (Figura 6, 7 e 8), etilbenzeno (Figura 9), e xileno (Figura 10 e 11), bem como suas respectivas etapas, até a formação do piruvato, utilizado no ciclo de Krebs.

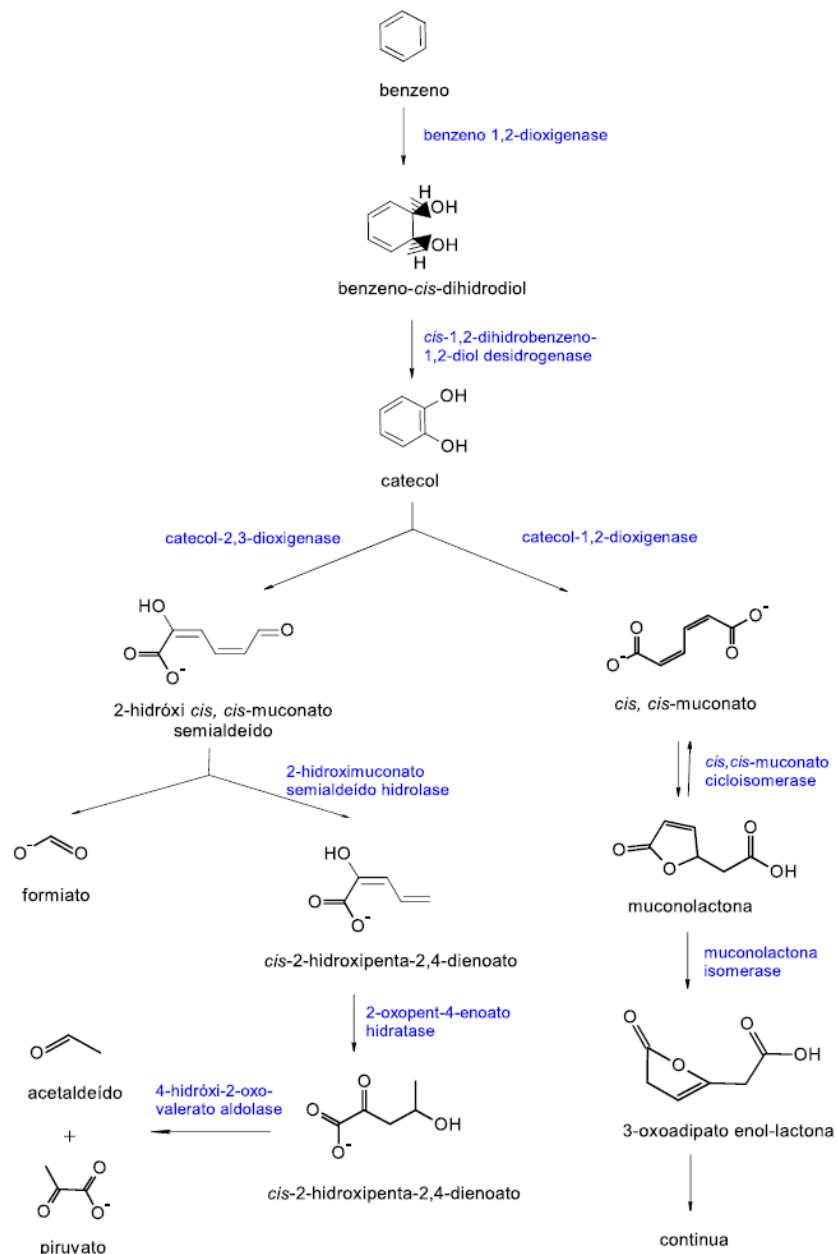


Figura 4. Via de degradação aeróbia do benzeno (continua). Fonte: (DOOR, 2008).

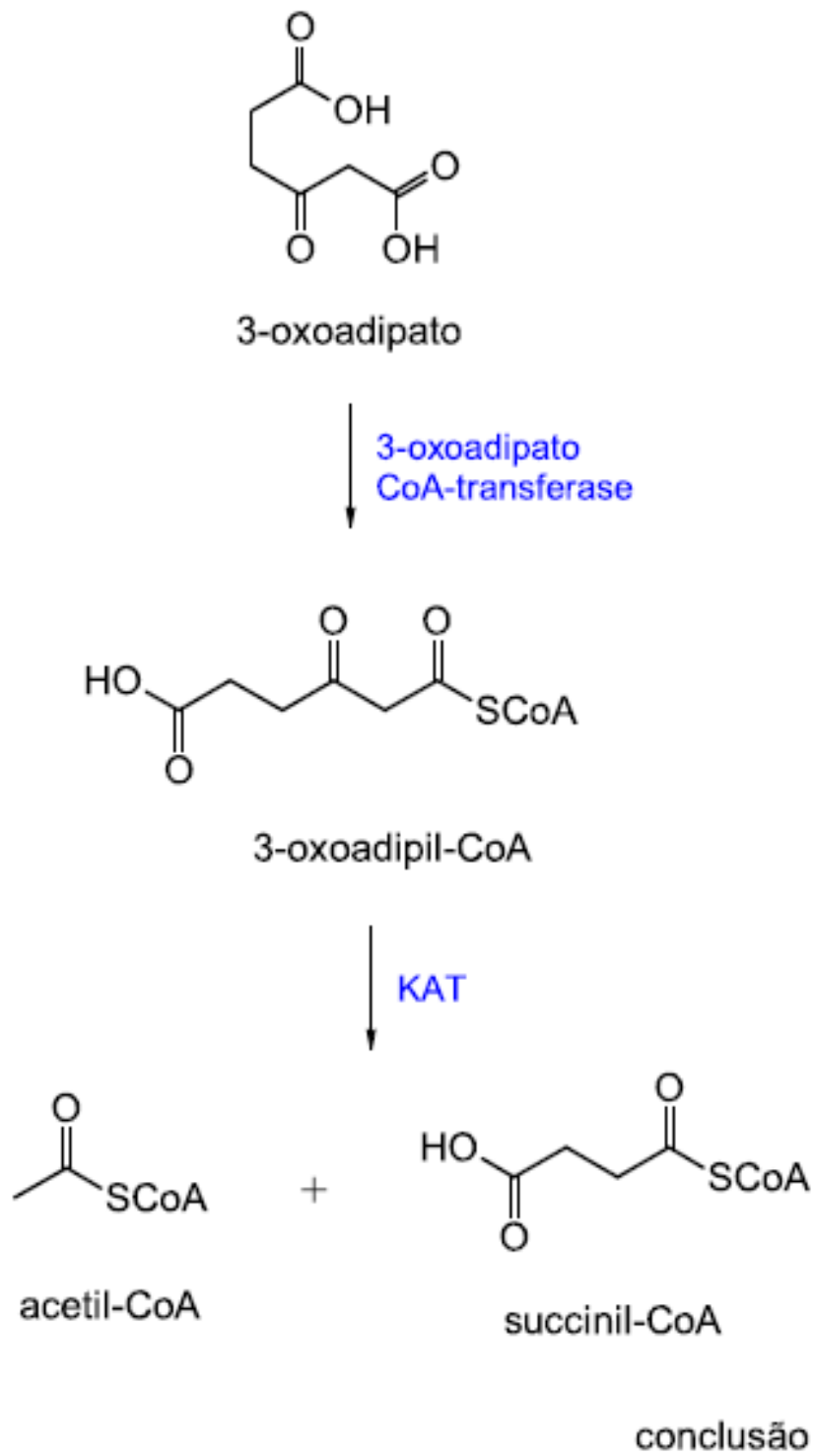


Figura 5. Via de degradação aeróbia do benzeno (conclusão). Fonte: (DÖRR, 2008).

