UFAM

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

FÁBIO RAPHAEL MOREIRA CÁUPER

DEGRADAÇÃO DE GORDURAS MARGARINA E MANTEIGA, E ÓLEOS DE SOJA, MILHO, CANOLA E GIRASSOL, POR ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS

MANAUS – AMAZONAS

2024

FÁBIO RAPHAEL MOREIRA CÁUPER

DEGRADAÇÃO DE GORDURAS MARGARINA E MANTEIGA, E ÓLEOS DE SOJA, MILHO, CANOLA E GIRASSOL, POR ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS

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

Orientador: Prof Dr Luiz Antonio de Oliveira

MANAUS
2024

Ofereço

Ao Senhor Deus, por estar sempre
ao meu lado em todos os momentos.
Melhor Amigo fiel não há.

Dedico

À minha família, Luciana Cáuper (Esposa)e Lucas Cáuper (Filho), pois são fontes de inspiração e incentivo para galgar as conquistas da vida.

IM MEMORIAN

“Venho com este trabalho, demonstrar minha gratidão a quem muito devo:”

Meus avós paternos,

Dr. Hugo de Lima Cáuper

Profª. Maria do Carmo de Barros Cáuper

Dr. Hugo Cáuper, quando em vida foi amigo, avô e pai de todas as horas. Com seus ideais, ao longo de nossas conversas, influenciou-me para lutar por meus objetivos. Uma pessoa maravilhosa que conquistou uma carreira brilhante e, mesmo fechando seus olhos, nos proporcionou viver a vida em estado de permanente celebração.

“Dona Carmita” também em vida, amiga, avó e mãe de todos os momentos. Com seu exemplo, mesmo após cinco gestações, perseverou e chegou a cursar faculdade.

Juntos construíram a minha base. A eles o meu muito obrigado.

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

(Paulo Beleki)

Agradecimentos

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

A minha esposa Luciana Lima de Brito Cáuper, na qual enxergo meu porto seguro. Juntos compartilhamos as incertezas e anseios tão comuns no início desta jornada, e em seguida passamos muitas horas na bancada do laboratório ao longo dos experimentos. Luciana, és minha professora e companheira de todos os momentos, você sempre compreendeu e apoiou este sonho que agora está se realizando.

Ao meu querido filho Lucas de Brito Cáuper, fonte de inspiração e coragem necessárias para vencer as batalhas ao longo do caminho. Sempre soube compreender todos os momentos em que estive ausente devido às horas de dedicação, estudo e a pesquisa no laboratório, e quando aos 7 anos de idade me perguntou - "Paipai, posso fazer doutorado com você?" - me fez refletir ainda mais a importância deste título.

À minha sogra Maria Lúcia Lima de Brito por todo apoio e cuidados para comigo e com meus amores Luciana e Lucas. "Mãinha", és a base e alicerce do nosso lar, e quando saímos para as lutas diárias, podemos ter os sentimentos de segurança e tranquilidade.

Aos meus pais Gerson e Ivana, pelo incentivo e credibilidade dedicados a mim.

Aos meus irmãos Flávio e Hugo, sobrinhos Heitor, Isac e Flávia por toda a amizade e amor dispensados.

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

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, por meio do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos de Solos/COTI, que possibilitou a infraestrutura para a realização desse trabalho.

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

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

A toda a família Cáuper pela contribuição, aconselhamentos, amizades e contribuição durante toda a minha trajetória educacional.

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

Muitíssimo obrigado !!!

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura geral de um triacilglicerol (R1, R2, R3 = grupo alquil saturado ou insaturado; podendo ser igual ou diferente). 26
Figura 2: Ilustração do Método de riscagem para avaliação do crescimento de bactérias 41
Figura 3: Valores para crescimento de bactérias 41
Figura 4 – Equação da reta formada para obtenção da concentração de DCPIP (degradação dos óleos e gorduras) 43
Figura 5- Distribuição das colônias nas placas de Petri para verificação do halo de solubilização como indicativo de solubilização de fosfatos de cálcio e de alumínio. ϕ C= diâmetro da colônia, ϕ H= diâmetro do halo. 44
Figura 6- Esquema ilustrativo da atividade de emulsificação. 47
Figura 7 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA com manitol como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação. 53
Figura 8 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo óleo de soja como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação. 54
Figura 9 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo óleo de girassol como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação. 56
Figura 10 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo óleo de milho como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação. 58
Figura 11 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo óleo de canola como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação. 59
Figura 12 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo margarina como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação. 61
Figura 13 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo mateiga de garrafa como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação. 62
Figura 14 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA ao longo de quinze dias de incubação. 65
Figura 15 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA e óleo de soja ao longo de quinze dias de incubação. 67
Figura 16 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA e óleo de girassol ao longo de quinze dias de incubação 68
Figura 17 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA e óleo de milho ao longo de quinze dias de incubação. 70
Figura 18 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA e óleo de canola ao longo de quinze dias de incubação. 71
Figura 19 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA e margarina ao longo de quinze dias de incubação. 73
Figura 20 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA e manteiga de garrafa ao longo de quinze dias de incubação. 74
Figura 21 - Demonstração do teste de biodegradação, utilizando o indicador DCPIP, onde A é o controle sem descoloração do indicador; B óleo de soja com 72 horas de incubação; C óleo de girassol com 72 horas; D óleo milho com 72 horas; E óleo de canola com 72 horas; F margarina com 72 horas e F manteiga de garrafa com 72 horas. 80
Figura 22 - Média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YMA com manitol como fonte de carbono. 82
Figura 23 – Média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido de óleo de soja como fonte de carbono. 84
Figura 24 – Média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido de óleo de girassol como fonte de carbono. 86

Figura 25 – Média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido de óleo de milho como fonte de carbono. 88
Figura 26 – Médias e desvios padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido de óleo de canola como fonte de carbono. 90
Figura 27 – Média e desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido de margarina como fonte de carbono. 92
Figura 28 – Média e desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido de manteiga de garrafa como fonte de carbono. 94
Figura 29 – Médias e desvios padrão para o percentual de degradação de cada microrganismo de cada fonte de carbono após a primeira hora de incubação. 96
Figura 30 – Biodegradação de manitol por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP. 104
Figura 31 – Biodegradação de óleo de soja por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP. 105
Figura 32 – Biodegradação de óleo de girassol por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP. 105
Figura 33 – Biodegradação de óleo de milho por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP. 105
Figura 34 – Biodegradação de óleo de canola por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP. 106
Figura 35 – Biodegradação de margarina por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP. 106
Figura 36 – Biodegradação de manteiga de garrafa por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP. 106
Figura 37 – A coloração rosa fluorescente adquirida devido à formação de complexos oriundos da reação dos ácidos graxos, resultantes da hidrólise promovida pela ação da lipase, com a rodamina B presente no meio de cultura. 109
Figura 38- Espessura da camada emulsificante (CE), nos períodos de 24 e 48 horas, em cada óleo 120

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Teor de ácidos graxos em óleos vegetais. 27
Tabela 2 - Rizobactérias reativadas da coleção de microrganismos do INPA e seus respectivos locais de coleta. 37
Tabela 3 - Descrição utilizada para caracterizar morfologicamente bactérias conforme Vincent (1970). 39
Tabela 4: Faixa de pontuação para avaliação do crescimento bacteriano utilizando o meio YMA com manitol e YMA s/ manitol e com derivados do petróleo 42
Tabela 5: Convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante..... 46
Tabela 6 - Constituição dos sais dos meios SYM e INPA 46
Tabela 7 - Morfologia de estirpes de rizobactérias..... 50
Tabela 8 - Identificação dos isolados com base na comparação de sequência de 16 rDNA obtida com outras depositadas no banco de dados GenBank (análise BLASTn)..... 51
Tabela 9 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o manitol como fonte de carbono 53
Tabela 10 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo de soja como fonte de carbono 55
Tabela 11 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo de girassol como fonte de carbono 56
Tabela 12 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo de milho como fonte de carbono 58
Tabela 13 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo de canola como fonte de carbono 59
Tabela 14 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando a margarina como fonte de carbono 61
Tabela 15 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando manteiga de garrafa como fonte de carbono 63
Tabela 16 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido..... 66
Tabela 17 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo óleo de soja como fonte de carbono. 67
Tabela 18 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo óleo de girassol como fonte de carbono. 68
Tabela 19 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo óleo de milho como fonte de carbono. 70
Tabela 20 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo óleo de canola como fonte de carbono. 71
Tabela 21 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo margarina como fonte de carbono. 73
Tabela 22 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo manteiga de garrafa como fonte de carbono. 74
Tabela 23 – Tempos de incubação necessários para as rizobactérias apresentarem crescimentos superiores a 3,00 segundo a metodologia de Oliveira e Magalhães (1999). 77
Tabela 24 – Percentual de descoloração em meio YMA em relação ao controle sem inóculo. 81
Tabela 25 – Percentual de descoloração em meio YM acrescido com óleo de soja, em relação ao controle sem inóculo. 83

Tabela 26 – Percentual de descoloração em meio YM acrescido com óleo de girassol, em relação ao controle sem inóculo. 85
Tabela 27 – Percentual de descoloração em meio YM acrescido com óleo de milho, em relação ao controle sem inóculo. 87
Tabela 28 – Percentual de descoloração em meio YM acrescido com óleo de canola, em relação ao controle sem inóculo. 89
Tabela 29 – Percentual de descoloração em meio YM acrescido com margarina, em relação ao controle sem inóculo. 91
Tabela 30 – Percentual de descoloração em meio YM acrescido com margarina, em relação ao controle sem inóculo. 93
Tabela 31 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e o manitol como fonte de carbono em meio líquido 97
Tabela 32 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e óleo de soja como fonte de carbono em meio líquido. 98
Tabela 33 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e óleo de girassol como fonte de carbono em meio líquido. 99
Tabela 34 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e óleo de girassol como fonte de carbono em meio líquido. 100
Tabela 35 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e óleo de canola como fonte de carbono em meio líquido. 101
Tabela 36 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e margarina como fonte de carbono em meio líquido. 102
Tabela 37 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e manteiga de garrafa como fonte de carbono em meio líquido. 103
Tabela 38 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em óleo de oliva. 108
Tabela 39 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em óleo de soja. 109
Tabela 40 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em óleo de girassol. 110
Tabela 41 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em óleo de soja. 111
Tabela 42 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em óleo de soja. 111
Tabela 43 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em óleo de soja. 112
Tabela 44 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em óleo de soja. 113

RESUMO

Rizobactérias apresentam capacidade simbiótica, fixadora de nitrogênio, eficiência na produção de biopolímeros, biossurfactantes e mostram capacidades na biorremediação de ambientes contaminados. Este trabalho avaliou a morfologia das colônias de rizobactérias isoladas de nódulos de leguminosas que mostraram a habilidade de degradar óleos vegetais e gorduras, bem como sua identificação molecular. Para os testes de morfologia das colônias, bem como a coloração de GRAM, foram utilizados 30 isolados de rizobactérias depositados na Coleção do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Os resultados mostraram que 10 colônias apresentaram forma circular e 20 apresentaram forma irregular; 18 exibiram borda regular e 12 exibiram borda irregular; quanto à elevação das colônias, 23 foram planas e sete elevadas; dez isolados apresentaram transparência e 20 não; 27 colônias são de cor branca e três amarelas; quanto à aparência, 10 colônias são heterogêneas e 20 homogêneas. No que concerne ao muco, nove exibiram pouca quantidade, 13 moderada e oito abundante; quanto à aparência do muco, 20 são homogêneas e 10 heterogêneas. O tipo morfológico das bactérias observadas foi: bastonete, sendo possível verificar arranjos de: diplobacilos e estreptobacilos. A partir do sequenciamento da região do gene 16s rRNA, foram identificados 11 indivíduos do gênero Paenibacillus, 9 indivíduos do gênero Bradyhizobium, 5 indivíduos do gênero Bacillus, 4 indivíduos do gênero Rhizobium e um didivíduo do gênero Enterobacter. De acordo com a coloração de Gram, 10 isolados são Gram-positivos e 20 rizobactérias são Gram-negativas. A morfologia das 30 rizobactérias apresentaram diferenças entre si. Essas diferenças podem ser usadas para facilitar estudos mais detalhados com essas rizobactérias.

ABSTRACT

Rhizobacteria have symbiotic, nitrogen-fixing capacity, efficiency in the production of biopolymers, biosurfactants and have capabilities in bioremediation of contaminated environments. This work evaluated the morphology of rhizobacteria colonies isolated from legume nodules, that showed the ability to degrade vegetable oils and fats, as well as their molecular identification. For colony morphology tests, as well as GRAM staining, 30 rhizobacteria isolates deposited in the National Amazon Research Institute Collection were used. The results showed that 10 colonies had a circular shape and 20 had an irregular shape; 18 exhibited a regular border and 12 exhibited an irregular border; regarding the elevation of the colony, 23 were flat and seven were elevated; ten isolates showed transparency and 20 did not; 27 colonies are white and three are yellow; As for appearance, 10 colonies are heterogeneous and 20 homogeneous. Regarding mucus, nine showed little quantity, 13 moderate and eight abundant; As for the appearance of the mucus, 20 are homogeneous and 10 are heterogeneous. The morphological type of the bacteria observed were rod, making it possible to verify arrangements of: diplobacilli and streptobacilli. From the sequencing of the 16s rRNA gene region, 11 individuals of the genus Paenibacillus, 9 individuals of the genus Bradyhizobium, 5 individuals of the genus Bacillus, 4 individuals of the genus Rhizobium and one individual of the genus Enterobacter were identified. According to Gram staining, 10 isolates are Gram-positive and 20 rhizobacteria are Gram-negative. The morphology of the 30 rhizobacteria showed differences between them. These differences can be used to facilitate more detailed studies with these rhizobacteria.

Sumário

1 INTRODUÇÃO 23
1.1. JUSTIFICATIVA 25
1.2. REFERENCIAL TEÓRICO 26
1.2.1. Óleos e gorduras 26
1.2.1.1. Óleo de Soja 27
1.2.1.2. Óleo de Canola 28
1.2.1.3. Óleo de Girassol 29
1.2.1.4. Óleo de Milho 29
1.2.1.5. Manteiga e Margarina 30
1.2.2. Óleo vegetal e impactos causados pela deposição de seus compostos no meio ambiente. 31
1.2.3. Biorremediação de ambientes impactados por óleo vegetal 31
1.2.4. Biossurfactantes 32
1.2.5. Biodegradabilidade utilizando o indicador redox 2,6-DCPIP 33
1.2.6. Rizobactérias 34
2. OBJETIVOS 36
2.1. OBJETIVO GERAL 36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 36
3. METODOLOGIA 37
3.1. REATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS 37
3.2. COLORAÇÃO DE GRAM 39
3.3. MORFOLOGIA DAS RIZOBACTÉRIAS 39
3.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS 40
3.5. TESTE DE DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE ÓLEOS VEGETAIS (ÓLEO DE SOJA, ÓLEO DE CANOLA, ÓLEO DE GIRASSOL, ÓLEO DE MILHO), MARGARINA E MANTEIGA DE GARRAFA POR ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS. 40
3.6. BIODEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO, UTILIZANDO A TÉCNICA DO INDICADOR REDOX 2,6 DICLOROFENOL-INDOFENOL - DCPIP 42
3.6.1. Percentual de degradação estimado por meio da absorbância em espectrofotômetro de luz. 42
3.6.2. Montagem e avaliação do teste visual de descoloração 43
3.7. ATIVAÇÃO E DETECÇÃO DOS ISOLADOS PRODUTORES DE LIPASE NA PRESENÇA DE ÓLEOS VEGETAIS (ÓLEO DE SOJA, ÓLEO DE CANOLA, ÓLEO DE GIRASSOL, ÓLEO DE MILHO), MARGARINA E MANTEIGA DE GARRAFA. 43
3.8. CURVA DE CRESCIMENTO 45
3.9. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELOS ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS 45