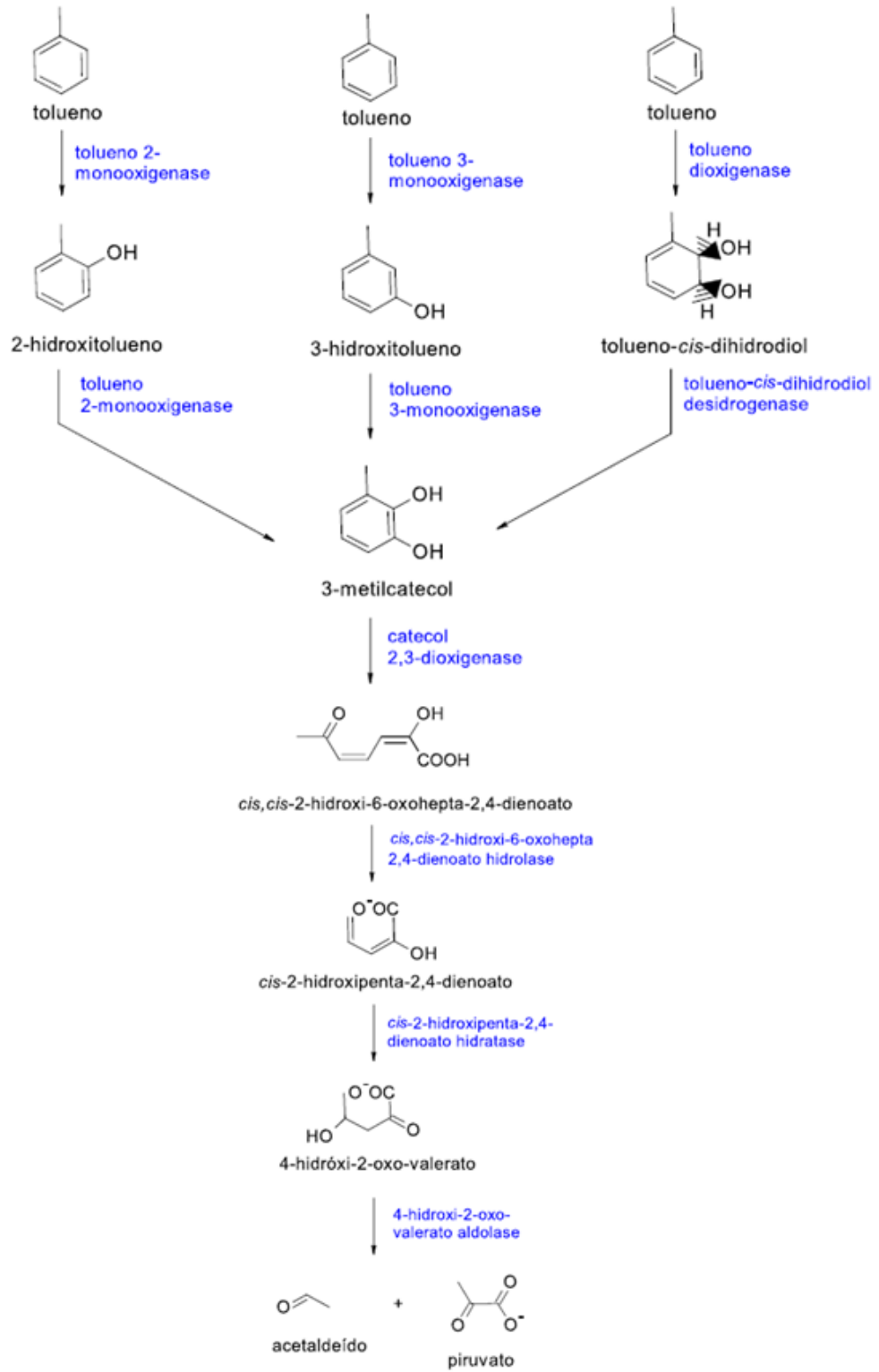


Figura 6. Via de degradação aeróbia do tolueno. Fonte: (DÖRR, 2008).

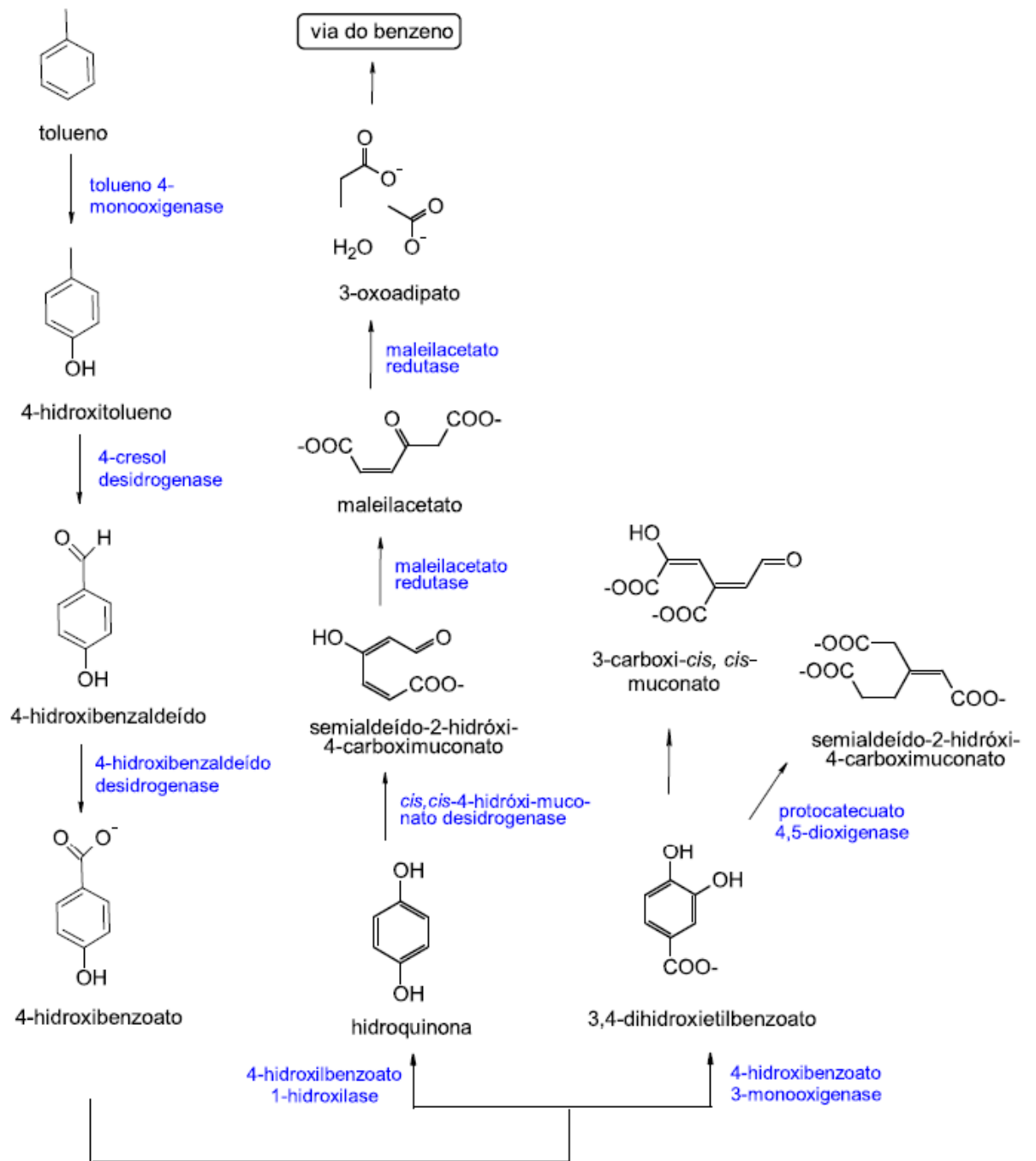


Figura 7. Via de degradação aeróbia do tolueno pela ação da enzima tolueno 4- monooxygenase. Fonte: (DÖRR, 2008).

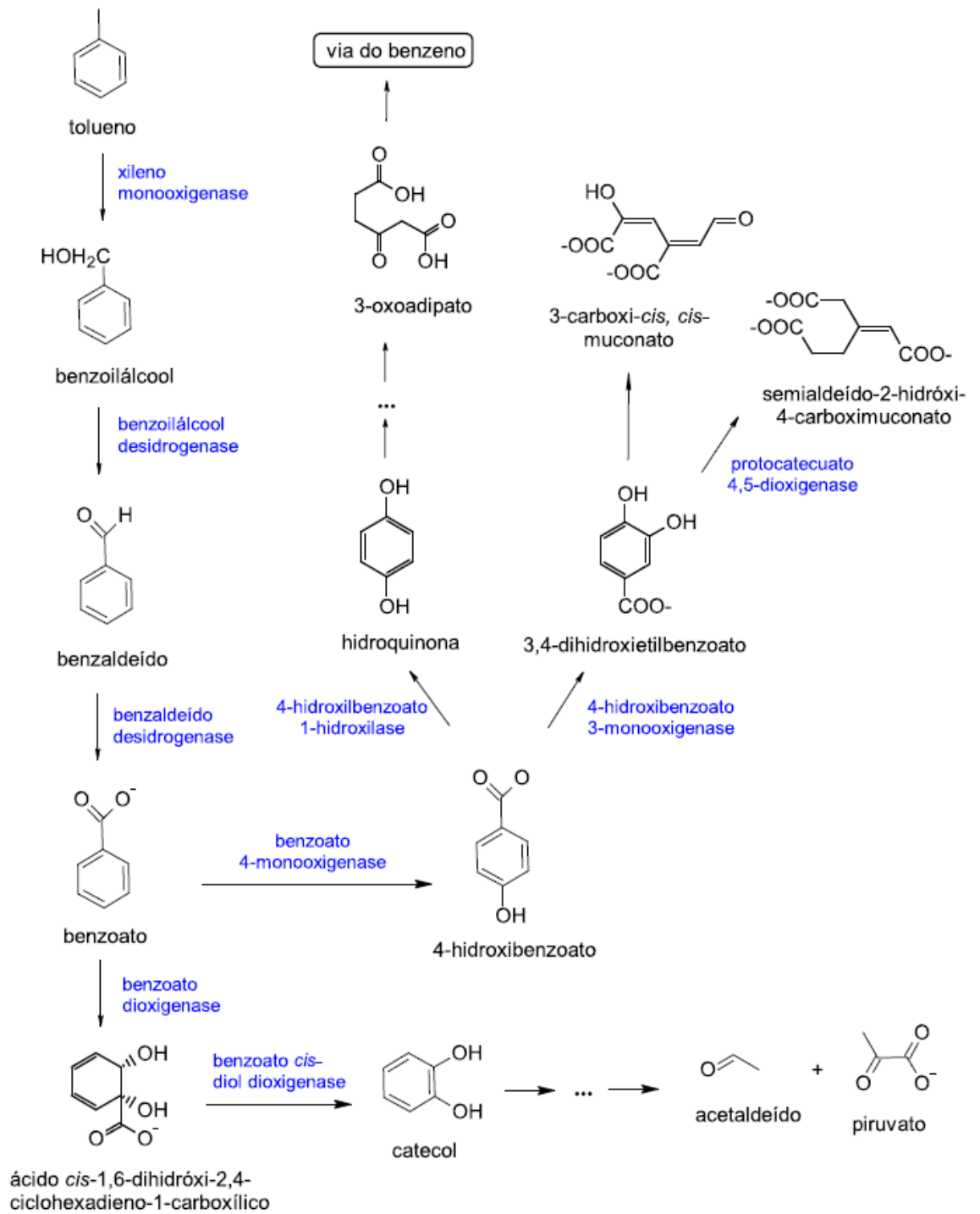


Figura 8. Via de degradação aeróbia do tolueno via enzima xileno monooxigenase. Fonte: (DÖRR, 2008).