3.9.1. Avaliação da atividade de emulsificação 46
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA 47
4. RESULTADOS 48
4.1 MORFOLOGIAS DAS RIZÓBACTÉRIAS 48
4.2. COLORAÇÃO DE GRAM E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS REATIVADOS 51
4.3. TESTE DE DEGRADAÇÃO DE ÓLEO VEGETAL, MARGARINA E MATEIGA DE GARRAFA EM MEIO SÓLIDO – MEIO YMA 52
4.3.1. Meio YMA sem manitol – Óleo de Soja como fonte de carbono 54
4.3.2. Meio YMA sem manitol Óleo de Girassol como fonte de carbono 55
4.3.3. Meio YMA sem manitol – Óleo de Milho como fonte de carbono 57
4.3.4. Meio YMA sem manitol – Óleo de Canola como fonte de carbono 59
4.3.5. Meio YMA sem manitol – Margarina como fonte de carbono 60
4.5.6. Meio YMA sem manitol – Manteiga de garrafa como fonte de carbono. 62
4.4. TESTE DE DEGRADAÇÃO DE ÓLEO VEGETAL, MARGARINA E MATEIGA DE GARRAFA EM MEIO SÓLIDO – MEIO INPA 64
4.4.1. Meio INPA – Óleo de soja como fonte de carbono 66
4.4.2. Meio INPA – Óleo de girassol como fonte de carbono 68
4.4.3. Meio INPA – Óleo de milho como fonte de carbono 69
4.4.4. Meio INPA – Óleo de canola como fonte de carbono 71
4.4.5. Meio INPA – Margarina como fonte de carbono 72
4.4.6. Meio INPA – Manteiga de garrafa como fonte de carbono 74
4.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO, UTILIZANDO O INDICADOR REDOX – DCPIP 80
4.5.1. Avaliação do potencial de degradação de óleo de soja, utilizando o indicador redox – DCPIP 82
4.5.2. Avaliação do potencial de degradação de óleo de girassol, utilizando o indicador redox – DCPIP 84
4.5.3. Avaliação do potencial de degradação de óleo de milho, utilizando o indicador redox – DCPIP 86
4.5.4. Avaliação do potencial de degradação de óleo de canola, utilizando o indicador redox – DCPIP 88
4.5.5. Avaliação do potencial de degradação de margarina, utilizando o indicador redox – DCPIP 90
4.5.6. Avaliação do potencial de degradação de manteiga de garrafa, utilizando o indicador redox – DCPIP 92
4.5.7. Avaliação do potencial de degradação utilizando o indicador redox – DCPIP após a primeira hora de incubação 94
4.5.8. Avaliação visual de descoloração do indicador redox – DCPIP 96

4.5.9. Avaliação visual da descoloração do indicador redox – DCPIP em óleo de soja. 97

4.5.10. Avaliação visual relacionada a descoloração do indicador redox – DCPIP em óleo de girassol. 98

4.5.11. Avaliação visual relacionada a descoloração do indicador redox – DCPIP em óleo de milho. 99

4.5.12. Avaliação visual relacionada a descoloração do indicador redox – DCPIP em óleo de canola. 100

4.5.13. Avaliação visual relacionada a descoloração do indicador redox – DCPIP em margarina. 101

4.5.14. Avaliação visual relacionada a descoloração do indicador redox – DCPIP em manteiga de garrafa. 103

4.6. PRODUÇÃO DE LIPASES INDUZIDA POR ÓLEO VEGETAL, MARGARINA E MATEIGA DE GARRAFA EM MEIO SÓLIDO 108

4.6.1. Produção de lipases induzida por óleo de soja em meio sólido..... 109

4.6.2. Produção de lipases induzida por óleo de girassol em meio sólido..... 110

4.6.3. Produção de lipases induzida por óleo de milho em meio sólido..... 110

4.6.4. Produção de lipases induzida por óleo de canola em meio sólido..... 111

4.6.5. Produção de lipases induzida por margarina em meio sólido 112

4.6.6. Produção de lipases induzida por manteiga de garrafa em meio sólido..... 112

4.7 ANÁLISE DO pH. 113

4.7. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELOS MIDCRORGANISMOS SELECIONADOS 116

4.7.1. Produção de biossurfactantes utilizando óleo de soja como fonte de carbono. 117

4.7.2. Produção de biossurfactantes utilizando óleo de girassol como fonte de carbono 117

4.7.3. Produção de biossurfactantes utilizando óleo de milho como fonte de carbono 118

4.7.4. Produção de biossurfactantes utilizando óleo de canola como fonte de carbono 119

4.7.5. Índice de Emulsificação e atividade emulsificante 121

4. CONCLUSÕES 123

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 125

1 INTRODUÇÃO

Os lipídeos são uma classe de substâncias químicas cuja principal característica é serem hidrofóbicas, ou seja, não serem solúveis em água. Os exemplos mais conhecidos de lipídeos são os ácidos graxos e seus derivados, esteróis, ceras e carotenoides. Nos óleos e gorduras, os ácidos graxos podem ser encontrados livres ou, preferencialmente, combinados. Na forma combinada, seus derivados são normalmente encontrados como monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis (Ramalho; Suarez, 2013).

Entre os lipídeos, o grupo conhecido como óleos e gorduras e seus derivados teve uma importância ímpar na história da humanidade. O óleo derivado de vegetais tem como matéria prima as gorduras obtidas por meio de plantas e sementes como o caju, a linhaça, o girassol, o buriti, a mamona; grãos como o milho, a soja ou também por outros alimentos de origem vegetal tais como abacate, azeitona, abóbora, canola, entre outros (Wildner; Hillig, 2012). Após o processo de refino e produção, o óleo obtido pode ser utilizado não só na preparação de alimentos, como também em componente de lubrificantes, itens de pintura ou como componente de combustível (Costa Neto et al., 2000).

O resíduo do óleo de cozinha proveniente de residências, comércio e indústrias é um produto potencialmente poluidor quando descartado de maneira inadequada em rios e riachos ou simplesmente em pias e vasos sanitários, indo parar nos sistemas de esgoto causando danos, como entupimento dos canos e o encarecimento dos processos das estações de tratamento, além de contribuir para a poluição do meio aquático, ou, ainda, no lixo doméstico, uma vez que o óleo impede a troca de oxigênio e mata seres vivos como plantas, peixes e microrganismos. Além disso, impermeabiliza o solo, contribuindo para as enchentes. Um litro de óleo de cozinha utilizado contamina um milhão de litros de água, o suficiente para uma pessoa usar durante 14 anos (Zucatto et al., 2013). Fora da rede de esgoto, a presença de óleo nos rios cria uma barreira que dificulta a entrada de luz e oxigênio na água, pois são formados predominantemente por ésteres de triacilgliceróis (produtos resultantes da esterificação entre o glicerol e ácidos graxos), comprometendo a base da cadeia alimentar aquática, os fitoplânctons e resultam consequentemente na mortandade de peixes e de todas as formas de vida no local afetado. Também contribui para a formação de bancos de lamas nos rios, contaminando, assim, águas que, por vezes, são usadas inadequadamente para o consumo humano (Alberici; Pontes, 2004).

A presença desses compostos no solo e sedimentos despertou grande preocupação em autoridades ambientais e pesquisadores, uma vez que comprometem a sobrevivência de muitas

espécies, e podem causar uma gama de ameaças para a saúde humana e ambiental, alterando o equilíbrio ecológico (Dos Santos et al., 2017).

Na tentativa de fazer reparo adequado em áreas contaminadas, utiliza-se uma técnica muito explorada nas últimas décadas conhecida como biorremediação. Essa tecnologia compreende o processo de transformação e/ou degradação de compostos tóxicos para torná-lo ecologicamente inofensivo. Esse processo é feito por meio do emprego de micro-organismos inerentes ao próprio meio ambiente e adaptáveis ao produto contaminante. A eficiência da biorremediação é limitada se as condições físico-químicas não forem favoráveis à sobrevivência e à atividade de micro-organismos degradadores. É, portanto, necessário um rigoroso controle e definição de parâmetros para aplicação dessa técnica (Jacques et al., 2007).

1.1. JUSTIFICATIVA

A biodegradação de um composto químico no meio ambiente depende, sobretudo, da presença de uma população de microrganismos capazes de metabolizar a molécula original e seus produtos de degradação. Não existem, na biosfera atual, rotas enzimáticas catabólicas capazes de degradar todos os compostos novos que a cultura humana sintetizou durante os últimos 100 anos. Alguns xenobióticos podem ser biodegradados por microrganismos que possuam enzimas capazes de catabolizar moléculas específicas, ou mesmo pela ação conjunta de consórcios microbianos, em que cada microrganismo atua individualmente sobre diferentes etapas do processo de biodegradação (Gaylarde et al., 2005). A maior parte dos compostos oleosos (de 60% a 90%) é biodegradável, entretanto, o restante (de 10% a 40%), em estado bruto ou refinado, é recalcitrante. O destino destes compostos, após um derrame, irá depender da interação, entre vários fatores, podendo se destacar a degradação microbiana (Andrade *et al*., 2010; Chorom *et al*., 2010). Isso demonstra a importância de recorrer a técnicas ou estudos que ofereçam subsídios para a montagem de operações de remediação dos danos causados, com menor custo e menor dano ambiental, uma vez que estamos lidando com organismos fundamentais para o perfeito funcionamento dos ecossistemas aquáticos e terrestres, pois alguns microrganismos possuem características peculiares para a biorremediação.

Espécies de bactérias e fungos, isoladas do solo, da água do mar, de sedimentos marinhos e de áreas contaminadas por óleos, vêm sendo estudadas para aplicações ambientais como a biorremediação, dispersão de efluentes oleosos, otimização da recuperação de óleos e transferência de óleo cru, pois são produtoras de compostos conhecidos como biossurfactantes. Estes compostos exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e consistem em produtos metabólicos de microrganismos, podendo substituir os surfactantes sintéticos no futuro, especialmente em indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica, bem como produtos de limpeza industriais, produtos químicos agroindustriais e em processos de biorremediação, já que são biodegradáveis, possuem baixa toxicidade e apresentam estabilidade em valores extremos de pH, temperatura e salinidade (Pinto *et al*., 2009; Chandra *et al*., 2009).

A utilização dessas bactérias pertencentes ao grupo de rizóbios pode tornar-se uma alternativa viável e segura para a biorremediação de solos contaminados, uma vez que não são patogênicos às plantas e/ou animais, inclusive ao homem e ainda, são fundamentais no manejo agrícola sustentável na Amazônia, fixam nitrogênio e solubilizam fosfatos pouco solúveis do solo promovendo o crescimento das plantas.

1.2. REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1. Óleos e gorduras

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), de origem animal ou vegetal, formados predominantemente por ésteres de triacilgliceróis, produtos resultantes da esterificação entre o glicerol e ácidos graxos. Esses compostos têm em comum a presença de cadeias orgânicas com um elevado número de carbonos, o que lhes confere o caráter hidrofóbico, podendo apresentar apenas átomos de carbono e hidrogênio ou ainda, grupos funcionais com heteroátomos, como alcoóis, fenóis, ácidos carboxílicos, ésteres, entre outros. Nos óleos e gorduras, os ácidos graxos podem ser encontrados livres ou, preferencialmente, combinados. Na forma combinada, seus derivados são normalmente encontrados como monoacilgliceróis, diacilgliceróis (importante como mulsionantes) e triacilgliceróis (Figura 1), estes últimos são compostos insolúveis em água e a temperatura ambiente, possuem uma consistência de líquido para sólido. (Ramalho; Suarez, 2013).

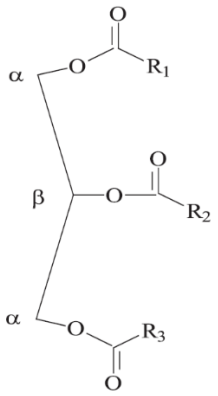


Figura 1 - Estrutura geral de um triacilglicerol (R1, R2, R3 = grupo alquil saturado ou insaturado; podendo ser igual ou diferente).

Os óleos vegetais possuem de uma a quatro insaturações (ligações duplas) na cadeia carbônica, sendo líquidos à temperatura ambiente; as gorduras são sólidas à temperatura ambiente, devido à sua constituição em ácidos graxos saturados. Assim, gorduras animais como a banha, o sebo comestível e a manteiga, são constituídas por misturas de triacilgliceróis, que contém um número de saturações maior do que o de insaturações, conferindo-lhes maior ponto de fusão (Gonçalves et al., 2002; Moretto et al. 2002).

Os óleos, possuem um número maior de insaturações e expressam menor ponto de fusão (Faria et al., 2002). Seguindo esta linha de pensamento, a classificação de lipídeos em óleos e gorduras não depende da natureza da fonte oleaginosa (animal ou vegetal), mas apenas do ponto

de fusão da mistura na temperatura ambiente de 25 ºC. Quando estão sob forma sólida são chamados de gorduras e quando estão sob forma líquida são chamados de óleos (Faria, et al., 2002; Hidalgo; Zamora, 2003; Suarez et al., 2007; Ramalho; Suarez, 2013). Na Tabela 1, são apresentados o teor de gordura saturada e insaturada e o teor em ácidos graxos em alguns óleos vegetais estudados neste trabalho.

Tabela 1 - Teor de ácidos graxos em óleos vegetais.

Óleos	Ácido graxo saturado	Ácido graxo monoinsaturado	Ácido graxo poli-insaturado	
			Ácido linoleico	Ácido Linolênico
CANOLA	6%	58%	26%	10%
GIRASSOL	11%	2%	69%	—
MILHO	13%	25%	61%	1%
SOJA	15%	24%	54%	7%

Fonte: MORETTO; FETT (1998) modificado.

1.2.1.1. Óleo de Soja

A soja (*Glycine max*) é um dos mais antigos produtos agrícolas que o homem conhece e começou a ser cultivada pelos chineses há cerca de 5.000 anos. Há 3.000 anos espalhou-se pela Ásia e, no início do século XX, passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos. No Brasil, a soja chegou com os primeiros imigrantes japoneses em 1908, mas foi introduzida oficialmente no Rio Grande do Sul em 1914, embora a sua expansão no Brasil tenha acontecido somente nos anos 70 devido ao interesse crescente da indústria de óleo e à demanda do mercado internacional (Jorge, 2009).

Na atualidade, a soja domina o mercado mundial tanto de proteína vegetal como de óleo comestível, sendo considerado o mais utilizado no mundo. O óleo de soja surgiu como um subproduto do processamento do farelo de soja e tornou-se um dos líderes mundiais no mercado de óleos. Segundo a FAO, os principais países produtores de soja são: EUA (66%), Brasil (27%), Argentina (18%), China (9%) e Índia (4%). É o principal óleo comestível consumido no Brasil, com um consumo de 6,05 milhões de toneladas em 2013/2017 (Abiove, 2018).

Os ácidos graxos insaturados representam 85% do total de lipídios no óleo de soja, e aproximadamente 60% destes são constituídos pelos ácidos graxos essenciais, como linoleico (35 – 60%) e linolênico (2,0 – 13,0%). Dentre os compostos minoritários do óleo de soja, estão os tocoferóis, substâncias que despertam grande interesse devido a seu caráter vitamínico e a sua atividade antioxidante. Apesar de sua ampla utilização, o óleo de soja algumas desvantagens

quando comparado a outros óleos vegetais. As vantagens incluem: o alto nível de insaturação presente; o óleo se mantém líquido sobre uma oscilação de temperatura relativamente ampla; pode ser hidrogenado parcialmente; os fosfatos, restos de metais e sabões que permanecem após a extração podem ser removidos facilmente para obter um produto de alta qualidade; e a presença natural de antioxidantes (tocoferóis) que não foram removidos durante o processamento também contribuem para sua estabilidade. As desvantagens incluem: os fosfatos estão presentes em quantidades relativamente altas (superior a 2%); contém níveis elevados de ácido linolênico, o qual é responsável pela reversão de seu sabor e odor. O óleo de soja é ímpar em suas propriedades, sendo indicado para um vasto número de aplicações, tais como preparação de assados, margarinas, óleo para salada, maionese, etc. No Brasil, o óleo de soja responde por aproximadamente 95% do consumo de óleos vegetais, sendo utilizado nas cozinhas preferencialmente como base de frituras (Alberici e Pontes, 2004; Wildner e Hillig, 2012; Rudorff et al., 2018).

1.2.1.2. Óleo de Canola

O termo canola, provavelmente derivado de *CANadian Oil Low Acid*, foi registrado inicialmente pela *Western Canadian Oilseed Crushers Association* para referir-se ao óleo, farelo e sementes provenientes de variedades contendo 5% ou menos de ácido erúcico no óleo e 3 mg ou menos de glucosinolatos por grama normalmente medidos no farelo. Posteriormente, em 1980, os direitos de registro da marca foram transferidos para o Conselho de Canola do Canadá e, em setembro de 1986, foi definido que os requisitos para o uso da marca exigiam que o óleo tivesse menos de 2% de ácido erúcico e que os componentes sólidos da semente deveriam conter menos de 30 micromoles de glucosinolatos por grama. Em 1988, o óleo de canola foi aceito pela Food and Drug Administration (FDA) (Abiove, 2018).

As sementes de canola (*Brassica napus* e *Brassica campestres*) são pequenas, redondas e podem ser de coloração amarela, marrom ou preta, com conteúdo de óleo variando entre 40 a 60%. Atualmente o óleo de canola é muito consumido no Canadá, onde ocupa 80% do mercado de óleos para salada e supre 25% do mercado mundial (Jorge, 2009).

O óleo de canola apresenta, dentre os óleos vegetais, o menor conteúdo de ácidos graxos saturados, 2,5 a 6,5% de ácido palmítico e 0,8 a 3,0% de ácido esteárico. Tem alto teor de monoinsaturados, 53,0 a 70% de ácido oléico e também alto teor de poliinsaturados, 15 a 30% de ácido linoléico e 5 a 13% de ácido linolênico (Moretto, et al., 2002).

O óleo pode ser obtido por prensagem ou por extração com solvente ou uma combinação dos dois métodos. O óleo bruto é de coloração âmbar escuro e contém alto nível de fosfatídios (3,5%), pigmentos e compostos sulfurados. O óleo refinado é amarelo claro e livre de cera, fósforo e de enxofre e apresenta odor e sabor suave (Ramalho; Suarez, 2013).

1.2.1.3. Óleo de Girassol

O óleo de girassol (*Helianthus annuus*) é constituído por uma pequena quantidade de ácidos graxos saturados (aproximadamente 10%) e é rico em ácido linoléico, cerca de 70%, ácido graxo considerado essencial à saúde humana, o que confere ao óleo de girassol designação de alimento funcional. Outra característica importante é que este óleo é uma excelente fonte de vitamina E. Existem estudos mostrando que o consumo de óleo de girassol favorece a redução do colesterol plasmático e da fração LDL (lipoproteína de baixa densidade) contribuindo, assim, para prevenção da arteriosclerose e problemas cardiovasculares (Jorge, 2009).

O óleo de girassol possui maior valor econômico por diferenciar-se dos demais óleos vegetais na concentração de ácidos graxos insaturados, sendo um dos óleos mais bem cotados no mercado internacional (Jorge et al., 2005).

De acordo com a National Sunflower Association, o óleo de girassol é mais susceptível à oxidação em processos de fritura devido à grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presente em sua composição. É utilizado em saladas, no preparo de alimentos e na produção de margarinas e shortenings (Fernandes et al., 2008).

1.2.1.4. Óleo de Milho

O óleo de milho (*Zea mays* L.) comercial é aquele obtido do gérmen do grão de milho. O gérmen representa 9% do grão e contém cerca de 83% do total de lipídios. Este cereal não é cultivado por seu conteúdo em óleo, o qual representa somente 3,1 – 5,7% do peso do grão, mas pelo seu elevado teor de amido (61 – 78%) e proteína (6 – 12%). Assim, a produção de óleo de milho está diretamente relacionada à demanda do mercado por amido de milho (Paes, 2006).

Os Estados Unidos são o maior produtor mundial de óleo de milho, responsáveis por mais da metade do total produzido mundialmente. Anualmente, o Brasil processa cerca de 78 mil toneladas de óleo de milho que corresponde cerca de 4% da produção mundial (Abiove, 2018).

Os principais ácidos graxos que compõem o óleo de milho são: ácido linoleico (34 – 62%), ácido oleico (24 – 42%), ácido palmítico (9 – 14%), ácido esteárico (0,5 – 4%) e ácido linolênico (< 2%). Os constituintes menores mais significativos compreendem os fosfolipídios, os glicolipídios e a fração insaponificável, constituída principalmente de tocoferóis, fitosteróis e carotenoides (Ramalho; Suarez, 2013). O teor de matéria insaponificável no óleo de milho, 1,3 – 2,3%, é mais alto que em outros óleos vegetais comuns. Cerca de 60% da matéria insaponificável é composta de esteróis, a maioria dos quais se encontra esterificada aos ácidos graxos. Entre os esteróis predominantes podem ser citados o β-sitosterol, o campesterol e o estigmasterol (Faria et al., 2002).

Apesar de altamente poli-insaturado, o óleo de milho é bastante estável, pois contém altos níveis de antioxidantes naturais e baixa porcentagem de ácido linolênico. A alta estabilidade do óleo de milho pode, ainda, estar parcialmente relacionada à distribuição não casual dos ácidos graxos nas moléculas dos triglicerídeos. A maior parte dos ácidos graxos insaturados encontra-se esterificada na posição 2 dos triglicerídeos que é menos reativa. Os ácidos graxos poli-insaturados estão, portanto, mais protegidos das reações oxidativas. A estabilidade oxidativa do óleo de milho durante o uso e a ausência de formação de precipitado sob refrigeração tem contribuído para o aumento da sua demanda no mercado. Além disso, os benefícios nutricionais, primariamente relacionados aos seus ácidos graxos insaturados e conteúdo de vitamina E, tem despertado o interesse por este tipo de óleo. Os ácidos graxos poli-insaturados ajudam a regular os níveis de colesterol sanguíneo, a síntese de eicosanoides e a diminuir a pressão arterial (Jorge, 2009).

O óleo de milho é utilizado, principalmente, como óleo de cozinha e na elaboração de margarinas, maioneses e molhos para salada. Tem sido utilizado, também, na fritura industrial de batatas. Os benefícios nutricionais dos óleos poli-insaturados têm aumentado o uso do óleo de milho em alimentos industrializados (Jorge et al., 2005).

1.2.1.5. Manteiga e Margarina

A manteiga é um produto gorduroso obtido exclusivamente da nata ou do leite de vaca e tem como ingrediente obrigatório o creme pasteurizado obtido a partir do leite de vaca e os opcionais são o cloreto de sódio e fermentos lácticos selecionados (Braga, 2015). A composição química da manteiga consiste em uma percentagem de aproximadamente 80-82 % de gordura; 16-18 % de água e 1,2 % de sal, sendo esta última a mesma percentagem para proteínas, cálcio

e fósforo. Na manteiga, são encontradas vitaminas lipossolúveis fundamentais para o consumo humano tais como: vitaminas A, D e E (Ouana, 2016).

A margarina é uma emulsão de gorduras e óleos com leite, que têm aparência de manteiga, podendo conter aromas, corantes e substâncias nutricionais, tais como vitaminas e conservantes (Moretto, et al., 2002). Os maiores componentes da margarina são óleos líquidos e parcialmente hidrogenados, que sofrem processo de refinação, podendo ser classificadas como vegetal, animal ou mista (Pinho e Suarez, 2013).

1.2.2. Óleo vegetal e impactos causados pela deposição de seus compostos no meio ambiente.

O óleo derivado de vegetais tem como matéria-prima as gorduras obtidas por meio de plantas e sementes como o caju, a linhaça, o girassol, o buriti, a mamona; grãos como o milho, a soja ou também por outros alimentos de origem vegetal tais como abacate, azeitona, abóbora, a canola, entre outros (Wildner e Hillig, 2012). Após o processo de refino e produção, o óleo obtido pode ser utilizado não só na preparação de alimentos, como também em componente de lubrificantes, itens de pintura ou como componente de combustível (Costa Neto et al., 2000).

O resíduo do óleo de cozinha proveniente de residências, comércio e indústrias é um produto potencialmente poluidor quando descartado de maneira inadequada em rios e riachos ou simplesmente em pias e vasos sanitários, indo parar nos sistemas de esgoto causando danos, como entupimento dos canos e o encarecimento dos processos das estações de tratamento, além de contribuir para a poluição do meio aquático, ou, ainda, no lixo doméstico, uma vez que o óleo impede a troca de oxigênio e mata seres vivos como plantas, peixes e microrganismos. Além disso, impermeabiliza o solo, contribuindo para as enchentes (Wildner; Hillig, 2012).

A presença desses compostos no solo e sedimentos despertou grande preocupação em autoridades ambientais e pesquisadores, uma vez que comprometem a sobrevivência de muitas espécies, e podem causar uma gama de ameaças para a saúde humana e ambiental, alterando o equilíbrio ecológico (Dos Santos et al., 2017).

1.2.3. Biorremediação de ambientes impactados por óleo vegetal

Na tentativa de fazer reparo adequado em áreas contaminadas, utiliza-se uma técnica muito explorada nas últimas décadas conhecida como biorremediação. Essa tecnologia compreende o processo de transformação e/ou degradação de compostos tóxicos para torná-los ecologicamente inofensivos. Esse processo é feito por meio do emprego de microrganismos

inerentes ao próprio meio ambiente e adaptáveis ao produto contaminante (Bundy et al., 2002; Oliveira e Araújo, 2011). A eficiência da biorremediação é limitada se as condições fisíco-química não forem favoráveis à sobrevivência e à atividade de microrganismos degradadores, e devido a isso, os processos biológicos da biorremediação apresentam variações quanto ao tipo de tratamento, podendo este ser in situ quando realizados no local e ex situ, quando realizados fora do local contaminado (Gaylarde et al., 2005). Ambos envolvem procedimentos que podem ser Biorremediação do Solo aplicados no tratamento de superfície ou de subsuperfícies e dependem de vários aspectos como a distribuição heterogênea dos rejeitos, a concentração do contaminante, a toxicidade e a persistência do contaminante no local, bem como as condições favoráveis ao crescimento dos microrganismos. Portanto, é necessário um rigoroso controle e definição de parâmetros para aplicação dessa técnica (Moreira e Siqueira, 2006; Jacques et al., 2007).

Oliveira e Araújo (2011) realizaram experimentos utilizando *Bacillus subtilis* para remediar um solo contaminado por diferentes concentrações de óleo vegetal, descrevendo que a técnica da bioaumentação com *Bacillus subtilis* não conseguiu incrementar a redução dos teores de extrato etéreo no solo contaminado com diferentes doses de óleo vegetal. Este fato demonstra que os diferentes compostos derivados de hidrocarbonetos nem sempre são degradados em igual proporção pelo mesmo microrganismo, defendendo assim, a ideia de que cada espécie é responsável por degradar um tipo de componente do óleo fazendo-se necessário o uso de consórcios para melhorar a eficiência da biorremediação (Weber e Santos, 2013).

1.2.4. Biossurfactantes

A biorremediação de substratos com características hidrofóbicas é limitada, devido à dificuldade da sua utilização pelos microrganismos (Paraszkiewicz et al., 2002). Alguns microrganismos, porém, são capazes de produzir biossurfactantes, os quais apresentam propriedades emulsificantes, dispersantes e solubilizantes, podendo ocasionar a utilização de substratos hidrofóbicos e, por consequência, a detoxificação (Banat et al., 2000). Portanto, por definição, biossurfactantes são compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, podendo realizar misturas de hidrocarbonetos em água (Nitschke e Pastore, 2002).

Podem ser produzidos por uma diversidade de microrganismos, sendo a maioria por bactérias e leveduras, e em menor quantidade, por fungos filamentosos (Al-Wahaibi et al.,

2014). As principais classes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas que são derivados do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras (Silva et al., 2009). Isto pode ser demonstrado através do aumento significativo da degradação dos hidrocarbonetos presentes no meio, onde a dinâmica desse processo é baseada na habilidade dos biossurfactantes reduzirem a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo de compostos insolúveis em superfícies, influenciando as ligações de hidrogênio e interações hidrofílicas-hidrofóbicas. Isto faz com que a área superficial aumente, proporcionando uma maior biodisponibilidade e consequente aumento da biodegradabilidade (Castiglioni et al., 2009). Os biossurfactantes são mais eficientes do que os surfactantes sintéticos existentes e apresentam propriedades que estes não possuem, tais como a maior seletividade e atividade específica sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade. Os biossurfactantes produzidos por microrganismos podem ser obtidos utilizando-se procedimentos relativamente simples e substratos baratos, através de processos de fermentação. Açúcares e óleos são fontes de carbono adequadas para a obtenção de tensoativos ecologicamente seguros (Bueno et al., 2010); no entanto, sua entrada no mercado em larga escala ainda está limitada, devido ao seu alto custo de produção quando comparado aos sintéticos (Marqués et al., 2009). Alguns trabalhos já demostraram que rizobactérias produtoras de biossurfactantes também mostraram capacidades de degradarem óleo de cozinha, um contaminante muito comum jogado no meio ambiente pelo ser humano após seu uso na preparação de alimentos (Cáuper et al., 2017).

Selecionar bactérias com potencial para a produção de biossurfactantes, baseando-se na redução da tensão superficial e aumento da atividade emulsificante, contribui com o processo de biorremediação e demonstra habilidades desses microrganismos para degradação de óleo, por meio da produção de agente surfactante, sugerindo uma possibilidade futura de aplicação nos processos de contaminantes hidrofóbicos.

1.2.5. Biodegradabilidade utilizando o indicador redox 2,6-DCPIP

A elaboração de metodologias para biodegradabilidade de determinadas substâncias requer ferramentas que possam viabilizar na geração de dados associados à biodegradação. Ao mesmo tempo, estudos sobre caracterização e perfil de bactérias específicas à biodegradação de poluentes de natureza oleosa podem fornecer subsídios às tomadas de decisão estratégicas na escolha da técnica de biorremediação mais adequada (Bidoia et al., 2010). Desta forma, alguns procedimentos têm sido usados para a identificação de cepas degradantes de

hidrocarbonetos. Estes compreendem o isolamento de bactérias adaptadas a hidrocarbonetos do líquido e meios sólidos suplementados com uma variedade de substratos de hidrocarbonetos diferentes, medições de turbidez, consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono.

Para a biodegradação de compostos hidrocarbonados é essencial uma reação de oxirredução, em que o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétron) e um aceptor de elétron é reduzido. Existem diferentes compostos que podem agir como aceptores de elétrons, entre eles o oxigênio (O_2), o nitrato (NO_3^-), os óxidos de Fe (III), o sulfato (SO_4^{-2}). A oxirredução do sulfato é um dos sistemas redutores mais frequentes em microrganismos no meio ambiente, todavia, em ambientes em totais condições de anaerobiose, ocorre baixos níveis de reações redox (Hutchins et al., 1991;).

Os métodos colorimétricos, que possuem indicadores redox, são utilizados para avaliar precisamente o processo de biodegradação por microrganismos. Uma vez que as formas oxidadas são coloridas e as formas reduzidas são incolores, as mudanças de cor podem ser monitoradas avaliando as mudanças no valor de absorbância do indicador redox por meio de um espectrofotômetro (Hanson et al., 1993; Mariano, 2007).

1.2.6. Rizobactérias

Rizobactérias podem ser simbióticas e de vida livre e são consideradas essenciais ao ecossistema de plantas por meio de vários mecanismos, tais como a biodisponibilidade de elementos de crescimento como o nitrogênio, fósforo e possivelmente ferro, degradação de matéria orgânica, indução de crescimento via síntese de fitormônios, e controle biológico (Oliveira, 1999; Vessey, 2003; Ludwig et al., 2003). Por fazerem parte da população microbiana do solo, seu estudo pode conduzir à descoberta de estirpes de grande valor econômico para serem usadas na biorremediação de ambientes contaminados com compostos de petróleo, visto que são adaptadas ao ambiente local, bem como podem mostrar maior eficiência, habilidade competitiva e tolerância às condições de estresse (Cáuper, 2018). Esses microrganismos despertam interesse em pesquisas relacionadas com a biorremediação de solos por fazerem parte da população microbiana do próprio solo contaminado, e por possuírem enzimas também capazes de degradar componentes do óleo. Estudos já realizados com rizobactérias mostraram que apresentam a habilidade de usarem petróleo como fonte de carbono e, por possuírem classes que não são patogênicas a animais e plantas, apresentam potencial de

uso na descontaminação de ambientes impactados com esse contaminante ou seus derivados, o que poderá ter grande valor econômico e ambiental (Brito et al., 2017).