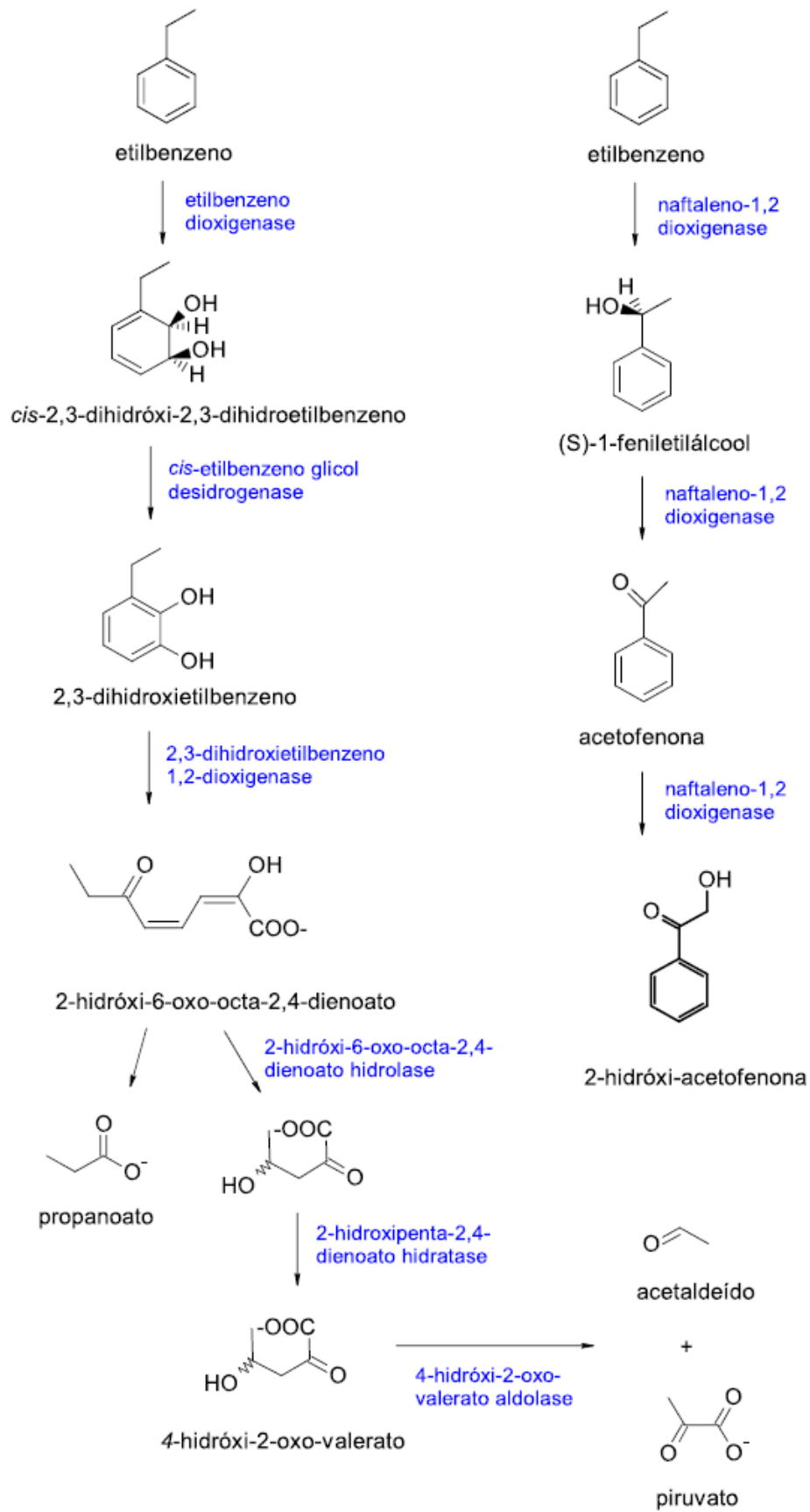


Figura 9. Via de degradação aeróbia do etilbenzeno. Fonte: (DÖRR, 2008).

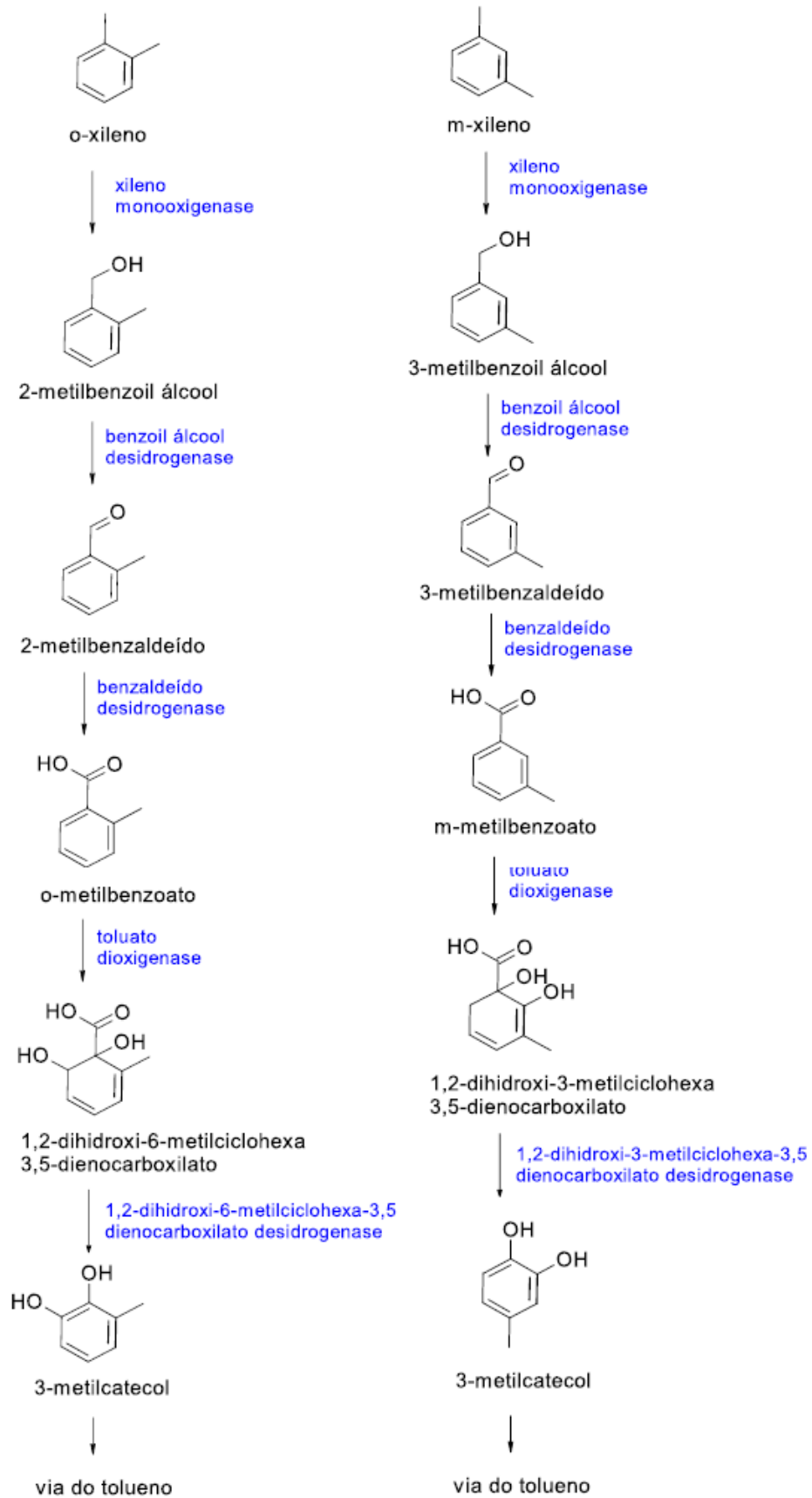


Figura 10. Via de degradação aeróbia do o- xileno e m- xileno. Fonte: (DÖRR, 2008).

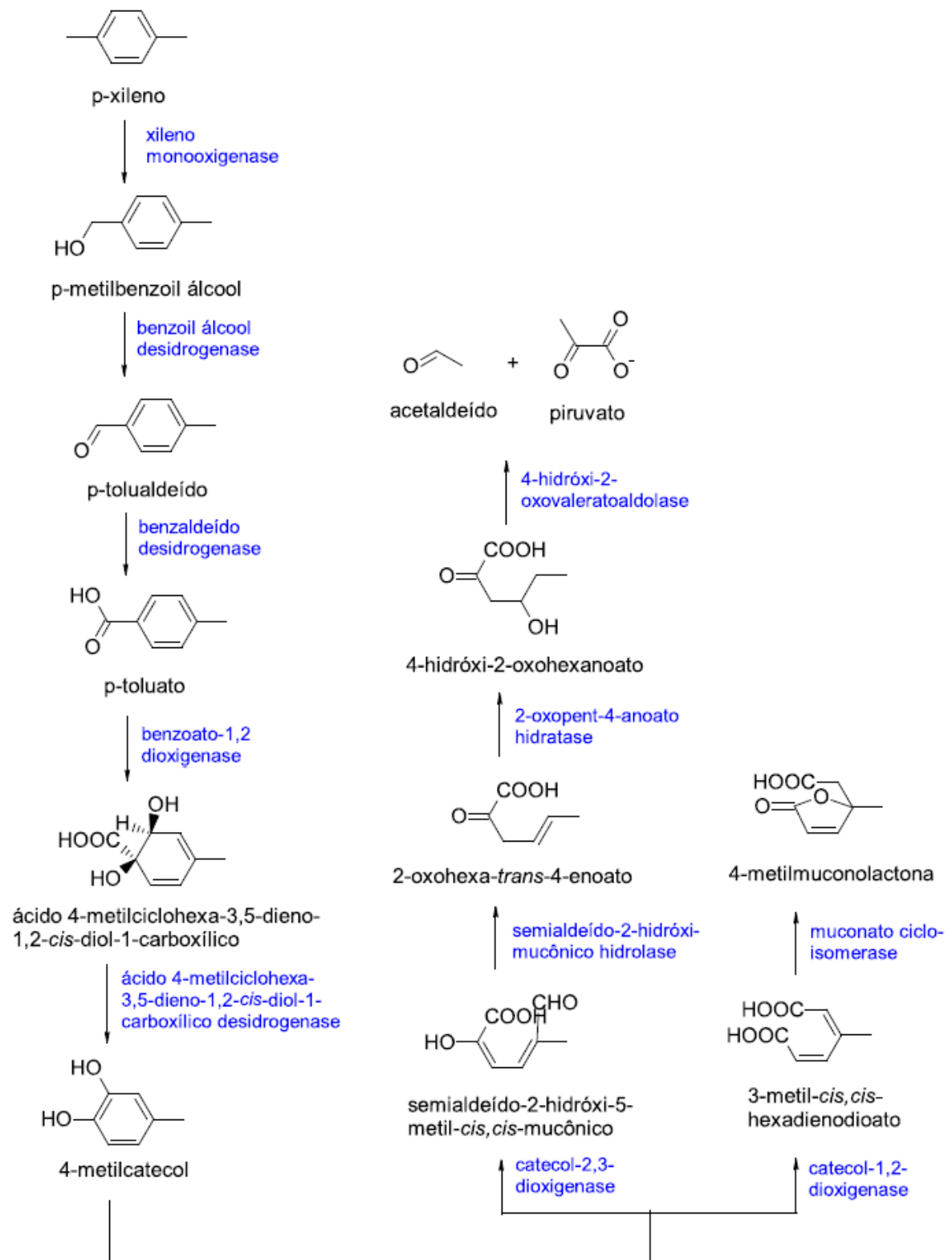


Figura 11. Via de degradação aeróbia do p- xileno. Fonte: (DÖRR, 2008).