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

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a degradação e mineralização de hidrocarbonetos em óleos vegetais derivados de vegetais e do leite por isolados de Rizobactérias ou consórcios resultantes da inoculação conjunta destes microrganismos depositadas na coleção de micro-organismos do INPA.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a capacidade de degradação de óleos derivados de vegetais (canola, soja, girassol e milho) e do leite (margarina e manteiga de garrafa) por isolados de Rizobactérias;
- Testar consórcios dos microrganismos estudados, a partir de isolados de Rizobactérias que apresentarem capacidade de utilizar óleos (manteiga, margarina e óleos de cozinha) como fonte de carbono, através de enriquecimentos sob condições aeróbias;
- Avaliar o potencial de produção de biossurfactantes pelos consórcios de Rizobactérias obtidos, tendo a manteiga, margarina e óleos vegetais como única fonte de carbono;

3. METODOLOGIA

3.1. REATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Para início das atividades práticas desse projeto, foram utilizados 30 isolados de rizobactérias (Tabela 2) que estão depositados na Coleção de Microrganismos do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, que em testes anteriores (INPA R020, 178, 233, 236, 302, 304, 311, 321, 332, 529, 546, 547, 552, 555, 564, 565, 566, 568, 571, 577, 618, 631, 634, 657, 666, 672, 674, 675, 677 e 713), apresentaram capacidade de utilizar o petróleo e derivados como fonte de carbono (Brito et al., 2018). Essas Rizobactérias foram isoladas através de nódulos coletados usando a metodologia descrita por Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1985).

Tabela 2 - Rizobactérias reativadas da coleção de microrganismos do INPA e seus respectivos locais de coleta.

Rizobactérias	Local	Planta
INPA R020	Km 14 S2°59'45,8" W60°01'23,2"	*Rizosfera de Leguminosa*
INPA R178, INPA R233	Km 927 (antigo43) da BR 174 S2°56'39" W60°2'19,1"	*Dinizia excelsa*
INPA R236	Km 927 (antigo43) da BR 174 S2°56'39" W60°2'19,1"	*Enterobium contortisiliquum* (Vell) Morong
INPA R302	Rio Preto da Eva S 2°40'13" W 59°43'20,7"	*Rhynchosia phaseoloides* (Tento)
INPA R304	Rio Preto da Eva S 2°36'35,5" W 59°43'25,5"	*Desmodium triflorum* (Amor do Campo)
INPA R311	Rio Preto da Eva S 2°40'13" W 59°43'20,7"	*Desmodium triflorum* (Amor do Campo)
INPA R321	Rio Preto da Eva S 2°44'15,9" W 59°45'50,1"	*Inga edulis* (Ingá)
INPA R332	Rio Preto da Eva S 2°44'10,1" W 59°46'2,3"	*Tephrosia cinera* (Anil bravo)
	Manacapuru	

Tabela 2 - Rizobactérias reativadas da coleção de microrganismos do INPA e seus respectivos locais de coleta.

Rizobactérias	Local	Planta
INPA R529	S 3°17'39" W 60°38'4"	*Rizosfera de Leguminosa*
INPA R546, INPA R547, INPA R552, INPA R555	Ramal do Caldeirão km3 S 3^0 12’ 26,9” W 60^0 12’ 2,5”	*Pueraria phaseoloides* (Feijão Bravo)
INPA R564, INPA R565, INPA R566, INPA R568, INPA R571,	Ramal do Caldeirão km3 S 3^0 13’ 41,9” W 60^0 13’ 27,8”	*Pueraria phaseoloides* (Feijão Bravo)
INPA R577, INPA R618	Estrada para Jandira; Beira do Rio Solimões, Várzea S 03^0 15’ 21,3” W 060^0 15’ 33,1”	*Inga edulis* (Ingá)
INPA R631	Iranduba, Comunidade doJandira S 03^0 15’ 20,7” W 060^0 15’ 15,5”	*Vignia unguiculata* (Feijão Caupi)
INPA R634	Jandira S 03^0 15’ 20,0” W 060^0 15’ 33,1”	*Vignia unguiculata* (Feijão Caupi)
INPA R657	Balbina S 02^0 35’ 2” W 059^0 40’ 11,1”	*Rizosfera de Leguminosa*
INPA R666	INPA, campus V8 S 03^0 05’ 28,6” W 059^0 59’ 36,7”	*Swartzia polyphylla* (Arabá)
INPA R672	Viveiro de Urucu S 04^0 53’ 15.1” W 065^0 13’ 31.5”	*Cedrelinga catenaeformis* (Cedrorana)
INPA R674	Balbina S 02^0 3’5.2” W 059^0 40’ 11.1”	*Rizosfera de Leguminosa*
INPA R675	Balbina S 02^0 3’5.2” W 059^0 40’ 11.1”	*Rizosfera de Leguminosa*
INPA R677	Balbina S 02^0 3’5.2” W 059^0 40’ 11.1”	*Inga edulis* (Ingá)
INPA R713	Manacapuru; Ramal do Laranjal S 3°15'24,7" W 60°31'0,5"	*Tephrosia cinera* (Anil bravo)

3.2. COLORAÇÃO DE GRAM

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

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

3.3. MORFOLOGIA DAS RIZOBACTÉRIAS

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

Tabela 3 - Descrição utilizada para caracterizar morfologicamente bactérias conforme Vincent (1970).

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

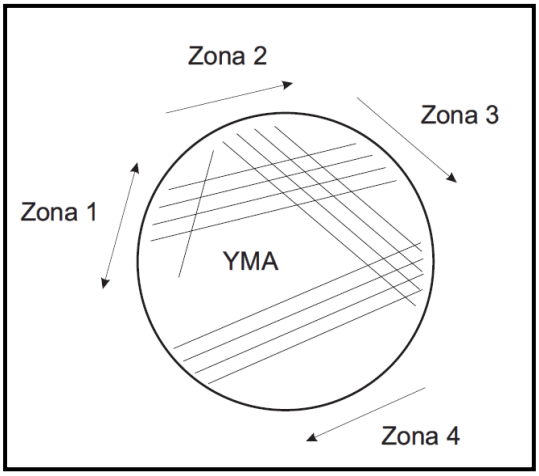
3.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit de extração *Purelink Invitrogen*. Foi amplificada a região 16S rRNA seguindo o procedimento do Borneman e Triplett (1997) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: 530F (5' - TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG - 3`) e 1492R (5' - TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT - 3`). Como controle de teste, foi utilizado o DNA bacteriano de *Escherichia coli* ATCC 25922. O sistema de amplificação foi realizado em termociclador Biocycle, e o perfil térmico do PCR foi: um ciclo inicial a 95°C/2 minutos, 35 ciclos a 95°C/40s, °60C/40s e 72°C/2 e finalmente um ciclo de extensão a 72°C/5 min. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% para a verificação dos fragmentos. O produto do PCR foi purificado utilizando polietilenglicol 20% (NaCl 2,5M, PEG 20%) e quantificado em gel de agarose 0,8%. A amostra foi sequenciada (ABI 3130- Applied Byosistems DNA sequence) e a sequência obtida foi editada e avaliada utilizando o programa PHRED disponível no endereço (http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html). Após a obtenção das sequencias F(forward) e R (reverse) foi realizado alinhamento comparativo no banco de dados de genomas bacterianos depositados no "GeneBank" utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Searching Tool) (SCHÄFFER, ARAVIND, *et al.*, 2001) do "National Center for Biotecnology Information" (NCBI) e também foram comparadas com o banco de dados do "Ribossomal Database Project" (RDP).

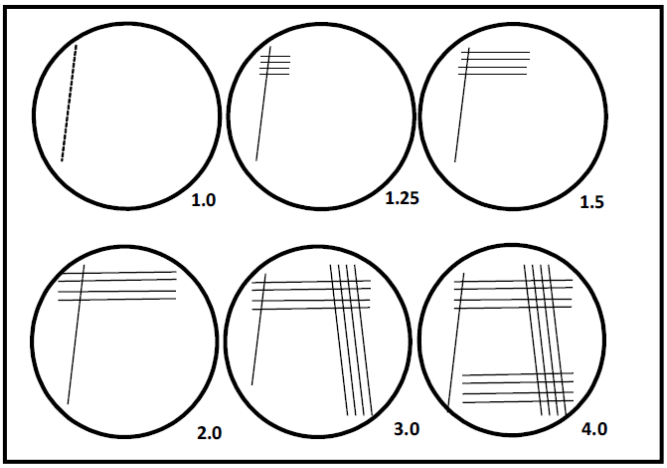
3.5. TESTE DE DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE ÓLEOS VEGETAIS (ÓLEO DE SOJA, ÓLEO DE CANOLA, ÓLEO DE GIRASSOL, ÓLEO DE MILHO), MARGARINA E MANTEIGA DE GARRAFA POR ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS.

Para a realização desse teste foram utilizados óleos vegetais (Óleo de soja - OS, Óleo de Canola - OC, Óleo de Girasol - OG e Óleo de Milho - OM), margarina (M) e manteiga de garrafa (MG). Foi avaliada a capacidade de degradação dessas fontes de carbono e o crescimento bacteriano dos 30 isolados, através do método de riscagem proposto por Oliveira e Magalhães (1999) modificado (BRITO, 2013), realizado em placas de Petri contendo meio de cultura YMA e meio INPA, onde o manitol do meio YMA foi substituído por 0,1 mL de

óleos vegetais (OS, OC, OG e OM), M e MG como fontes de carbono, sendo acrescido também, 0,1 mL de óleo nas placas contendo o meio INPA. Como controle foi utilizado o meio YMA e meio INPA contendo ágar. Esse teste foi realizado em quadruplicata. As avaliações foram feitas a cada três dias, no período de 15 dias, no qual as bactérias foram mantidas em laboratório a uma temperatura de 23 – 28 ºC. De acordo com o desenvolvimento das colônias nas quatro zonas da placa (Figura 2), foram atribuídos valores para o crescimento para cada isolado variando de 1 (sem crescimento visível na placa) a 4 (máximo crescimento em todas as zonas), segundo escala em faixa apresentada na Figura 3. Com base no crescimento em placas de Petri, os isolados foram classificados como pouco, moderado ou elevado (Tabela 4). Para fins de seleção, foram escolhidos os isolados que apresentaram nota mínima de 3,06 ao sexto dia de teste. Os isolados selecionados foram utilizados em testes posteriores, onde foram avaliados o potencial de degradação em meio líquido utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP).



Fonte: Oliveira; Magalhães (1999)
Figura 2: Ilustração do Método de riscagem para avaliação do crescimento de bactérias



Fonte: Oliveira; Magalhães (1999)
Figura 3: Valores para crescimento de bactérias

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

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

Fonte: Oliveira e Magalhães (1999)

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

O ensaio foi realizado em tubos de ensaio previamente estéreis, contendo 7,5mL de meio YM líquido (sem fonte de carbono), 400µL do DCPIC, 25µL de óleo vegetais (OS, OC, OG e OM), M e MG e 100µL de inóculo padronizado a 10^5 UFC.mL^{-1} de isolados de rizóbios/mL, sendo determinado o número de células em Câmara de Neubauer. O experimento foi realizado em triplicata, com três tratamentos controle: dois controles negativos, um contendo meio mineral YM, indicador DCPIP e óleo vegetais (OS, OC, OG e OM), M e MG, outro com meio YM e DCPIP. O controle positivo, conterá meio mineral YM, indicador DCPIP e inóculo de isolados de rizóbios/mL. Os tubos de ensaio foram incubados a 30 ºC e a cada 24 horas foi observado o desaparecimento da coloração azul do indicador DCPIP (forma oxidada) para a incolor (forma reduzida) Mariano et al. (2007).

3.6.1. Percentual de degradação estimado por meio da absorbância em espectrofotômetro de luz.

As leituras para determinação do percentual de degradação foram realizadas por meio de espectrometria de varredura no intervalo de 200 a 450 nm. Foi utilizado o espectrofotômetro Biospectro SP-220, frequência – 50/60 Hz. Uma reta padrão foi construída (Figura 4) com quatro concentrações de DCPIP (0,25, 0,5, 0,7, e 1,0 mg.L^{-1}) em meio mineral YM. A partir dos dados de absorbância e das concentrações de DCPIP em meio de cultura, foi obtido à equação da reta com grau de confiança de 0,9974 (R^2) e expressa pela equação: $y = (1,497 * Abs_{595}) + 0,0714$, em que “y” representa a concentração de DCPIP (degradação de derivados) em cada isolado. Os melhores isolados serão utilizados para os próximos testes e para a formação de consórcios em meio líquido.

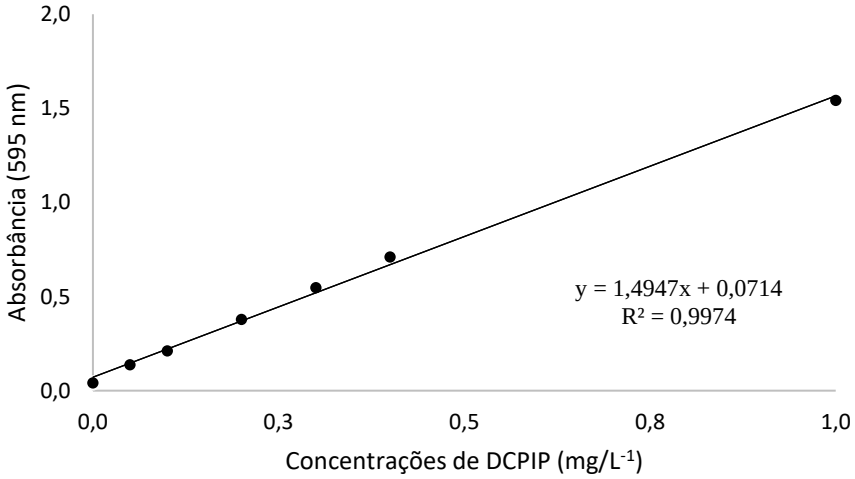


Figura 4 – Equação da reta formada para obtenção da concentração de DCPIP (degradação dos óleos e gorduras)

3.6.2. Montagem e avaliação do teste visual de descoloração

A leitura positiva foi dada com a atribuição de notas após estes tempos, pela descoloração do DCPIP, onde:

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

Com os isolados selecionados foram conservados em meio líquido e utilizados em outros testes.

3.7. ATIVAÇÃO E DETECÇÃO DOS ISOLADOS PRODUTORES DE LIPASE NA PRESENÇA DE ÓLEOS VEGETAIS (ÓLEO DE SOJA, ÓLEO DE CANOLA, ÓLEO DE GIRASSOL, ÓLEO DE MILHO), MARGARINA E MANTEIGA DE GARRAFA.

Em testes anteriores realizados com 30 isolados de rizobactérias, utilizando óleos vegetais (OS, OG, OC e OM), M e MG) como fontes de carbono em meios sólido e líquido foram selecionados os isolados que demonstrarão capacidade de degradação em todos os óleos, manteiga e margarina testados.

A detecção da atividade da lipase é baseada na visualização a partir de um meio de cultura específico contendo óleo de oliva como substrato para a enzima, adicionado com corante Rodamina B, onde a reação positiva é visualizada pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia (Jaeger; Kouker, 1987; Saxena, Sheoran, *et al.*, 2003). O meio de cultura indutor para a lipase foi baseado em Sene et al. (2002) calibrado em pH 8,0 contendo óleo de oliva (2,0 % v/v), Tween 80 (1,0 % v/v), peptona (0,3% m/v), extrato de levedura (0,2% m/v), KH2PO4 (0,2% m/v), MgSO4 (0,1% m/v), CaCl2 (0,1% m/v), agar (1,8% m/v) e corante Rodamina B (0,001% m/v). O pH 8,0 foi mantido constante, pois a enzima apresenta atividade ótima nesse pH (Sharma et al., 2001; Snellman et al., 2002.; Castro et al., 2004 e Koblitz e Pastore, 2004). Visando analisar o nível de indução enzimática nas rizobactérias, o experimento foi montado tendo também como substrato indutor os óleos vegetais (óleo de soja, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de milho), margarina e manteiga de garrafa. Os isolados foram inoculados em cada placa e incubados a 25°C por 5 dias, sendo então analisadas sob luz ultravioleta de 365 nm.

A avaliação da atividade enzimática foi feita através do Índice de Ativação da Lipase (IE) obtido da relação entre o diâmetro (ϕ) do halo translúcido ao redor da colônia e o diâmetro da colônia [IE = ϕ halo (cm)/ ϕ colônia (cm))], seguindo a metodologia descrita em Berraquero (1976), Stamford et al. (1998) e Silva Filho e Vidor (2000). Adicionalmente, cada placa foi exposta à luz ultravioleta (UV-A, 350ηm) marca BIO-RAD modelo UV Lamp 1660500, seguindo a metodologia proposta em Jaeger e Kouker (1987) para a confirmação de colônias produtoras de lipase, que se tornam fluorescentes sob essa irradiação quando em contato com o corante. As bactérias foram repicadas para as placas de Petri de forma tal que se formaram quatro colônias por isolado e por placa de Petri (Figura 5). Foram utilizadas três placas por isolado. Baseado nos IS, as bactérias foram classificadas como isolados com baixa (IE<2), média (2 > IE < 4) e alta (IE>4) capacidade de solubilização.

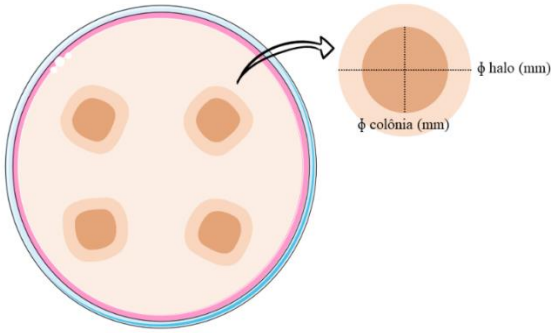


Figura 5- Distribuição das colônias nas placas de Petri para verificação do halo de solubilização como indicativo de solubilização de fosfatos de cálcio e de alumínio. ϕ C= diâmetro da colônia, ϕ H= diâmetro do halo.

3.8. CURVA DE CRESCIMENTO

Ao término do crescimento em placa, as rizobactérias foram transferidas para tubo de ensaio onde foi feita a padronização de acordo com a escala de MacFarland a uma concentração de 10^5. Após a padronização, os microrganismos foram semeados em erlermayer contendo 100 mL de meio YMA e acondicionado em incubadora horizontal (SOLAB Cientifica) operando a 150 rpm, à temperatura de ± 28 °C por um período de até 120 horas. O experimento foi feito em triplicata, e a concentração celular foi medida por turbidimetria. A turbidez do meio foi medida em espectrofotômetro de microplacas iMark™ Microplate Reader (BIO-RAD), utilizando comprimento de onda de 595 nm. Também foi medido o pH inicial e final de cada amostra para verificar se houve interferência neste parâmetro químico.

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão, com medições independentes e foram tratados com o programa IBM SPSS Statistics, versão 27.0.1. Os resultados obtidos foram submetidos a um teste de homogeneidade das variâncias por meio do teste de Levene, seguido da verificação da normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. Utilizou-se uma análise de variância de uma via (ANOVA) com os dados e uma análise post hoc de Tukey com nível de significância de 95%.

3.9. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELOS ISOLADOS DE RIZOBACTÉRIAS

Em testes anteriores realizados com 30 isolados de rizobactérias, utilizando óleos vegetais (OS, OG, OC e OM) como fontes de carbono em meios sólido e líquido foram selecionados os isolados que demonstrarão capacidade de degradação em todos os óleos, manteiga e margarina testados.

Os isolados bacterianos foram cultivados em 100 mL de meio mineral YM e meio mineral INPA líquido (Brito, 2013), acrescido de 0,1 mL de óleos vegetais (OS, OC, OG e OM) em erlenmeyers de 250 mL. Foram utilizados como controles frascos contendo meio de cultura (YM ou INPA) e óleos vegetais. Os frascos ficaram incubados a 30 ºC em agitador rotatório a 65 rpm, por sete dias.

3.9.1. Avaliação da atividade de emulsificação

Para a realização desse experimento foi utilizada a suspensão dos consórcios de rizóbios nos meios minerais SYM (sais do meio YMA – Vincent, 1970; Somasegaran; Hoben, 1985) e INPA (Tabela 5), acrescidos de Óleos Vegetais. Para cada 3,5 mL da suspensão de bactérias, foram adicionados 3,5 mL de óleos vegetais em tubos de ensaio que foram agitados durante 2 minutos em vórtex e deixados por 48 horas em repouso. Após esse tempo, foram efetuadas medidas da altura da camada de emulsão (CE), água em óleo (AO) e da Altura Total (AT) dos líquidos no tubo expressa em cm (Figura 6). O índice de emulsificação foi obtido através da fórmula: IE (%) = (CE/AT)*100, descrita por Cooper e Goldenberg (1987). A atividade de emulsificação óleo em água foi medida pela densidade óptica em espectrofotômetro a 610 nm de absorbância, medida em unidade (Johnson, 1992). A qualificação da atividade emulsificante foi realizada de acordo com a convenção adotada por Matsuura (2004, apud Moura, 2012), Tabela 5.

Tabela 5: Convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante

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

Fonte: Matsuura (2004, apud Moura, 2012).

Tabela 6 - Constituição dos sais dos meios SYM e INPA

Meio SYM		**Meio INPA**	
Componentes	**Quantidade**	**Componentes**	**Quantidade**
K_2HPO_4	0,5 g	$MgSO_4.7H_2O$	0,4 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,2 g	$Ca(CH_3COOH) . H_2O$	0,02 g
NaCl	0,1 g	KH_2PO_4	1,5 g
Ext. Levedura	0,5 g	K_2HPO_4	0,5 g
Água destilada	1000 mL	$(NH_4)_2SO_4 .7H_2O$	2,5 g
		$FeCl_3.6H_2O$	0,05 g
		$FeSO_47H_2O$	0,05 g
		$ZnSO_47H_2O$	0,01 g

Tabela 6 - Constituição dos sais dos meios SYM e INPA

Meio SYM		Meio INPA	
Componentes	**Quantidade**	**Componentes**	**Quantidade**
		$CuSO_4 5H_2O$	0,01 g
		$MnSO_4 7H_2O$	0,01 g
		Na_4SeO_3	0,01 g
		Água destilada	1000 mL

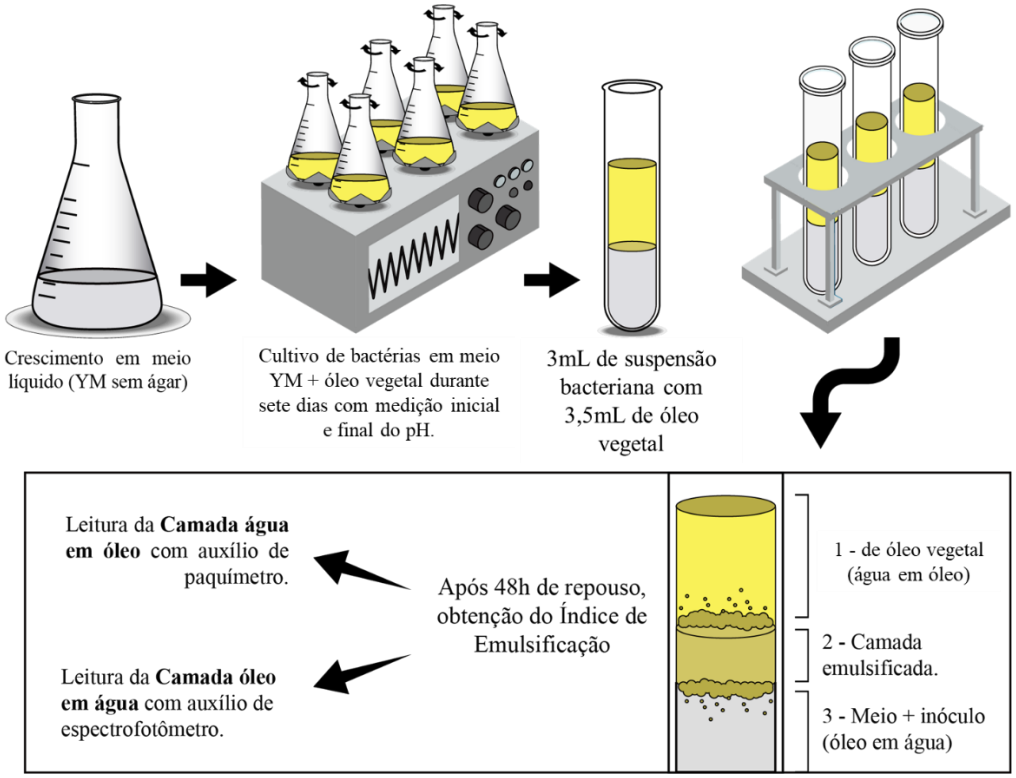


Figura 6- Esquema ilustrativo da atividade de emulsificação.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

4. RESULTADOS

4.1 MORFOLOGIAS DAS RIZÓBACTÉRIAS

Os 30 isolados de rizobactérias reativados foram submetidos à análise morfológica (Tabela 7). Os resultados mostraram que 10 colônias apresentaram forma circular e 20 irregular; 18 exibiram borda regular e 12 irregular; quanto à elevação da colônia, 23 foram planas e sete elevadas; dez isolados apresentaram transparência e 20 não; 27 colônias são de cor branca e três amarelas; quanto à aparência, dez colônias são heterogêneas e 20 homogêneas. No que concerne ao muco, nove exibiram pouca quantidade, 13 moderada e oito abundante; quanto à aparência do muco 20 são homogêneas e 10 heterogêneas.

Esses dados corroboram com os resultados de Medeiros et al. (2009), que de um total de 304 isolados de rizóbios, isolados de nódulos de *Vignia unguiculata* (Feijão Caupi), verificaram que cerca de 80% dos isolados formaram colônias em até dois dias de crescimento. Estes autores também descreveram a morfologia das colônias e observaram maior variação entre os isolados para as características de quantidade e elasticidade do muco produzido, bem como para tamanho, embora a maior parte tenha apresentado colônias de tamanho classificado como puntiforme. Santos et al. (2007), ao isolarem um total de 433 de rizóbios, de nódulos de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, também observaram que 90% dos isolados cresceram em dois dias. Em relação à morfologia, estes concluíram que existe elevada diversidade morfológica da população nativa de rizóbios no semiárido do Rio Grande do Norte. Florentino et al. (2014) analisaram a diversidade morfológica, fenotípica e simbiótica de rizóbios oriundos de nódulos radiculares da leguminosa *Gliricidia sepium*, e relataram que, em seus testes, os isolados de rizóbios apresentaram crescimento rápido, produção de exopolissacarídeos variando de média a alta e a grande maioria produziu reação ácida no meio de cultura. Oliveira et al (2021) utilizaram três diferentes meios de cultura em 40 colônias de rizobactérias, e observaram que tanto a morfologia das células quanto a morfologia das colônias das 40 rizobactérias apresentaram diferenças entre si. Essas variações observadas em diferentes meios de cultivo devem ser vistas com mais cuidado, para que se possa evitar que sejam confundidas com contaminantes.

A avaliação das populações de rizóbios é facilitada com a utilização de plantas iscas e isolamento dos nódulos formados. Além disso, as características morfológicas de rizóbios fornecem informações importantes para a identificação e agrupamento de estirpes. Assim, uma vez que se torna limitante trabalhar com todos os isolados obtidos dos nódulos das leguminosas, avaliar o tempo de crescimento, reação de pH, consistência do muco produzido, características

das colônias formadas, são características importantes no agrupamento destes isolados, (CHAGAS JÚNIOR, 2009; JARAMILLO et al., 2013). Brunetta et al. (2010), visando aumentar o crescimento e a qualidade de mudas de *Pinus taeda* L., obtiveram 196 isolados de rizobactérias que apresentaram grande variação quanto à morfologia da colônia, incluindo consistência, elevação, cor, velocidade e forma de crescimento.

Tabela 7 - Morfologia de estirpes de rizobactérias.

Isolados	Forma da Colônia	Borda da Colônia	Elevação	Transparência	Cor	Aparência da Colônia	Muco	Aparência do Muco
INPA R020	Circular	Regular	Elevada	Sim	Branca	Heterogênea	Moderado	Heterogêneo
INPA R178	Circular	Regular	Elevada	Sim	Branca	Heterogênea	Moderado	Heterogêneo
INPA R233	Irregular	Irregular	Plana	Sim	Branca	Homogênea	Pouco	Homogêneo
INPA R236	Irregular	Irregular	Plana	Não	Branca	Heterogênea	Pouco	Heterogêneo
INPA R302	Circular	Irregular	Plana	Não	Amarela	Heterogênea	Pouco	Heterogêneo
INPA R304	Circular	Irregular	Plana	Não	Amarela	Homogênea	Pouco	Homogêneo
INPA R311	Irregular	Irregular	Plana	Não	Branca	Heterogênea	Pouco	Heterogêneo
INPA R321	Circular	Irregular	Plana	Não	Branca	Homogênea	Moderado	Homogêneo
INPA R332	Irregular	Regular	Elevada	Não	Branca	Homogênea	Abundante	Homogêneo
INPA R529	Circular	Regular	Plana	Sim	Branca	Homogênea	Moderado	Homogêneo
INPA R546	Irregular	Irregular	Plana	Não	Branca	Homogênea	Abundante	Homogêneo
INPA R547	Circular	Regular	Plana	Não	Branca	Homogênea	Moderado	Homogêneo
INPA R552	Irregular	Regular	Plana	Não	Branca	Homogênea	Pouco	Homogêneo
INPA R555	Irregular	Regular	Plana	Não	Amarela	Heterogênea	Moderado	Heterogêneo
INPA R564	Irregular	Irregular	Plana	Não	Branca	Heterogênea	Pouco	Heterogêneo
INPA R565	Irregular	Irregular	Elevada	Sim	Branca	Homogênea	Abundante	Homogêneo
INPA R566	Irregular	Regular	Plana	Não	Branca	Homogênea	Pouco	Homogêneo
INPA R568	Irregular	Regular	Plana	Sim	Branca	Homogênea	Moderado	Homogêneo
INPA R571	Irregular	Regular	Elevada	Não	Branca	Heterogênea	Abundante	Heterogêneo
INPA R577	Irregular	Regular	Plana	Não	Branca	Homogênea	Abundante	Homogêneo
INPA R618	Irregular	Regular	Plana	Sim	Branca	Homogênea	Moderado	Homogêneo
INPA R631	Irregular	Irregular	Plana	Não	Branca	Heterogênea	Pouco	Heterogêneo
INPA R634	Irregular	Regular	Elevada	Não	Branca	Homogênea	Abundante	Homogêneo
INPA R657	Irregular	Irregular	Plana	Sim	Branca	Homogênea	Moderado	Homogêneo
INPA R666	Circular	Regular	Plana	Não	Branca	homogênea	Moderado	Homogêneo
INPA R672	Irregular	Regular	Elevada	Não	Branca	homogênea	Abundante	Homogêneo
INPA R674	Irregular	Irregular	Plana	Sim	Branca	Homogênea	Moderado	Homogêneo
INPA R675	Circular	Regular	Plana	Não	Branca	Homogênea	Moderado	Homogêneo
INPA R677	Circular	Regular	Plana	Sim	Branca	Homogênea	Moderado	Homogêneo
INPA R713	Irregular	Regular	Plana	Não	Branca	Heterogênea	Abundante	Heterogêneo

4.2. COLORAÇÃO DE GRAM E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS REATIVADOS.

De acordo com a coloração de Gram, os isolados INPA R020, R178, R236, R302, R529, R546, R547, R552, R618, R66 6 e R675 apresentaram coloração roxa (Gram-positiva) e todas as demais rizobactérias apresentaram coloração rósea, sendo, portanto, Gram-negativas. O tipo morfológico das bactérias observadas foi: bastonete, sendo possível verificar arranjos de: diplobacilos e estreptobacilos (Tabela 8).

A partir do sequenciamento da região do gene 16s rRNA, foram identificados os seguintes gêneros, conforme a Tabela 8.

Tabela 8 - Identificação dos isolados com base na comparação de sequência de 16 rDNA obtida com outras depositadas no banco de dados GenBank (análise BLASTn).

Isolados	Gêneros	GRAM	Forma
INPA R020	*Paenibacillus*	Positivo	Bastonete
INPA R178	*Paenibacillus*	Positivo	Bastonete
INPA R302	*Paenibacillus* sp.	Positivo	Bastonete
INPA R332	*Rhizobium* sp.	Negativo	Bastonete
INPA R233	*Bacillus*	Negativo	Bastonete
INPA R236	*Paenibacillus*	Positivo	Bastonete
INPA R304	*Bacillus*	Negativo	Bastonete
INPA R311	*Bacillus*	Negativo	Bastonete
INPA R321	*Bacillus*	Negativo	Bastonete
INPA R529	*Paenibacillus*	Positivo	Bastonete
INPA R546	*Paenibacillus*	Positivo	Bastonete
INPA R547	*Paenibacillus*	Positivo	Bastonete
INPA R552	*Paenibacillus*	Positivo	Bastonete
INPA R555	*Bradyrhizobium*	Negativo	Bastonete
INPA R564	*Bradyrhizobium*	Negativo	Bastonete
INPA R565	*Bacillus*	Negativo	Bastonete
INPA R566	*Bradyrhizobium*	Negativo	Bastonete
INPA R568	*Bradyrhizobium*	Negativo	Bastonete
INPA R571	*Bradyrhizobium*	Negativo	Bastonete
INPA R577	*Bradyrhizobium*	Negativo	Bastonete
INPA R618	*Paenibacillus*	Positivo	Bastonete
INPA R631	*Bradyrhizobium*	Negativo	Bastonete
INPA R634	*Bradyrhizobium*	Negativo	Bastonete
INPA R657	*Bradyrhizobium*	Negativo	Bastonete

Tabela 8 - Identificação dos isolados com base na comparação de sequência de 16 rDNA obtida com outras depositadas no banco de dados GenBank (análise BLASTn).