Com o alto número de áreas contaminadas decorrentes a vazamentos de combustíveis fósseis, e o alto custo das técnicas tradicionais de remediação físico-química, o emprego da biorremediação torna-se uma alternativa viável para solucionar os problemas ambientais decorrentes destes acidentes, visando um menor custo da operação (ANDRADE et al, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE DIESEL

4.1.1 Local e características da amostragem

A amostragem foi realizada em março de 2017, em uma local com histórico de contaminação por diesel, ocasionado durante o processo de abastecimento dos veículos na propriedade rural, no município de Francisco Beltrão - PR. Neste local realizou-se a coleta de solo em uma profundidade de 0 a 15 cm coletou-se em três pontos diferentes. Ao todo, foram coletados cerca de 15 kg de solo contaminado com diesel. As amostras de solo foram armazenadas em sacos plásticos, e encaminhadas para o laboratório da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Francisco Beltrão, em temperatura ambiente. No laboratório, os sólidos grosseiros foram retirados, utilizando peneiras com malhas de 2 mm de abertura. Posteriormente, as amostras foram misturadas para formar uma amostra composta.

4.1.2 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados

Após o processo de homogeneização, foi preparado uma solução contendo 0,5% de NaCl e 5% da amostra do solo. Foi retirado uma alíquota de 0,1 mL desta solução e pipetado em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura. A solução foi inoculada em 60 placas de Petri, com três diferentes meios de cultura: ágar nutriente (A.N.), batata dextrose ágar (BDA), e meio solo, previamente esterilizadas na autoclave, a uma temperatura de 121°C durante 15 minutos (Figura 12).

Após a inoculação, as placas foram incubadas a 30° C por 24 horas. As colônias crescidas, que apresentaram diferenças morfológicas visuais tais como: aspecto, tamanho, coloração, foram isoladas em placas de Petri, contendo meio ágar nutriente.

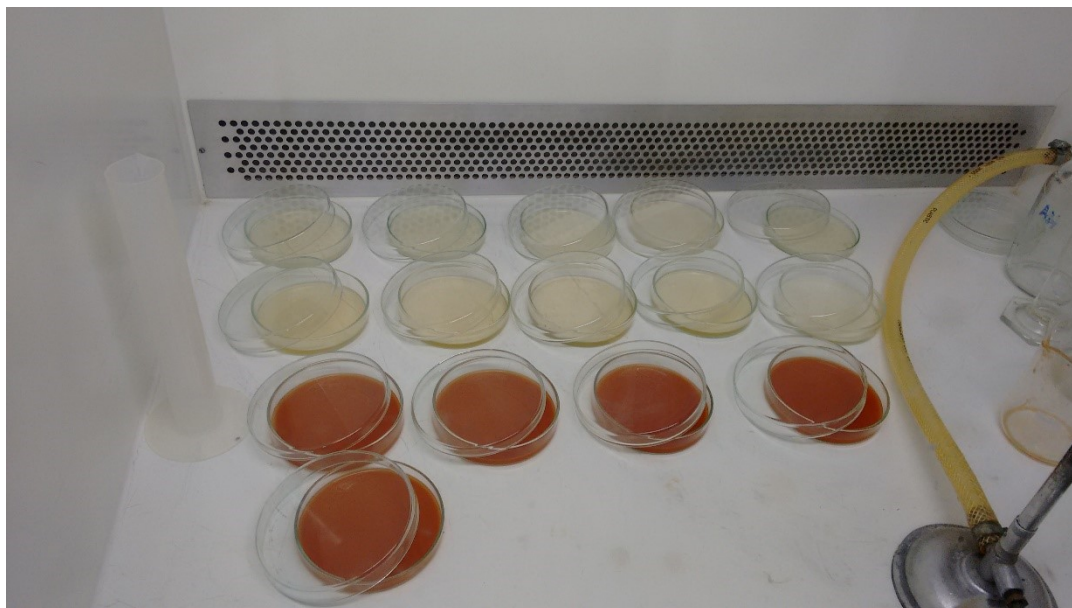


Figura 12. Preparo de placas de Petri com os três meios utilizados para o crescimento de microrganismos do solo contaminado.

Os microrganismos isolados, foram submetidos a um meio seletivo, contendo meio mineral Tanner e 100 μL de diesel, como única fonte de carbono. Na sequência, as culturas que mostraram capacidade de degradação, foram submetidas à análise das características fenotípicas, na qual procedeu-se a coloração de Gram, e as análises de morfologia, cor, e aspecto das colônias. Após essas análises os microrganismos isolados, foram repicados em ágar nutriente, sendo incubados por 24 horas, a uma temperatura de 28°C, e posteriormente, armazenados a uma temperatura de 4°C.

4.2 BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO

4.2.1 Montagem dos consórcios microbianos

Os microrganismos isolados (14 bactérias e 7 fungos) foram agrupados em meio líquido em erlenmeyers de 250 mL. Foram adicionados aos erlenmeyers, 50 mL de meio mineral contendo 100 μL de diesel, como única fonte de carbono, sendo que todo o material foi previamente esterilizado em autoclave à uma temperatura de 121°C durante 15 minutos. As colônias em meio sólido foram utilizadas como inóculo de cada cultura isolada, sendo que cada colônia das cepas foram recolhidas com o auxílio de uma alça de platina, previamente flambada no bico de Bunsen, e depositadas nos erlenmeyers. Foram feitos três consórcios microbianos, sendo eles, bacteriano (CB), contendo as 14 bactérias, fúngico (CF), contendo os 7 fungos, e

bacteriano e fúngico (CBF) contendo todos os microrganismos isolados. Também foi feito um consórcio controle (CC), no qual continha somente o meio mineral Tanner, e o diesel. Os quatro consórcios foram incubados em mesa agitadora, a uma velocidade de 150 rpm, a temperatura ambiente.

Para a verificação do crescimento dos consórcios (curva de crescimento), a cada 24 horas, foram realizadas contagem em placa de Petri contendo meio ágar nutriente, utilizando $100 \mu\text{L}^{-1}$ das diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , durante 5 dias. As placas eram incubadas em BOD durante um período que variava de 24 horas (para o consórcio bacteriano), a 5 dias (para o consórcio fúngico e consórcio bacteriano + fúngico). Após o período de incubação as placas eram contadas e número de colônias expressos em unidades formadoras de colônias (UFC). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.2. Confeção de cápsulas contendo microrganismos

Para a confecção das cápsulas, foi preparado uma solução contendo uma substância geleificante e cultura microbiana. As culturas microbianas foram obtidas pelos consórcios, estando a uma concentração de 10^6 UFC.mL^{-1} .

Após o preparo da solução, a formação das cápsulas, se deu com o auxílio de uma bomba peristáltica, na qual as gotas da solução formavam as cápsulas ao entrar em contato com a solução reticulante. Maiores detalhes foram omitidos em função do potencial de patenteabilidade do processo.

4.2.3. Biodegradação de diesel no solo (microcosmos)

O delineamento experimental formou nove tratamentos (Tabela 5), os quais foram inoculados 1 mL com aproximadamente 10^6 UFC por microcosmo, o número de células microbianas, foi determinado através da curva de crescimento. Em três tratamentos (consórcio bacteriano, consórcio fúngico e consórcio bacteriano + fúngico), houve a inoculação direta (1 mL de meio líquido - 10^6 UFC), e, para os microcosmos que receberam os consórcios encápsulados, foram inseridas 0,44 g de cápsulas, com uma concentração de 10% da cultura

concentrada dos consórcios, na forma de meio de cultivo líquido. A umidade foi ajustada a cada 7 dias por meio da adição de 2 mL de água destilada, sem dióxido de carbono, armazenados em shot, esterilizado em autoclave, a 121° C durante 15 minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas (Figura 13), e foi conduzido por aproximadamente 30 dias.

Tabela 5 Tratamentos realizados na análise da respirometria e a quantidade de microrganismos inoculados

Tratamento	Inoculação
Branco	-
Controle	-
Atenuação natural	-
Bactérias	10^6 UFC.mL ⁻¹
Fungos	10^6 UFC.mL ⁻¹
Bactérias + Fungos	10^6 UFC.mL ⁻¹
Cápsulas bactérias	0,44 g
Cápsulas fungos	0,44 g
Cápsulas bactérias + fungos	0,44 g



Figura 13. Ensaio em microcosmos para a análise da evolução de C-CO₂ (respirometria).

Durante o período foram realizadas medições periódicas do CO₂ liberado pela decomposição do C-orgânico presente no solo, usando método descrito por Alef (1995).

Assim, para a captura do CO₂ liberado do solo pelos microrganismos foi utilizado copos plásticos contendo 20 mL de NaOH 0,05 M, previamente padronizado. (Figura 14). A quantificação indireta do CO₂ liberado era realizada a cada 24 horas. Para abertura dos microcosmos, era procedida o encerramento da reação através da adição de 5 mL de BaCl₂ 0,5 M. Na sequência era realizada a retrotitulação com HCL 0,05 M, previamente padronizado. Para sinalizar o ponto de viragem, foram adicionadas três gotas do indicador fenolftaleína 0,1%.