Isolados	Gêneros	GRAM	Forma
INPA R666	*Paenibacillus*	Positivo	Bastonete
INPA R672	*Rhizobium* sp.	Negativo	Bastonete
INPA R674	*Enterobacter*	Negativo	Bastonete
INPA R675	*Paenibacillus*	Positivo	Bastonete
INPA R677	*Rhizobium* sp.	Negativo	Bastonete
INPA R713	*Rhizobium* sp.	Negativo	Bastonete

4.3.TESTE DE DEGRADAÇÃO DE ÓLEO VEGETAL, MARGARINA E MATEIGA DE GARRAFA EM MEIO SÓLIDO – MEIO YMA

As tabelas 9, 10, 11, 12 e 13, 14 e 15 mostram o crescimento de estirpes de rizóbios com as fontes de carbono manitol (M), óleo de soja (OS), óleo de girassol (OG), óleo de milho (OM), óleo de canola (OC), margarina (M) e manteiga de garrafa (MG), nos cinco períodos avaliados (3, 6, 9, 12 e 15 dias), testados com os 30 isolados, onde foram obtidos os seguintes resultados:

Quando utilizado o meio YMA, contendo manitol como fonte de carbono, observou-se que 18 isolados atingiram a nota 3,06 (crescimento elevado), ou acima desta com três dias de incubação e com seis dias, esse número subiu para 25 e com 15 dias de incubação 29 (Figura 7).

Ao se analisar os dados com mais detalhe (Tabela 9), observou-se que apenas o isolado INPA R311 não apresentou nota satisfatória até o fim do período de 15 dias, atingindo uma nota máxima de 2,25 nesse período. As melhores bactérias foram aquelas que mostraram nota superior a 3,00 já aos 3 dias de crescimento conforme sugerido por Oliveira e Magalhães (1999), e de acordo com esse critério, as melhores bactérias foram - INPA R302, INPA R304, INPA R332, INPA R547, INPA R552, INPA R565, INPA R566, INPA R571, INPA R577, INPA R618, INPA R631, INPA R657, INPA R666, INPA R672, INPA R674, INPA R675, INPA R677 e INPA R713.

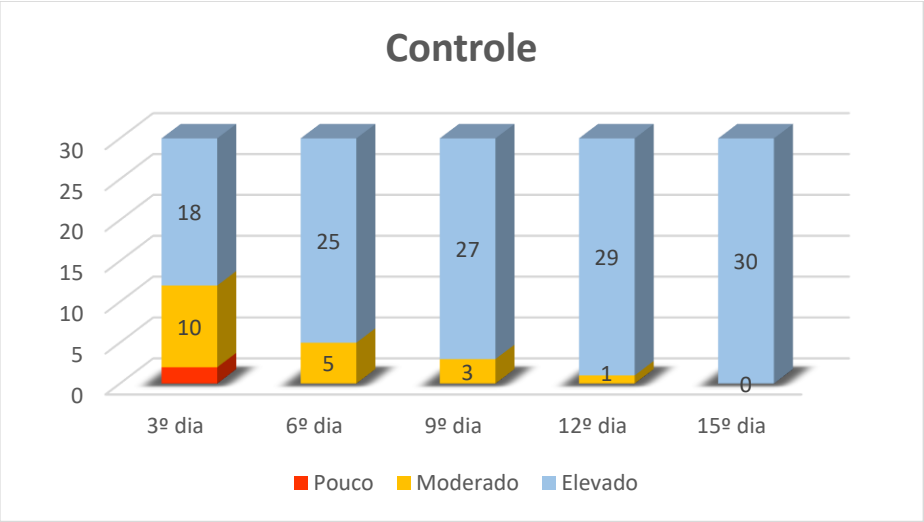


Figura 7 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA com manitol como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.

Tabela 9 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o manitol como fonte de carbono

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	2,50	2,94	3,13	3,31	3,38
INPA R178	2,56	2,81	3,00	3,19	3,31
INPA R233	3,00	3,00	3,25	3,25	3,63
INPA R236	2,25	2,63	2,94	3,13	3,25
INPA R302	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R304	3,44	3,81	3,75	3,81	4,00
INPA R311	2,13	2,19	2,25	2,25	3,25
INPA R321	3,00	3,25	3,25	3,75	4,00
INPA R332	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R529	2,94	3,94	3,94	4,00	4,00
INPA R546	3,00	3,69	3,69	3,69	3,75
INPA R547	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R552	3,06	3,44	4,00	4,00	4,00
INPA R555	2,50	3,25	3,56	3,63	3,63
INPA R564	1,25	3,25	4,00	4,00	4,00
INPA R565	3,75	3,81	4,00	4,00	4,00
INPA R566	3,94	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R568	1,13	3,38	4,00	4,00	4,00
INPA R571	3,50	3,75	4,00	4,00	4,00
INPA R577	3,25	3,38	4,00	4,00	4,00
INPA R618	3,63	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R631	3,38	3,69	3,94	4,00	4,00
INPA R634	2,75	3,06	3,50	3,63	4,00
INPA R657	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R666	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R672	3,94	3,94	4,00	4,00	4,00
INPA R674	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R675	3,81	3,88	3,88	3,94	4,00
INPA R677	3,75	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R713	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

4.3.1. Meio YMA sem manitol – Óleo de Soja como fonte de carbono

Quando utilizada a fonte de carbono óleo de soja, observou-se quem com três dias de incubação, três isolados apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), quatro isolados apresentaram médio crescimento (nota 2,06 a 3,00) e 23 apresentaram crescimento elevado (3,06 a 4,00). E após seis dias de incubação, um isolado apresentou pouco crescimento, três mostraram crescimento moderado e 26, crescimento elevado (Figura 8).

Notas de crescimento acima de 3,06 a partir do terceiro dia foi o critério de seleção das melhores bactérias. Por esse critério, foram selecionadas 23 rizobactérias: INPA R233, INPA R302, INPA R304, INPA R311, INPA R321, INPA R332, INPA R529, INPA R547, INPA R552, INPA, INPA R565, INPA R566, INPA R571, INPA R577, INPA R618, INPA R631, INPA R634, INPA R657, INPA R666 INPA R672, INPA R674, INPA R675, INPA R677, INPA R713

Com 15 dias de incubação, apenas um isolado apresentou crescimento moderado (INPA R546, com nota de 2,38), com todos os demais 29 isolados apresentando crescimento elevado, mostrando que a maioria desses necessitaram de pouco tempo para se adaptar à fonte de carbono, podendo degradar esse óleo com eficiência elevada (Tabela 10).

A rizobactéria INPA R666 já apresentava nota 4,00 com 24 horas de incubação com a fonte de carbono oriunda do óleo de soja, mostrando alta capacidade degradadora desse óleo. Segundo Oliveira e Magalhães (1999), os microrganismos que mostram crescimento elevado nos primeiros dias de crescimento se mostram superiores aos demais quanto ao aproveitamento da fonte de carbono, podendo ser um indicativo de qualidade superior para uma seleção inicial.

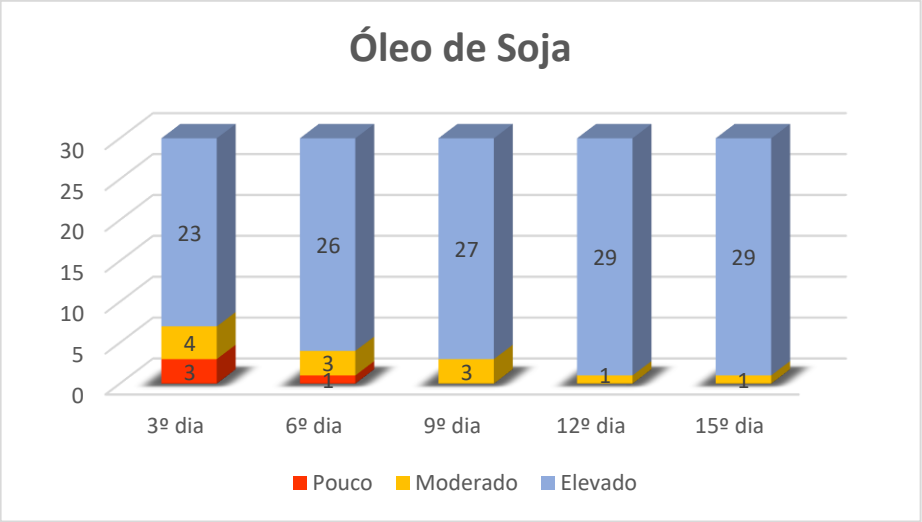


Figura 8 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo óleo de soja como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.

Tabela 10 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo de soja como fonte de carbono

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	1,00	3,00	3,00	3,75	3,75
INPA R178	2,75	3,00	3,63	3,63	4,00
INPA R233	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R236	2,50	2,50	2,50	3,50	4,00
INPA R302	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R304	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R311	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R321	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R332	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R529	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R546	1,00	1,13	2,25	2,38	2,38
INPA R547	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R552	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R555	2,88	3,50	4,00	4,00	4,00
INPA R564	1,75	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R565	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R566	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R568	2,50	3,75	4,00	4,00	4,00
INPA R571	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R577	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R618	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R631	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R634	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R657	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R666	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R672	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R674	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R675	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R677	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R713	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

4.3.2. Meio YMA sem manitol Óleo de Girassol como fonte de carbono

Quando utilizado o óleo de girassol como fonte de carbono, observou-se com três dias de incubação, que três isolados apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), cinco apresentaram crescimento médio (nota 2,06 a 3,00) e 22 apresentaram crescimento elevado (3,06 a 4,00). E após seis dias de incubação dois isolados apresentaram crescimento moderado e 28 apresentaram crescimento elevado (Figura 9).

Ao se analisar os dados com mais detalhes (Tabela 11), observou-se que apenas as bactérias INPA R178, INPA R236, INPA R311, INPA R321, INPA R529, INPA R555, INPA R564 e INPA R568 não mostraram notas superiores a 3,00 aos três dias de crescimento.

Notas de crescimento acima de 3,06 a partir do terceiro dia foi o critério de seleção das melhores bactérias. Por esse critério, foram selecionados 22 delas: INPA R 020, INPA R233, INPA R302, INPA R304, INPA R332, INPA R 546, INPA R547, INPA R552, INPA R565, INPA R566,

INPA R571, INPA R577, INPA R618, INPA R631, INPA R634, INPA R657, INPA R666, INPA R672, INPA R674, INPA R675, INPA R677, INPA R713.

Com 15 dias de incubação, todos os isolados apresentaram crescimento elevado, sendo que a maioria dessas bactérias necessitaram de pouco tempo para se adaptar a essa fonte de carbono, uma vez que 22 apresentaram notas superiores a 3,06 já aos três dias de crescimento (Tabela 11).

Algumas bactérias, tais como as INPA R321, INPA R568, INPA R666, já apresentavam nota 4,00 com 24 horas de incubação no meio contendo o óleo de girassol.

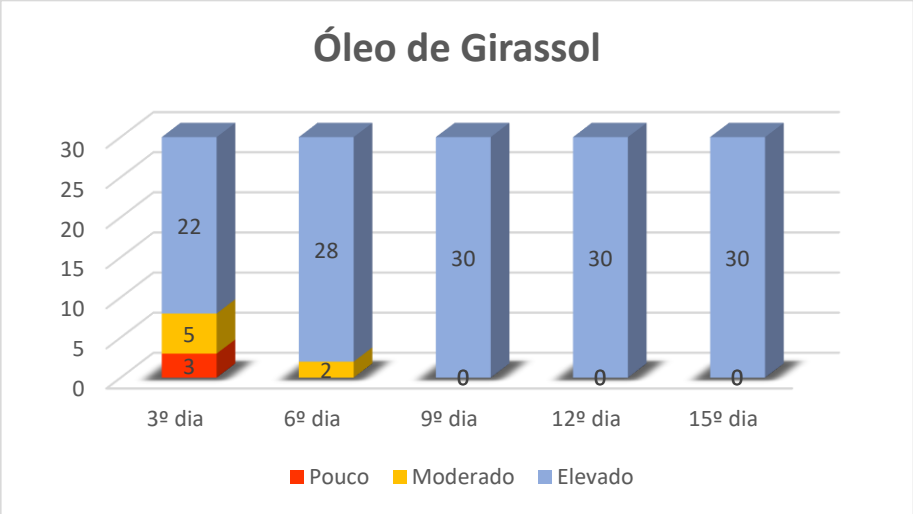


Figura 9 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo óleo de girassol como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.

Tabela 11 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo de girassol como fonte de carbono

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R178	2,38	3,56	4,00	4,00	4,00
INPA R233	3,88	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R236	2,63	3,56	4,00	4,00	4,00
INPA R302	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R304	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R311	1,88	3,75	4,00	4,00	4,00
INPA R321	2,25	3,00	4,00	4,00	4,00
INPA R332	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R529	2,38	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R546	3,25	3,88	4,00	4,00	4,00
INPA R547	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R552	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R555	2,88	3,38	3,75	3,75	4,00
INPA R564	1,00	3,13	4,00	4,00	4,00
INPA R565	3,75	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R566	3,25	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R568	1,00	2,56	3,81	4,00	4,00
INPA R571	3,75	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R577	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R618	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R631	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

Tabela 11 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo de girassol como fonte de carbono

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R634	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R657	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R666	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R672	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R674	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R675	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R677	3,38	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R713	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

4.3.3. Meio YMA sem manitol – Óleo de Milho como fonte de carbono

Quando utilizado o óleo de milho como fonte de carbono, observou-se com três dias de incubação, que três isolados apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), quatro apresentaram crescimento médio (nota 2,06 a 3,00) e 23 apresentaram crescimento elevado (3,06 a 4,00). E após seis dias de incubação dois isolados apresentaram pouco crescimento, um com crescimento moderado e 27 apresentaram crescimento elevado (Figura 10).

Ao se analisar os dados com mais detalhes (Tabela 12), observou-se que apenas as bactérias INPA R555, INPA R020, INPA R236, INPA R311, INPA R546, INPA R564 e INPA R568 mostraram notas inferiores a 3,06, indicando a alta capacidade da maioria delas em usarem o óleo de milho como fonte de carbono.

Notas de crescimento acima 3,06 a partir do terceiro dia foi o critério de seleção das melhores bactérias. Foram selecionados 23 delas – INPA R178, INPA R233, INPA R302, INPA R304, INPA R321, INPA R332, INPA R529, INPA R547, INPA R552, INPA R565, INPA R566, INPA R571, INPA R577, INPA R618, INPA R631, INPA R634, INPA R657, INPA R666, INPA R672, INPA R674, INPA R675, INPA R677, INPA R713.

Com 15 dias de incubação, todos os isolados apresentaram crescimento elevado. (Tabela 12).

Algumas bactérias, como as INPA R311 e INPA R666, já apresentavam nota 4,00 com 24 horas de incubação com a fonte de carbono óleo de milho.

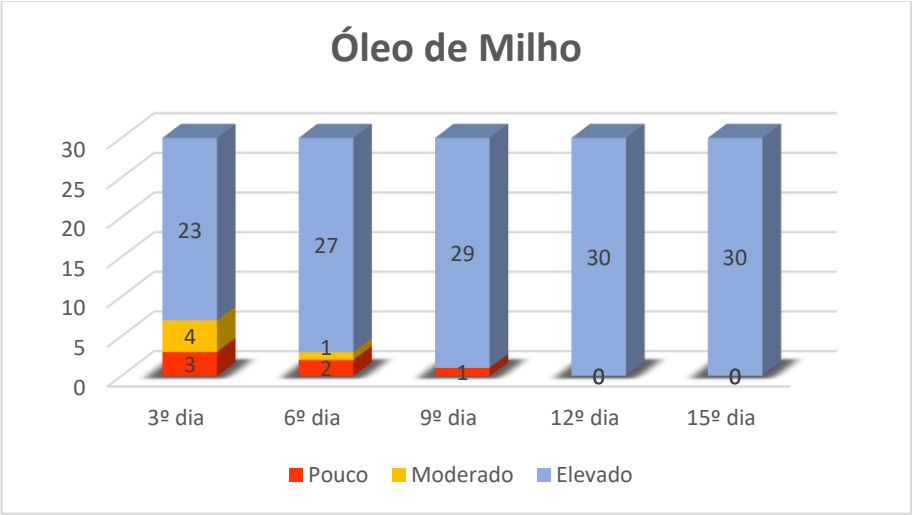


Figura 10 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo óleo de milho como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.