Figura 14. Microcosmos utilizados nos ensaios de respirometria, onde pode ser visto os recipientes plásticos contendo NaOH para captura química do CO₂ liberado.

4.3. ANÁLISE DE CRESCIMENTO, CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO E ESTATÍSTICA

4.3.1 Análise de crescimento

Os resultados da contagem dos isolados serão utilizados para a estimativa da cinética de crescimento. A taxa de crescimento, o número de gerações a cada 24 horas, e o tempo de gerações serão estimados pelas fórmulas: $K=(\log N_t - \log N_0)/0,301.t$; $N=(\log N_t - \log N_0)/0,301$ e $G=1/k$, respectivamente, onde N_0 = número inicial de células, N_t = número total de células (Prescott et al., 1997).

4.3.2 Cinética de degradação

A liberação de CO_2 nos ensaios de respirometria foram quantificados através da equação:

$$C - \text{CO}_2 \text{ gerado (mg.kg de solo seco}^{-1}) = (VB - VA).(M_C/2).M_{\text{HCl}}.(FC/m)$$

Onde VB é o volume em mL de HCL usado para titular o branco; VA é o volume de HCl usado para titular o tratamento; M_C é a massa molar do carbono em g.mol^{-1} ; M_{HCl} é a concentração em mol.L^{-1} da solução padrão de HCl; FC é o fator de correção da molaridade obtidos através da padronização ($M_{\text{HCl}}/M_{\text{NaOH}}$) e m é a massa de solo seco em kg.

4.3.3 Análise estatística

Os dados foram verificados quanto ao seu erro padrão utilizando o teste de distribuição de erro, utilizando os softwares Sigma Stat e Sigma Plot.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados foram enviados ao Instituto Tecnológico Vale, no município de Belém – PA, para a identificação por meio da técnica de sequenciamento do gene RNAr 16S, a fim de comparar as proximidades filogenéticas entre as cepas obtidas no trabalho e a sequência destas com o banco de dados *GenBank*, utilizando o programa BLAST, do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE DIESEL

5.1.1 Local e características da amostragem

Visando a obtenção microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, foi realizado uma amostragem de solo em local com histórico de contaminação, em uma propriedade rural no município de Francisco Beltrão. No momento da coleta, o solo apresentava indícios visuais de contaminação (Figura 15), proveniente do vazamento de tanque de armazenamento de diesel. A cor do solo na propriedade, naturalmente vermelho (latossolo), apresentava uma tonalidade escura (entre o cinza e o marrom), e cheiro característico de combustível no local de coleta, demonstrando visualmente estar contaminado pelo combustível.



Figura 15. Local de amostragem com histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo.

No momento da coleta, o solo estava sendo contaminado acidentalmente, devido a vazamentos durante o processo de abastecimento dos veículos do local. No qual a coloração escura (típico de um solo contaminado com combustível) não se estendia a mais que um metro quadrado.

Para o armazenamento do combustível, o proprietário utilizava um tanque metálico, com

uma única parede, sem revestimento. O tanque estava abrigado em uma estrutura de madeira, não estando totalmente isolado das intempéries do ambiente. Para o abastecimento dos veículos, uma mangueira de plástico era utilizada, no qual estava acoplada uma torneira simples, imprópria para esse uso, sem o dispositivo de fechamento automático, que poderia diminuir a contaminação do solo.

Portanto, a forma de armazenamento não estava de acordo com a norma da ABNT 16161/2015. Bem como os equipamentos para o abastecimento dos veículos, poderiam contribuir para a contaminação do solo por diesel.

5.1.2 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados

Após o período de incubação das placas contendo o solo contaminado como inóculo, obteve-se distintas colônias de microrganismos (Figura 16), crescendo inclusive, no meio solo, que foi proposto inicialmente, para verificar se os microrganismos cresciam com os nutrientes e o carbono disponível no solo, após passar pelo processo de esterilização (autoclavagem).

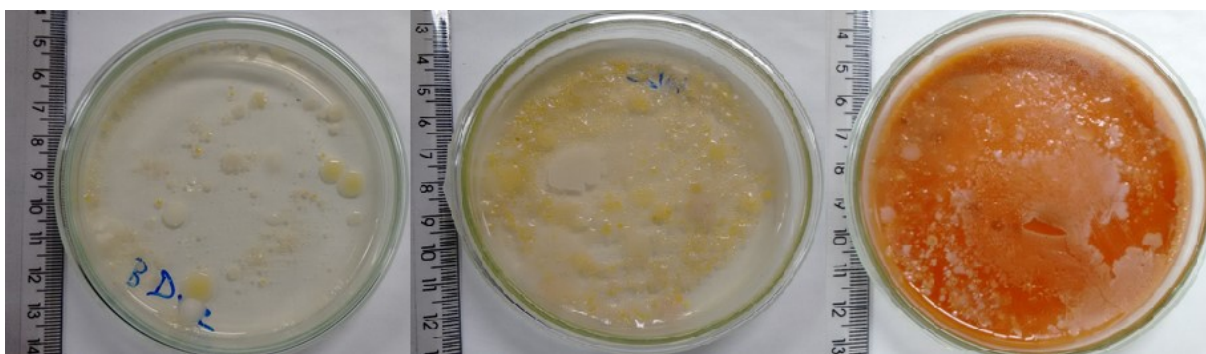


Figura 16 Microrganismos presentes no solo contaminado, utilizando 3 meios de cultura diferentes

Posteriormente, os microrganismos, passaram pelo processo de isolamento sucessivamente em meio seletivo (meio mineral Tanner) contendo diesel como única fonte de energia e carbono até o seu total isolamento, no qual, após 45 dias de repliques de culturas, obteve-se 21 cepas isoladas, sendo 14 cepas bacterianas e 7 cepas fúngicas.

Esse processo, visa prospectar quais os microrganismos tem a real capacidade de utilizar o poluente como fonte de carbono, uma vez que a constituição básica do meio é formada unicamente por compostos inorgânicos (Figuras 17 e 18).



Figura 17. Cepa fúngica isolada em meio mineral seletivo.

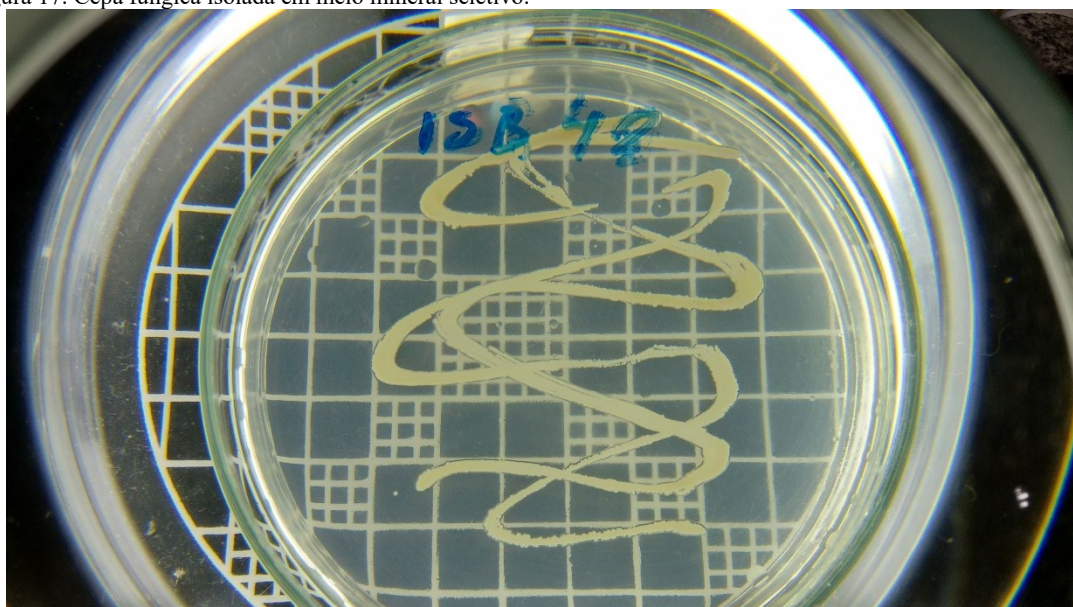


Figura 18. Cepa bacteriana isolada em meio mineral seletivo

Após a obtenção dos isolados, as bactérias foram submetidas a coloração de Gram, para separar os isolados em células Gram positivas e Gram negativas, além da análise de outras características fenotípicas e morfológicas, com intuito de inibir a replicação de colônias visualmente semelhantes.

Do total das 14 bactérias, oito eram Gram negativas, e seis Gram positivas (Tabela 6), evidenciando uma certa tendência que em solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, frequentemente, a maioria das bactérias são Gram negativas, pois, de acordo com DÖRR (2008), esse grupo bacteriano são mais tolerantes aos compostos lipofílicos que as Gram positivas.

Tabela 6. Características das cepas isoladas

Código	Microrganismo	Borda	Cor	Morfologia	Gram
ISA 11	Bactéria	Lisa	Amarela	Cocos	Negativa
ISA 14	Bactéria	Lisa	Amarela	Cocos	Positiva
ISB 41	Bactéria	Lisa	Creme	Cocos	Negativa
ISA 15	Bactéria	Lisa	Amarela	Cocos	Negativa
ISA 10	Bactéria	Liso	Creme	Cocos	Negativa
ISA 01	Bactéria	Liso	Creme	Bacilos	Positiva
ISA 04	Bactéria	Lisa	Creme	Diplococos	Negativa
ISA 05	Bactéria	Lisa	Amarela	Estafilococos	Positiva
ISB 42	Bactéria	Lisa	Amarela	Estreptococos	Positiva
ISB 45	Bactéria	Lisa	Creme	Cocos	Negativa
ISA 12	Bactéria	Lisa	Creme	Bastonetes	Positiva
ISS 33	Bactéria	Lisa	Creme	Cocos	Negativa
ISA 09	Bactéria	Lisa	Creme	Diplococos	Negativa
ISS 28	Fungo	Irregular	Verde	ND	ND
ISS 47	Fungo	Irregular	Verde	ND	ND
ISA 17	Fungo	Irregular	Preta	ND	ND
ISB 38	Fungo	Irregular	Verde	ND	ND
ISB 49	Fungo	Irregular	Verde	ND	ND
ISB 31	Fungo	Irregular	Branco	ND	ND
ISB 21	Fungo	Irregular	Branco	ND	ND

Legenda: ISA – Ágar Nutriente; ISB – Batata Dextrose Ágar; ISS – Meio Solo. ND – Não Determinado.

5.2 BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL NO SOLO

5.2.1 Montagens dos consórcios microbianos

Após a obtenção dos isolados (Figura 19), os mesmos foram agrupados em consórcios microbianos, sendo nomeados como consórcio bacteriano (CB), contendo as 14 bactérias, consórcio fúngico (CF) contendo os 7 fungos, consórcio bacteriano e fúngico (CBF), contendo todos os microrganismos isolados, e, um consórcio controle (CC), no qual não houve a inoculação de microrganismo.

Os consórcios foram montados em erlenmeyers, e a cada 24 horas, fazia-se a diluição seriada, a fim de acompanhar a taxa de crescimento, através da contagem de colônias.

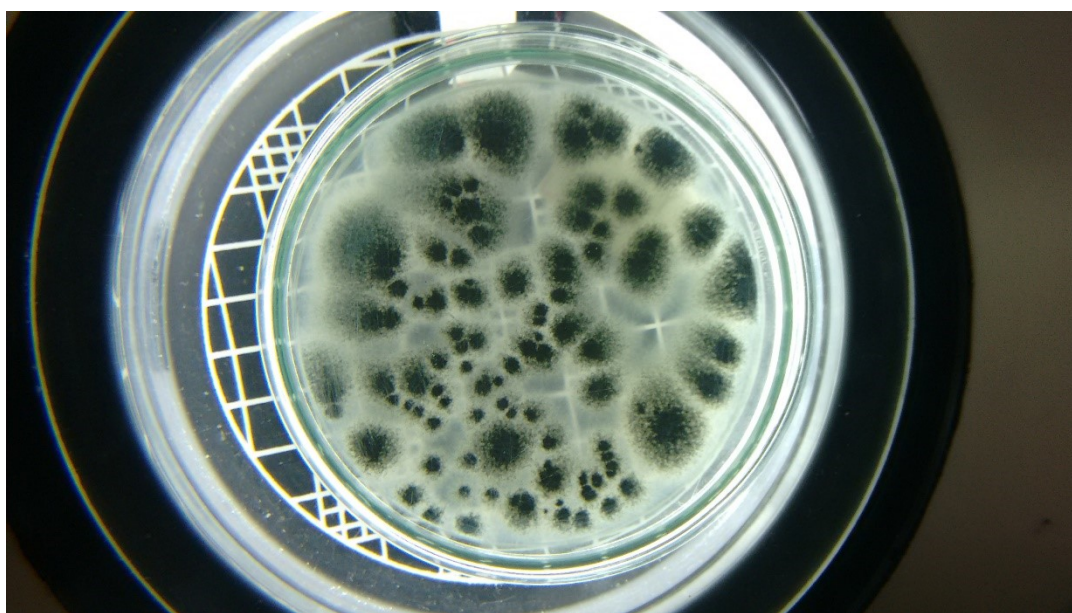


Figura 19. Colônias de um isolado fúngico utilizado na análise de curva de crescimento.

Como podemos observar (Figura 20), cada consórcio respondeu de uma maneira ao meio mineral contendo hidrocarbonetos de petróleo. O consórcio bacteriano foi o que apresentou o melhor desempenho, sendo que este atingiu 8,53 Log UFC. A alta oscilação no crescimento entre consórcios deve-se, possivelmente, a resposta do metabolismo das bactérias, que é superior ao dos fungos, respondendo de maneira mais rápida quando se comparado aos fungos.

Já o consórcio fúngico, não apresentou crescimento nas primeiras horas, e,

posteriormente, apresentou um crescimento a partir das 72 horas. Isso provavelmente aconteceu uma vez que os fungos possuem um metabolismo de crescimento lento, que demora cerca de 5 a 7 dias para se desenvolverem, ao contrário das bactérias, que após 24 horas já apresentavam um número significativo de colônias. É possível observar que a partir de aproximadamente 48 horas, a contagem microbiana chega a ser inferior ao controle, sendo que isso provavelmente tenha acontecido em função das células microbianas não terem se adaptado ainda a exposição ao combustível.

O consórcio misto (bacteriano e fúngico) apresentou uma estabilidade no crescimento, não oscilando significativamente no decorrer do experimento. Tal comportamento observado, pode ter sido causado por um equilíbrio dinâmico na taxa de morte e divisão celular, considerando os metabolismos acelerado e lento, das bactérias e fungos respectivamente, presente nesse consórcio.

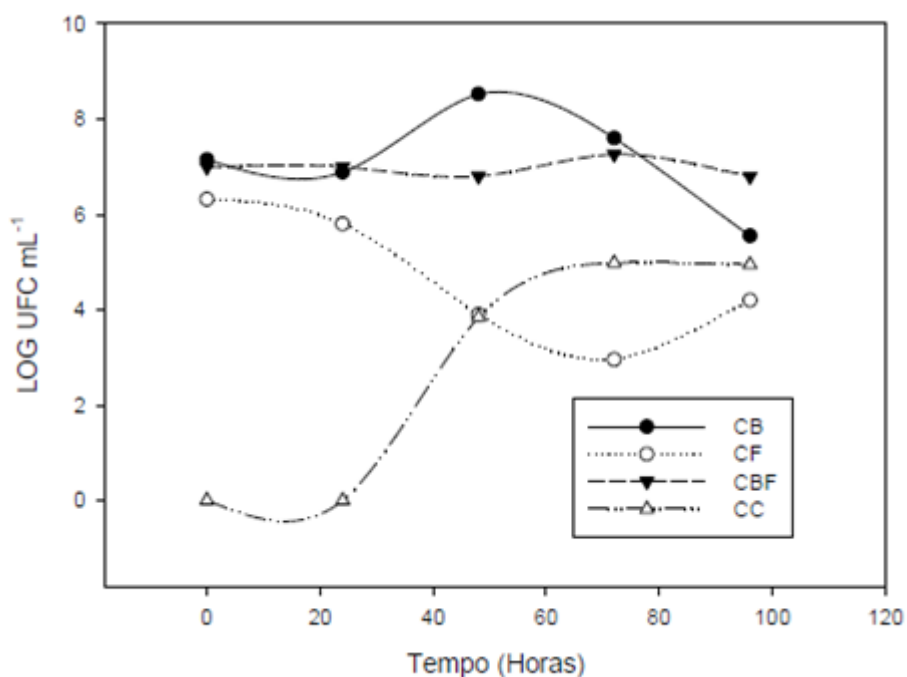


Figura 20. Gráfico gerado da curva de crescimento dos consórcios microbianos. CB – Consórcio bacteriano; CF – Consórcio fúngico; CBF – Consórcio bacteriano + fúngico; CC – Consórcio Controle.

Não obstante, como o experimento foi realizado entre os meses de inverno, abril a junho, é possível que o mesmo possa ter sido influenciado, também, pela oscilação da temperatura de cultivo, uma vez que a variável não foi controlada durante ensaio.

A variação de temperatura, devido a condições não controladas, impacta diretamente no desenvolvimento dos microrganismos, já que a temperatura é um dos principais fatores para os

microrganismos, visando a sua atividade enzimática, na qual suas enzimas podem sofrer danos irreversíveis quando fora da temperatura ideal, bem como sua parte física, se por exemplo, a membrana plasmática do microrganismo se tornar rígida, devido à baixa temperatura, ela irá impossibilitar o transporte de nutrientes, incapacitando o crescimento microbiano (DUNLAP et al., 2010).

Como a adição de diesel foi realizada somente no início do tratamento, supõe-se que a fase de declínio do consórcio bacteriano, coincidiu com a depleção de nutrientes no meio de cultivo, possivelmente pela falta de fonte de carbono.

Após a determinação da curva de crescimento, os consórcios foram repicados e reativados, a fim de armazenamento até serem utilizados no ensaio de biodegradação de diesel no solo por respirometria. Para isso, os mesmos foram mantidos sob refrigeração a 6° C.

5.2.2. Encapsulamento dos consórcios microbianos

O encapsulamento dos consórcios microbianos tem por objetivo facilitar a distribuição das células com potencial de biodegradação no local onde ocorrerá a biorremediação, e, além disso, serve de proteção física, que acaba por facilitar a adaptação (fatores físicos e químicos) dos microrganismos no solo contaminado. Da mesma forma, e não menos importante, o encapsulamento facilita o transporte e o armazenamento.

Após o processo de encapsulamento, com uma concentração de 10% dos meios de cultura dos microrganismos retirados dos consórcios, obteve-se 67 g de cápsulas ativas (inoculadas) (Figuras 21, 22 e 23).



Figura 21 Cápsulas com consórcio bacteriano.



Figura 22 Cápsulas com consórcio fúngico.



Figura 23 Cápsulas com consórcio misto (bactérias + fungos).

Da mesma forma que os consórcios, foram produzidos três grupos de cápsulas (cápsulas bacterianas, cápsulas fúngicas e cápsulas com uma mistura de bactérias e fungos). As cápsulas produzidas apresentaram um peso médio de 0,0115 g, e um diâmetro médio de aproximadamente 2,44 mm (Figura 24), independente do tipo de consórcio.



Figura 24 Medição das cápsulas após produção das mesmas.

O emprego das cápsulas no estudo, diferentemente da maior parte dos estudos encontrados na literatura, visou facilitar o processo de bioaumentação e não o processo de bioestimulação (prover nutrientes para a microbiota), como normalmente é reportada.