Tabela 12 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando o óleo de milho como fonte de carbono

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	2,75	3,00	3,69	4,00	4,00
INPA R178	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R233	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R236	3,00	3,75	3,94	4,00	4,00
INPA R302	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R304	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R311	2,88	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R321	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R332	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R529	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R546	1,00	1,00	1,75	3,25	3,50
INPA R547	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R552	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R555	1,50	1,50	3,75	3,88	3,94
INPA R564	2,38	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R565	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R566	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R568	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R571	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R577	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R618	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R631	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R634	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R657	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R666	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R672	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R674	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R675	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R677	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R713	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

4.3.4. Meio YMA sem manitol – Óleo de Canola como fonte de carbono

Quando utilizada o óleo de canola, com três dias de incubação, cinco isolados apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), um apresentou crescimento médio (nota 2,06 a 3,00) e 24 apresentaram crescimento elevado (3,06 a 4,00). E após seis dias de incubação, um isolado apresentou pouco crescimento, quatro apresentaram crescimento moderado e 25 apresentaram crescimento elevado (Figura 11).

Notas de crescimento acima 3,06 a partir do terceiro dia foi o critério de seleção dos melhores. Ao se analisar os resultados com mais detalhe (Tabela 13), observou-se que 24 bactérias podem ser selecionadas por esse critério: INPA R178, INPA R233, INPA R302, INPA R304, INPA R332, INPA R529, INPA R546, INPA R547, INPA R552, INPA R555, INPA R565, INPA R566, INPA R571, INPA R577, INPA R618, INPA R631, INPA R634, INPA R657, INPA R666, INPA R672, INPA R674, INPA R675, INPA R677, INPA R713.

Com 9 dias de incubação, todos os isolados apresentaram crescimento elevado, mostrando que essas bactérias apresentam alto potencial para degradar o óleo de canola (Tabela 13). A rizobactéria INPA R666 já apresentava nota 4,00 com 24 horas de incubação, mostrando-se superior às demais.

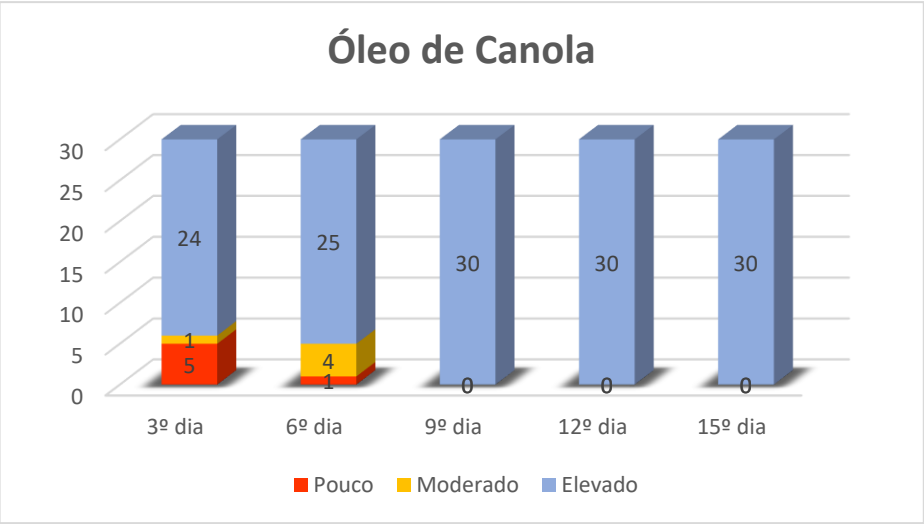


Figura 11 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo óleo de canola como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.

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

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	1,88	2,38	3,25	3,50	3,75
INPA R178	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R233	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R236	1,88	2,75	4,00	4,00	4,00
INPA R302	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

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

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R304	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R311	1,75	1,88	4,00	4,00	4,00
INPA R321	1,50	2,25	4,00	4,00	4,00
INPA R332	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R529	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R546	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R547	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R552	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R555	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R564	2,75	2,88	4,00	4,00	4,00
INPA R565	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R566	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R568	1,63	3,63	4,00	4,00	4,00
INPA R571	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R577	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R618	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R631	3,13	3,31	4,00	4,00	4,00
INPA R634	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R657	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R666	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R672	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R674	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R675	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R677	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R713	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

4.3.5. Meio YMA sem manitol – Margarina como fonte de carbono

Ao se utilizar a margarina como fonte de carbono, observou-se com três dias de incubação, que onze isolados apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), sete apresentaram crescimento médio (nota 2,06 a 3,00) e 12 isolados apresentaram crescimento elevado (3,06 a 4,00). E após seis dias de incubação, quatro isolados apresentaram pouco crescimento, sete apresentaram crescimento moderado e, 19 apresentaram crescimento elevado (Figura 12).

Foram selecionadas 12 bactérias analisando-se seus crescimentos aos três dias de incubação: INPA R302, INPA R304, INPA R332, INPA R529, INPA R547, INPA R552, INPA R566, INPA R571, INPA R577, INPA R657, INPA R666, INPA R675 (Tabela 14).

Seis delas já apresentavam nota 4,00 com 24 horas de incubação tendo como fonte de carbono, a margarina (INPA R302, INPA R304, INPA R547, INPA R552, INPA R571, INPA R657 e INPA R666), mostrando-se assim, como as melhores para degradar a margarina.

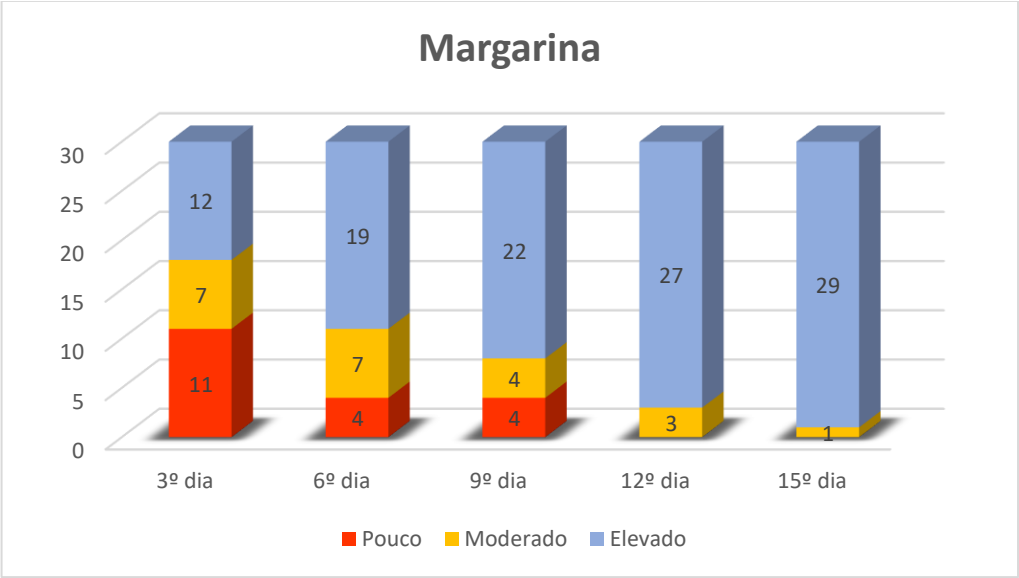


Figura 12 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo margarina como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.

Tabela 14 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando a margarina como fonte de carbono

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	1,00	1,00	1,00	3,50	4,00
INPA R178	1,75	2,50	2,63	2,63	3,88
INPA R233	2,13	3,38	3,63	4,00	4,00
INPA R236	1,88	2,19	2,31	3,31	3,31
INPA R302	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R304	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R311	2,38	3,38	3,63	4,00	4,00
INPA R321	1,25	1,81	2,00	3,00	3,50
INPA R332	3,75	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R529	3,25	3,25	3,38	4,00	4,00
INPA R546	2,00	2,25	2,50	3,88	4,00
INPA R547	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R552	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R555	2,00	3,13	3,38	4,00	4,00
INPA R564	1,75	2,88	3,06	4,00	4,00
INPA R565	2,25	2,50	2,81	4,00	4,00
INPA R566	3,50	3,50	3,69	4,00	4,00
INPA R568	1,00	3,00	3,31	4,00	4,00
INPA R571	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R577	3,75	3,88	3,94	4,00	4,00
INPA R618	2,44	3,38	3,75	4,00	4,00
INPA R631	2,88	3,50	3,75	4,00	4,00
INPA R634	2,50	2,63	3,19	4,00	4,00
INPA R657	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R666	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R672	1,13	1,25	1,56	4,00	4,00
INPA R674	1,50	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R675	3,88	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R677	2,75	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R713	1,13	1,88	1,94	2,88	2,88

4.5.6. Meio YMA sem manitol – Manteiga de garrafa como fonte de carbono.

Ao se usar a manteiga como fonte de carbono, observou-se com três dias de incubação, que seis isolados apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), três apresentaram crescimento médio (nota 2,06 a 3,00) e 21 apresentaram crescimento elevado (3,06 a 4,00). E após seis dias de incubação 4 isolados apresentaram pouco crescimento, 5 isolados apresentaram crescimento moderado e 21 isolados apresentaram crescimento elevado (Figura 13).

Com base nos seus crescimentos aos três dias de incubação, foram selecionadas 21 bactérias – INPA R178, INPA R233, INPA R302, INPA R304, INPA R332, INPA R529, INPA R547, INPA R552, INPA R565, INPA R566, INPA R571, INPA R577, INPA R618, INPA R631, INPA R657, INPA R666, INPA R672, INPA R674, INPA R675, INPA R677, INPA R713.

Com 9 dias de incubação, quase todos os isolados apresentaram crescimento elevado, com exceção das bactérias INPA R236, INPA R311 e INPA R321. Isto demonstra que a maioria delas apresenta altos potenciais de degradação da manteiga. É importante destacar que 18 das 30 rizobactérias testadas já apresentavam nota 4,00 com 24 horas de incubação (INPA R178, INPA R302, INPA R304, INPA R332, INPA R529, INPA R547, INPA R552, INPA R555, INPA R571, INPA R577, INPA R618, INPA R657, INPA R666, INPA R672, INPA R674, INPA R675, INPA R677 e INPA R713 (Tabela 15), colocando-as como as com melhores performances na degradação da margarina.

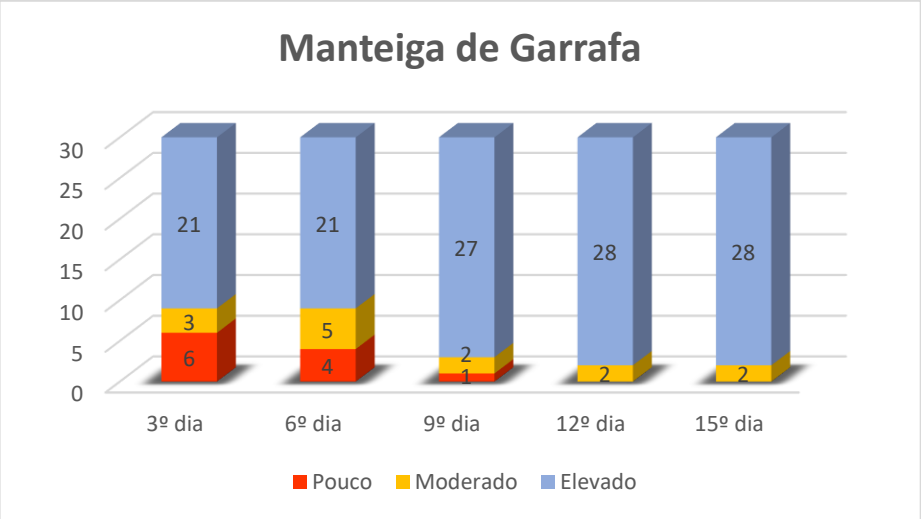


Figura 13 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio YMA sem manitol e contendo mateiga de garrafa como fonte de carbono ao longo de quinze dias de incubação.

Tabela 15 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio sólido, utilizando manteiga de garrafa como fonte de carbono

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	2,38	2,69	3,38	4,00	4,00
INPA R178	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R233	3,63	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R236	2,00	2,13	2,25	2,38	2,50
INPA R302	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R304	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R311	1,25	1,44	2,50	2,50	3,00
INPA R321	1,25	1,38	1,50	3,00	3,50
INPA R332	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R529	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R546	2,50	2,63	3,06	4,00	4,00
INPA R547	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R552	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R555	2,50	2,69	4,00	4,00	4,00
INPA R564	1,50	1,63	3,25	4,00	4,00
INPA R565	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R566	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R568	1,50	1,63	3,75	4,00	4,00
INPA R571	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R577	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R618	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R631	3,75	3,94	4,00	4,00	4,00
INPA R634	1,88	2,06	3,75	4,00	4,00
INPA R657	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R666	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R672	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R674	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R675	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R677	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R713	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

Todos os microrganismos testados atingiram notas elevadas (3,06 a 4,00) no sexto dia de crescimento com pelo menos uma das fontes de carbono ao se usar o meio YMA modificado, demonstrando com isso, que essas bactérias são potenciais degradadoras de óleos vegetais, margarina e manteiga. Um outro fator relevante é o fato desses microrganismos apresentarem notas de crescimentos elevados e moderados após o sexto dia, demonstrando assim a possibilidade de serem utilizados na formação de consórcios em testes de biodegradação, pois até o 15º dia apresentaram crescimento significativo tanto com a fonte de carbono manitol, quanto com os derivados de óleo vegetal, margarina e manteiga. Esses dados indicam elevado potencial de uso dessas bactérias, pois Cáuper et al. (2017), ao avaliarem a capacidade de 15 rizobactérias para a biodegradação de óleo de cozinha em meio sólido, verificaram somente a partir do 12º dia elas atingiram crescimento elevado.

Outros estudos com diferentes microrganismos também têm sido realizados na tentativa de se encontrar uma ou algumas espécies de bactérias com potencial de degradação de derivados de petróleo (BEAZLEY et al., 2012). Kostka et al. (2011) descreveram membros da

Gammaproteobacteria (*Alcanivorax*, *Marinobacter*) e *Alphaproteobacteria* (*Rhodobacteraceae*) como os principais microrganismos responsáveis pela degradação do óleo em ecossistemas de praia contaminado por esse derivado do petróleo no Golfo do México.

Ao se analisar os crescimentos no meio YMA modificado, observou-se que o melhor período de incubação avaliado foi o com três dias de incubação, quando se constatou um número adequado de rizobactérias capazes de degradar qualquer uma das fontes de carbono que podem ocorrer como gorduras em águas servidas de áreas urbanas. Destaca-se os capazes de degradar o óleo de soja, em maior número do que os que degradaram os outros derivados. Também deve-se ressaltar que os isolados INPA R302, INPA R304, INPA R332, INPA R529, INPA R547, INPA R552, INPA R566, INPA R571, INPA R577, INPA R618, INPA R631, INPA R657, INPA R666, INPA R672, INPA R674, INPA R675 e INPA R677 mostraram crescimento elevado até o 6º dia em todos os derivados testados, sugerindo que essas rizobactérias são potencialmente viáveis para serem utilizadas em testes posteriores de degradação. Estes resultados indicam claramente que diferentes tipos de óleos vegetais, margarina e manteiga de garrafa foram degradados e utilizados por todas as bactérias até o final do experimento, com 15 dias de duração, mostrando terem algum potencial de degradação desses componentes encontrados como contaminantes no meio ambiente. Todavia, dependendo da complexidade e natureza alifática e aromática da amostra, pode haver variações nos índices de degradação. Os resultados encontrados nesta pesquisa corroboram com Dasgupta et al. (2013), que ao avaliarem a degradação do Petróleo Bruto por Espécies de *Pseudomonas sp*., observaram diferenças significativas entre o crescimento das três estirpes na presença do petróleo bruto e do hexadecano, porém diferentemente das amostras de rizobactérias, na presença de querosene os espécimes de *Pseudomonas sp*. não apresentaram variação de crescimento.