5.2.3 Montagem dos microcosmos

A respirometria é um parâmetro com ampla utilização para a quantificação da atividade microbiana, já que através desta técnica, é possível verificar a geração de dióxido de carbono (CO₂) pelos microrganismos. Nesse caso, os microrganismos assimilam os hidrocarbonetos de petróleo como fontes de carbono, liberando o CO₂ (CERQUEIRA, 2011).

Para a análise da respirometria, foi utilizado um solo agrícola sem histórico de contaminação, no qual foi encaminhado para um laboratório para a análise físico-química do solo.

Tabela 7 Características físico-químicas do solo sem histórico de contaminação

Elementos	Cmolc/dm³	Interpretação
Cálcio (Ca)	9,05	Alto
Magnésio (Mg)	3,23	Alto
Potássio (K)	0,93	Alto
Sódio (Na)		
Alumínio (Al)	0	Baixo
H + Alumínio (H + Al)	3,69	Médio
Soma de bases (S)	13,21	Alto
CTC ph 7,0 (T)	16,9	Alto
pH CaCl₂	5,4	

Tabela 8: Matéria orgânica no solo agrícola

Elementos	g/dm³	Interpretação
Carbono (C)	19,25	Alto
Matéria Orgânica (MO)	33,21	Alto

Tabela 9: Granulometria do solo agrícola

Granulometria	%
Areia	18,75
Silte	17,5
Argila	63,75
Classificação do solo	Tipo 3

Através dessa análise, podemos constatar que se trata de um solo com um teor elevado de matéria orgânica (Tabelas 7, 8 e 9). A classificação do solo como tipo 3, é devido ao seu predomínio de minerais na fração argila em sua granulometria, sendo considerado solo argiloso.

No sétimo dia de experimento, já era possível visualizar a formação do biofilme microbiano na superfície do solo (sobre a mancha de diesel) nos microcosmos que receberam a bioaugmentação, indicando que ocorreu uma rápida adaptação ao ambiente contaminado, e a utilização do diesel como fonte de carbono (Figuras 25 e 26).

A partir do nono dia do experimento, as concentrações de NaOH e HCL foram elevadas a uma concentração de 0,5 M, pois a concentração utilizada anteriormente, não foi o suficiente para capturar todo o CO₂ que era liberado pelos microrganismos.



Figura 25 Solo no início do experimento, sem a formação do biofilme.

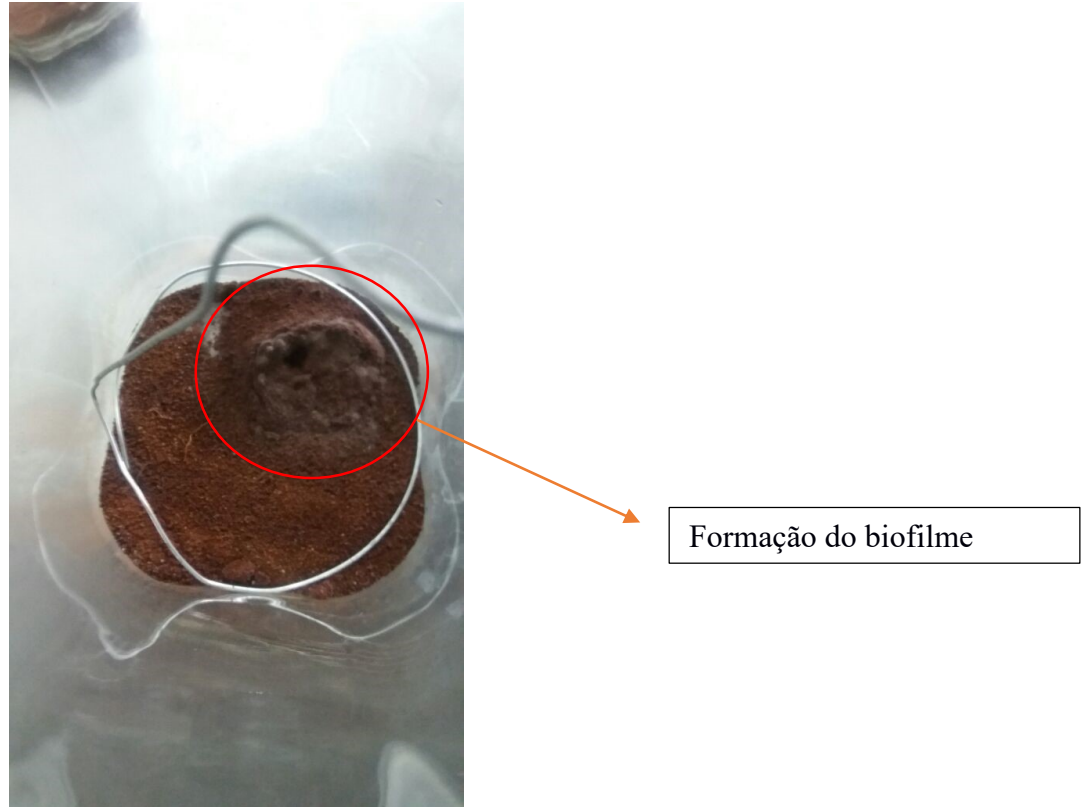


Figura 26. Formação do biofilme após sete dias de experimento.

5.3.2 Cinética de degradação

Os resultados obtidos da análise da respirometria, demonstraram que todos os tratamentos em que houve a bioaumentação, obtiveram um melhor desempenho quando comparado à atenuação natural (somente autoctónes) e ao controle, independente se foi na forma de inoculação direta, ou utilizando cápsulas (Tabela 10).

O tratamento de bioaumentação, que apresentou o menor desempenho, comparado à atenuação natural, foi o tratamento cápsulas bactérias + fungos, que foi superior em 43,7% na mineralização dos compostos orgânicos, em relação à atenuação natural.

Tabela 10. Desempenho dos tratamentos na análise respirométrica e o desempenho comparado a atenuação natural

Tratamento	Produção acumulada (29 dias) (mg.kg⁻¹)	Erro padrão	Desempenho dos tratamentos em relação a atenuação natural
Controle	63,4 e	4,7	-
Atenuação natural	96,1 f	4,8	-
Bactérias	143,7 bd	8,7	49,53%
Fungos	194,1 a	5,3	101,98%
Bactérias + fungos	201,1 a	7,1	109,26%
Cápsulas bactérias	159,3 bd	9,1	65,76%
Cápsulas fungos	145,6 bcd	8,4	51,51%
Cápsulas bactérias + fungos	138,1 bc	8,4	43,7%

Legenda:

ANOVA. (Comparação entre os tratamentos).

Letras iguais indica que não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

O tratamento que obteve o melhor desempenho foi o consórcio formado por bactérias e fungos, sendo seguido pelo consórcio fúngico, sendo estes, estatisticamente iguais (tabela acima), de acordo com o erro padrão, obtidos pela ANOVA, com normalidade $p < 0,05$.

Em seu estudo, Steliga et al (2012), também demonstrou que a mistura de um consórcio microbiano, envolvendo bactérias e fungos, apresentam um melhor desempenho, onde em seu experimento, a degradação do BTEX passou de 36% para 76%, quando se misturava os consórcios.

O desempenho das cápsulas foi abaixo da inoculação direta dos microrganismos, excetuando-se o tratamento bactérias. Isto pode estar relacionado ao fato que foi inserida somente 0,44 g de cápsulas em cada microcosmo, e, cada cápsula continha apenas 10% de

cultura concentrada, enquanto não houve diluição nos microcosmos que receberam a inoculação direta.

Para que a proporção de microrganismos nas cápsulas fosse a mesma na inoculação direta, deveria-se colocar cerca de 4,44 g de cápsulas nos microcosmos, igualando a concentração celular à inoculação direta.

O estudo realizado por Karamalidis (2009), demonstrou que nos estágios iniciais as células microbianas livres tinham, um desempenho superior à das células microbianas encapsuladas, porém, depois de 60 dias, o desempenho entre os dois tratamentos era o mesmo.

Da mesma forma, os tratamentos propostos (bioaugmentação), só obtiveram resultados estatisticamente diferentes, do controle e da atenuação natural (regeneração natural do ambiente), após 7 dias de ensaio, quando houve o primeiro ajuste da umidade do solo. É possível que a baixa umidade do solo inicial, possa ter influenciado na baixa liberação de CO_2 , o que também pode ter impactado no desempenho do tratamento da inoculação direta do consórcio bacteriano como podemos visualizar no gráfico abaixo (Figura 27).

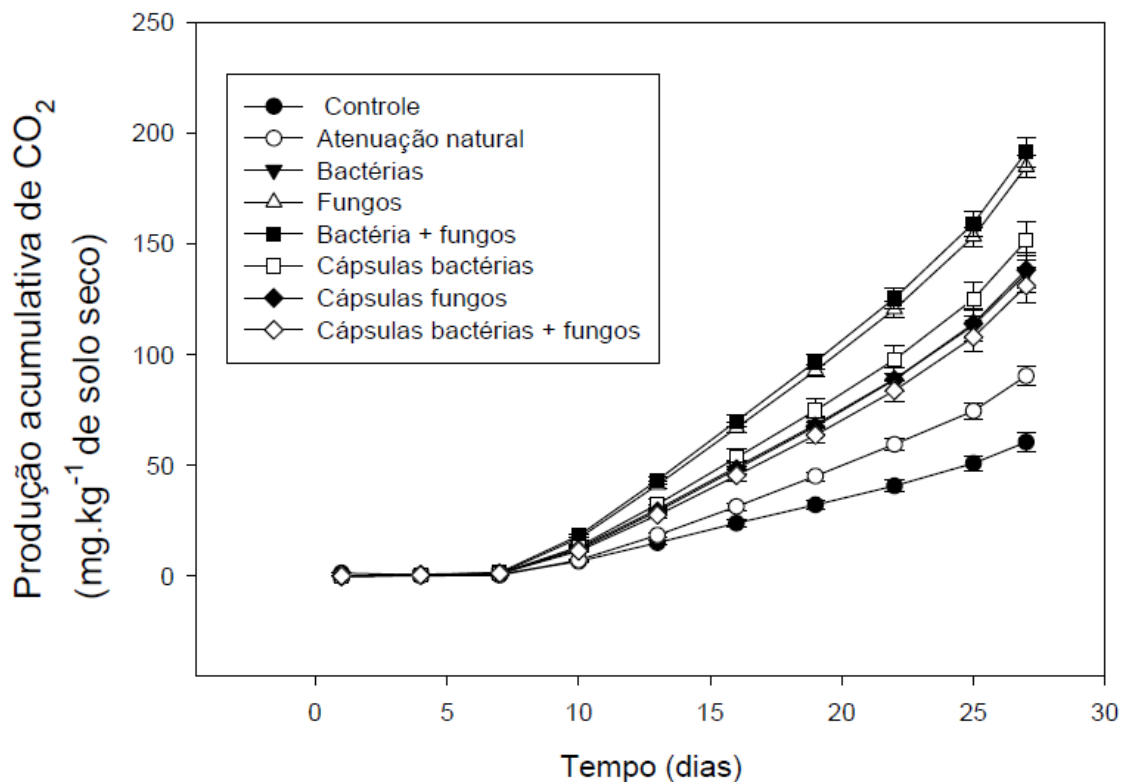


Figura 27. Gráfico com os resultados da respirometria. Os valores de C – CO_2 foram acumulados. As barras nos pontos mostram o erro padrão dos tratamentos.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

A identificação dos isolados, bem como a extração do DNA e a ampliação da região DNAr 16S, ainda está sendo processada neste momento, e não foi apresentada até a data de entrega deste trabalho.

6. CONCLUSÃO

É possível utilizar o solo como um meio de cultura para o cultivo de microrganismos, já que durante o processo de cultivo dos microrganismos presentes no solo contaminado, os mesmos cresceram no meio que foi proposto. Porém, há a necessidade de mais estudos, para validar a utilização do mesmo.

A utilização de microrganismos alóctones para auxiliar a degradação de diesel, mostrou-se eficiente para o processo de biodegradação de compostos derivados de petróleo no solo, em microcosmos, principalmente as que não apresentam histórico de contaminação. Já que há um tempo de adaptação dos microrganismos aos contaminantes em que foram expostos.

A bioaugmentação foi eficiente em todas as propostas realizadas no estudo, seja pela inoculação direta, ou pelas cápsulas.

A confecção de cápsulas a fim de armazenar e facilitar o transporte de microrganismo, também se mostrou viável, no qual em todos os tratamentos propostos obtiveram desempenho superior à atenuação natural.

São necessários mais estudos para validar o processo de encapsulamento como técnica de biorremediação aplicada a solos contaminados por diesel a campo em escala real.

REFERÊNCIAS

AGOSTINIS, André O. et al. **Is There Detectable Long-term Depletion of Genetic Variation in Freshwater Fish Species Affected by an Oil Spill?**. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 228, n. 7, p. 256, 2017.

ALEF, K. Estimation of soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1995. 576p.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C.. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados**. *Eclética química*, São Paulo, SP, v. 35, n. 3, p 17-43, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16161: Armazenamento de líquidos inflamáveis e combustíveis – Tanque metálico subterrâneo – Especificações de fabricação e modulação**. Rio de Janeiro – RJ, 2015.

BALTRÉNAS, Pranas et al. **Atmospheric BTEX concentrations in the vicinity of the crude oil refinery of the Baltic region**. *Environmental monitoring and assessment*, v. 182, n. 1, p. 115-127, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.914**. de 12 de dezembro de 2011. Procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Publicado no DOU.

BRASIL, **Resolução CONAMA nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e dá outras providências. Publicado no DOU nº 249, de 30/12/2009, págs. 81-84.

BRITO, F. V.; OLIVEIRA, A. S. NEVES, H. C.; et al. **Estudo da Contaminação de Águas Subterrâneas por BTEX oriundas de postos de distribuição no Brasil**. Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás – IBP, 2004.

CERQUEIRA, Vanessa S. et al. **Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures**. *Bioresource technology*, v. 102, n. 23, p. 11003-11010, 2011.

CHEN, Colin S.; LAI, Yun-Wei; TIEN, Chien-Jung. **Partitioning of aromatic and oxygenated constituents into water from regular and ethanol-blended gasolines.** Environmental Pollution, v. 156, n. 3, p. 988-996, 2008.

COMPANHIA DE AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo.** Disponível em: <<http://cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 24 nov. 2017.

CORIOLOANO, Ana Catarina Fernandes; DE MORAIS FILHO, Manuel Capristanio. **BIORREMEDIAÇÃO, UMA ALTERNATIVA NA UTILIZAÇÃO EM ÁREAS DEGRADADAS PELA INDÚSTRIA PETROLÍFERA.** HOLOS, v. 7, p. 133-150, 2016.

COSTA, Ana Hilda Romero; NUNES, Cristina Cardoso; CORSEUIL, Henry Xavier. **Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina e etanol com o uso de nitrato.** Eng Sanit Ambient, v. 14, n. 2, p. 265-274, 2009.

DE LIMA-MORALES, Daiana et al. Degradation of benzene by *Pseudomonas veronii* 1YdBTEX2 and 1YB2 is catalyzed by enzymes encoded in distinct catabolism gene clusters. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 1, p. 167-173, 2016.

DEON, M. C.; ROSSI, A.; DAL'MAGRO, C.; et al. **Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaumentação e atenuação natural.** Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 33, n. 1, p. 73-82, jan./jun.2012

DÖRR, Fabiane. **Consórcios degradadores de BTEX: isolamento, caracterização e avaliação do potencial de degradação.** 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DURMUSOGLU, Ertan; TASPINAR, Fatih; KARADEMIR, Aykan. **Health risk assessment of BTEX emissions in the landfill environment.** Journal of hazardous materials, v. 176, n. 1, p. 870-877, 2010.

ESPLUGUES, Ana et al. **Indoor and outdoor air concentrations of BTEX and determinants in a cohort of one-year old children in Valencia, Spain.** Science of the total environment, v. 409, n. 1, p. 63-69, 2010.

GENTNER, Drew R. et al. **Elucidating secondary organic aerosol from diesel and gasoline vehicles through detailed characterization of organic carbon emissions**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 109, n. 45, p. 18318-18323, 2012.

HEIDERSCHEIDT, D.; PEREIRA, J.; BURGHARDT, J.; et al. **Conceitos aplicados à poluição do solo decorrente do derrame de petróleo e seus derivados**. Faculdade Metropolitana de Blumenau, Blumenau, SC. Revista Maiêutica, Indaial, v. 4, n. 1, p. 7-14, 2016.

JUWARKAR, Asha A.; SINGH, Sanjeev K.; MUDHOO, Ackmez. A comprehensive overview of elements in bioremediation. **Reviews in Environmental Science and bio/technology**, v. 9, n. 3, p. 215-288, 2010.

KARAMALIDIS, A. K. et al. **Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet**. Bioresource Technology, v. 101, n. 16, p. 6545-6552, Aug 2010a. ISSN 0960-8524.

MADIGAN, M., MARTINKO, J., DUNLAP, P., & CLARK, D. **Microbiologia De Brock**. 12^a edição, editora Artmed. *Porto Alegre*. p. 157-159. 2010

MAZZEO, Dânia Elisa Christofolletti et al. **BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery**. Science of the Total Environment, v. 408, n. 20, p. 4334-4340, 2010.

MEGHARAJ, Mallavarapu et al. **Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective**. Environment international, v. 37, n. 8, p. 1362-1375, 2011.

MNIF, Ines; ELLOUZE-CHAABOUNI, Semia; GHRIBI, Dhouha. **Economic production of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant using local agro-industrial wastes and its application in enhancing solubility of diesel**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 88, n. 5, p. 779-787, 2013.

OLLER, I.; MALATO, S.; SÁNCHEZ-PÉREZ, JAb. **Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination—a review**. Science of the total environment, v. 409, n. 20, p. 4141-4166, 2011.

POMPERMAYE, Fabiano Mezadre. **Etanol e veículos elétricos: via de mão única ou dupla?**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea). Radar: tecnologia, produção e comércio exterior, Brasília, n. 7, 20 p., abr. 2010.

PRESCOTT, L. M. et al. **Microbiology**. Dubuque, IA: Ed. WCB, 1997. 883p.

SILVA, Ísis Serrano et al. **Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia**. Bioresource Technology, v. 100, n. 20, p. 4669-4675, 2009.

STELIGA, Teresa; JAKUBOWICZ, Piotr; KAPUSTA, Piotr. **Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons**. Bioresource technology, v. 125, p. 1-10, 2012.

TYAGI, Meenu; DA FONSECA, M. Manuela R.; DE CARVALHO, Carla CCR. **Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes**. Biodegradation, v. 22, n. 2, p. 231-241, 2011.

XIN, Bao-Ping et al. **Bioaugmented remediation of high concentration BTEX-contaminated groundwater by permeable reactive barrier with immobilized bead**. Journal of hazardous materials, v. 244, p. 765-772, 2013.

Apêndice

Apêndice 01: Meio mineral Tanner

Macronutrientes

Reagente	Concentração (g.L ⁻¹)
CaCl₂.2H₂O	0,04
KH₂PO₄	0,1
NaCl	0,8
NH₄Cl	1,0
MgSO₄.7H₂O	0,2
KCl	0,1

Solução de micronutrientes (0,5 mL.L⁻¹)

Reagente	Concentração (g.L ⁻¹)
CoCl₂.6H₂O	0,2
MnSO₄.7H₂O	1,0
CuCl₂.2H₂O	0,02
Na₂MoO₄. 2H₂O	0,02
ZnSO₄.7H₂O	0,2

Apêndice 02: Ágar nutriente

Reagente	g.L⁻¹
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0
Ágar bacteriológico	15,0

Apêndice 03: Batata Dextrose Ágar

Reagente	g.L⁻¹
Extrato de batata	4,0
Dextrose	20,0
Ágar bacteriológico	15,0

Apêndice 04: Meio solo

Reagente	Concentração
Mistura de água com solo filtrado	200 mL.L ⁻¹
Peptona	5 g.L ⁻¹
Ágar bacteriológico	15 g.L ⁻¹