4.4. TESTE DE DEGRADAÇÃO DE ÓLEO VEGETAL, MARGARINA E MATEIGA DE GARRAFA EM MEIO SÓLIDO – MEIO INPA

O meio YMA modificado contém extrato de levedura, um ótimo componente usado para o crescimento dos microrganismos de um modo geral (VINCENT, 1970). No entanto, esse complexo vitamínico e mineral, de constituição orgânica, não é encontrado facilmente no meio ambiente e muito menos nas águas servidas das áreas urbanas, onde seriam usadas para degradar as gorduras e óleos contaminantes.

É possível conhecermos os microrganismos presentes em diferentes habitats simulando, no laboratório, as condições em que se desenvolvem naturalmente. As suas necessidades nutricionais são asseguradas pela utilização de meios de cultura e o crescimento microbiano é facilitado pelas condições ambientais que lhes são proporcionadas (Potes; Marinho, 2007). Diante disso, decidiu-se testar suas capacidades adaptativas em um meio onde o extrato de levedura não está presente, mas que contém macro e micronutrientes geralmente encontrados nos solos de um modo geral. Utilizou-se para isso, do meio INPA, que se mostrou adequado para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo (Moura; Oliveira, 2017; Brito et al., 2017).

As tabelas 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22, mostram o crescimento dos 30 isolados de rizobactérias com diferentes fontes de carbono como óleo de soja (OS), óleo de girassol (OG), óleo de milho (OM), óleo de canola (OC), margarina (M) e manteiga de garrafa (MG), usando-se o meio INPA em substituição ao meio YMA modificado, nos cinco períodos avaliados (3, 6, 9, 12 e 15 dias).

Quando utilizado apenas o meio INPA, sem fonte de carbono, observou-se que apenas o isolado INPA R566 atingiu nota 3,06 (crescimento elevado), ou acima desta com três dias de incubação. Com seis dias, esse número subiu para três bactérias e com 15 dias de incubação, esse número subiu para sete (Figura 14).

Ao se analisar os dados com mais detalhes (Tabela 16) observou-se que a identificação dessas bactérias foram: INPA R566, INPA R568, INPA R631, INPA R634, INPA R672 e INPA R675 e R677, mostrando serem altamente adaptáveis a condições onde a fonte de carbono está quase ausente, na forma de traços encontrados no ágar do meio de cultura.

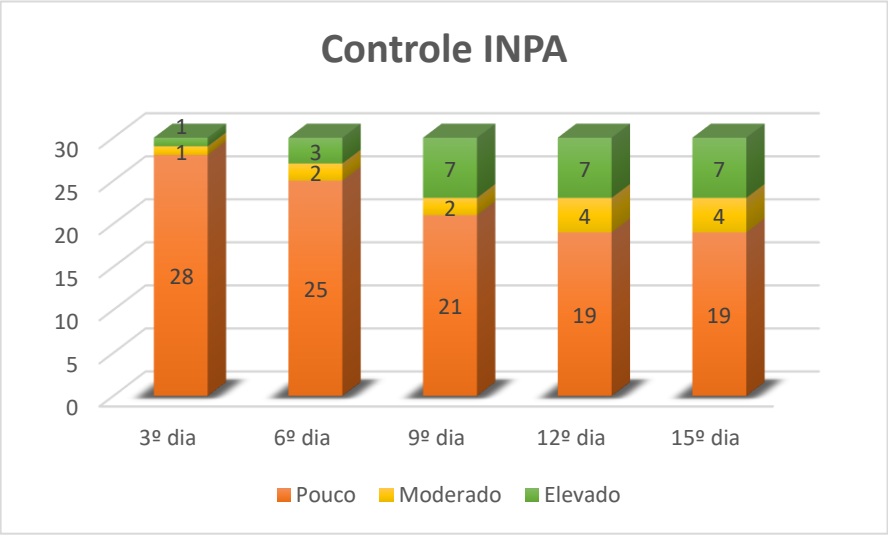


Figura 14 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA ao longo de quinze dias de incubação.

Tabela 16 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido.

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
INPA R178	1,88	1,50	1,63	1,63	1,63
INPA R233	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38
INPA R236	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13
INPA R302	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R304	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
INPA R311	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R321	1,31	1,63	1,75	1,75	1,75
INPA R332	1,50	1,50	1,75	1,75	1,75
INPA R529	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R546	1,00	1,00	1,00	2,25	2,25
INPA R547	1,13	1,13	1,19	1,19	1,19
INPA R552	1,31	1,31	1,63	1,63	1,63
INPA R555	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13
INPA R564	1,13	1,13	1,50	2,50	2,50
INPA R565	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63
INPA R566	3,13	3,50	4,00	4,00	4,00
INPA R568	1,25	1,25	3,75	4,00	4,00
INPA R571	1,38	1,56	1,56	1,56	1,56
INPA R577	1,25	1,38	1,38	1,38	1,38
INPA R618	1,00	1,06	1,00	1,00	1,00
INPA R631	1,38	3,25	3,50	3,50	3,50
INPA R634	1,50	3,38	3,69	3,75	3,75
INPA R657	1,25	1,31	2,06	2,06	2,06
INPA R666	1,75	1,94	1,94	1,94	1,94
INPA R672	1,13	1,13	3,31	3,31	3,31
INPA R674	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
INPA R675	2,50	2,50	3,63	4,00	4,00
INPA R677	2,00	2,13	4,00	4,00	4,00
INPA R713	1,63	1,75	2,19	2,19	2,19

4.4.1. Meio INPA – Óleo de soja como fonte de carbono

Ao se adicionar o óleo de soja como fonte de carbono no meio INPA, observou-se com três dias de incubação, que 23 isolados apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), cinco apresentaram crescimento médio (nota 2,06 a 3,00) e apenas dois (INPA R566 e INPA R672) apresentaram crescimento elevado (3,06 a 4,00). (Figura 15, Tabela 17), mostrando-se assim, como os com maiores potenciais de degradar o óleo de soja entre todas as bactérias testadas. Portanto foram selecionados 2 isolados (INPA R566 e INPA R672), pois apresentaram notas superior a 3,00 após seis dias de incubação.

Com 15 dias de incubação, cinco isolados apresentaram pouco crescimento, quatro apresentaram crescimento moderado, com todos os demais 21 isolados apresentando crescimento elevado, mostrando que a maioria dessas bactérias têm potencial para degradar o óleo de soja usando o meio INPA como complemento mineral (Tabela 17).

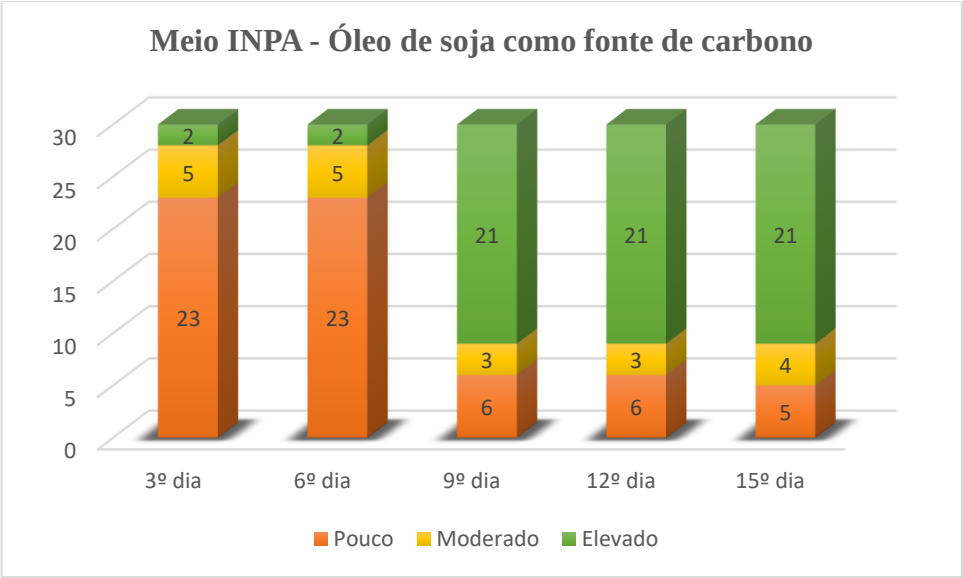


Figura 15 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA e óleo de soja ao longo de quinze dias de incubação.

Tabela 17 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo óleo de soja como fonte de carbono.

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	2,31	2,31	3,50	3,50	3,50
INPA R178	1,50	1,50	3,44	3,44	3,44
INPA R233	1,00	1,56	2,25	2,25	2,25
INPA R236	1,00	1,00	1,50	1,50	1,50
INPA R302	1,00	1,00	2,69	2,69	2,69
INPA R304	1,63	1,63	4,00	4,00	4,00
INPA R311	1,00	1,00	1,38	1,38	1,63
INPA R321	1,00	1,00	1,88	1,88	2,88
INPA R332	1,31	1,31	4,00	4,00	4,00
INPA R529	1,00	1,00	3,44	3,44	3,44
INPA R546	2,13	2,13	3,81	3,81	3,81
INPA R547	1,25	1,25	3,75	3,75	3,81
INPA R552	2,13	2,13	4,00	4,00	4,00
INPA R555	2,50	2,50	4,00	4,00	4,00
INPA R564	1,75	1,75	4,00	4,00	4,00
INPA R565	1,00	1,00	3,50	3,50	3,50
INPA R566	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R568	1,38	1,38	3,69	3,69	3,69
INPA R571	1,38	1,38	4,00	4,00	4,00
INPA R577	1,31	1,31	1,38	1,38	1,38
INPA R618	1,25	1,25	1,50	1,50	1,50
INPA R631	1,38	1,38	4,00	4,00	4,00
INPA R634	1,75	1,75	3,38	3,38	3,50
INPA R657	1,50	1,50	2,50	2,50	2,50
INPA R666	1,50	1,50	4,00	4,00	4,00
INPA R672	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R674	1,81	1,81	4,00	4,00	4,00
INPA R675	2,75	2,75	4,00	4,00	4,00
INPA R677	1,50	1,50	1,75	1,75	1,75
INPA R713	1,63	1,63	3,38	3,38	4,00

4.4.2. Meio INPA – Óleo de girassol como fonte de carbono

Ao se analisar o crescimento das rizobactérias no meio INPA contendo o óleo de girassol como fonte de carbono (Figura 16), observou-se que com três dias de incubação, 28 isolados apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), um isolado (INPA R677) (Tabela 18) apresentou crescimento médio (nota 2,06 a 3,00) e apenas a INPA R672 apresentou crescimento elevado (3,13), mostrando, assim, a com maior potencial de degradação desse óleo. Após seis dias de incubação, 16 bactérias apresentaram pouco crescimento, sete apresentaram crescimento moderado e apenas sete (INPA R566, INPA R568, INPA R631, INPA R672, INPA R675, INPA R677 e INPA R713) apresentaram crescimento elevado (Figura 16, Tabela 18).

Portanto foram selecionados 7 isolados (INPA R566, INPA R568, INPA R631, INPA R672, INPA R675, INPA R677 e INPA R713) pois apresentaram notas superior a 3,00 após seis dias de incubação.

Ao final do experimento, após 15 dias de incubação, onze rizobactérias apresentaram pouco crescimento, quatro apresentaram crescimento moderado e as demais quinze mostrando crescimento elevado (Tabela 18).

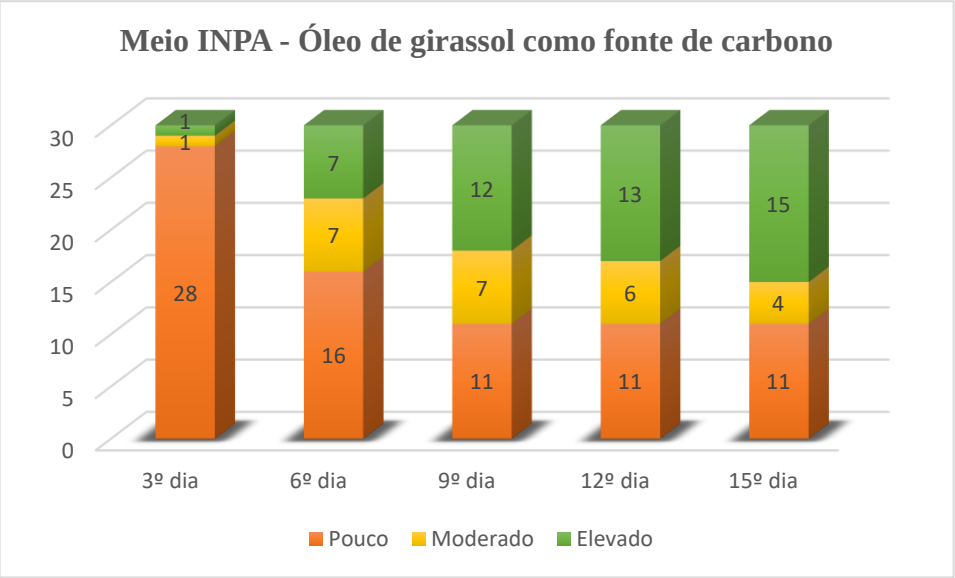


Figura 16 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA e óleo de girassol ao longo de quinze dias de incubação

Tabela 18 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo óleo de girassol como fonte de carbono.

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	1,00	1,00	1,13	1,19	1,31
INPA R178	1,06	1,19	1,19	1,19	1,19
INPA R233	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R236	1,13	1,88	2,00	2,00	2,00
INPA R302	1,00	2,19	2,19	2,19	2,19
INPA R304	1,19	1,38	1,50	1,75	1,75

Tabela 18 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo óleo de girassol como fonte de carbono.

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R311	1,00	1,13	4,00	4,00	4,00
INPA R321	1,13	1,25	3,13	3,38	3,38
INPA R332	2,00	2,25	4,00	4,00	4,00
INPA R529	1,00	1,56	1,56	1,56	1,56
INPA R546	1,13	1,13	3,00	3,00	3,50
INPA R547	1,13	1,13	1,38	1,50	1,50
INPA R552	1,25	1,38	2,75	3,13	3,13
INPA R555	1,00	1,00	1,00	1,25	1,38
INPA R564	1,44	1,56	3,13	3,31	3,31
INPA R565	1,06	2,13	2,13	2,13	2,13
INPA R566	1,63	3,69	4,00	4,00	4,00
INPA R568	1,06	3,44	4,00	4,00	4,00
INPA R571	1,19	1,25	1,19	1,31	1,44
INPA R577	1,00	1,13	1,13	1,13	1,13
INPA R618	1,00	1,13	2,25	2,38	2,50
INPA R631	1,19	3,13	3,13	3,75	3,88
INPA R634	1,31	1,56	2,50	2,50	3,06
INPA R657	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13
INPA R666	1,31	1,56	4,00	4,00	4,00
INPA R672	3,13	3,69	4,00	4,00	4,00
INPA R674	1,00	2,13	2,38	2,38	2,38
INPA R675	1,25	3,50	3,56	4,00	4,00
INPA R677	2,88	3,31	4,00	4,00	4,00
INPA R713	1,63	3,25	3,25	3,25	3,25

4.4.3. Meio INPA – Óleo de milho como fonte de carbono

Ao se usar o óleo de milho como fonte de carbono no meio INPA, observou-se que com três dias de incubação, 27 rizobactérias apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), três apresentaram crescimento médio (nota 2,06 a 3,00) e nenhuma apresentou crescimento elevado (3,06 a 4,00), mostrando que elas têm mais dificuldade de degradar esse óleo. Após seis dias de incubação, 22 das bactérias apresentaram pouco crescimento, apenas uma apresentou crescimento moderado e sete apresentaram crescimento elevado. Ao se olhar com mais detalhes os dados obtidos (Tabela 19), verificou-se que foram sete rizobactérias (INPA R020, INPA R332, INPA R566, INPA R631, INPA R672, INPA R675 e INPA R677) que apresentaram crescimento elevado após seis período de incubação, sendo, portanto, as com maiores potenciais de degradação desse óleo.

Ao final do experimento, com 15 dias de incubação, observou-se que treze das rizobactérias apresentaram pouco crescimento, quatro apresentaram crescimento moderado e treze, crescimento elevado, mostrando que a maioria desses microrganismos necessitaram mais de nove dias para crescerem quando esse óleo foi usado como fonte de carbono (Figura 17, Tabela 19).

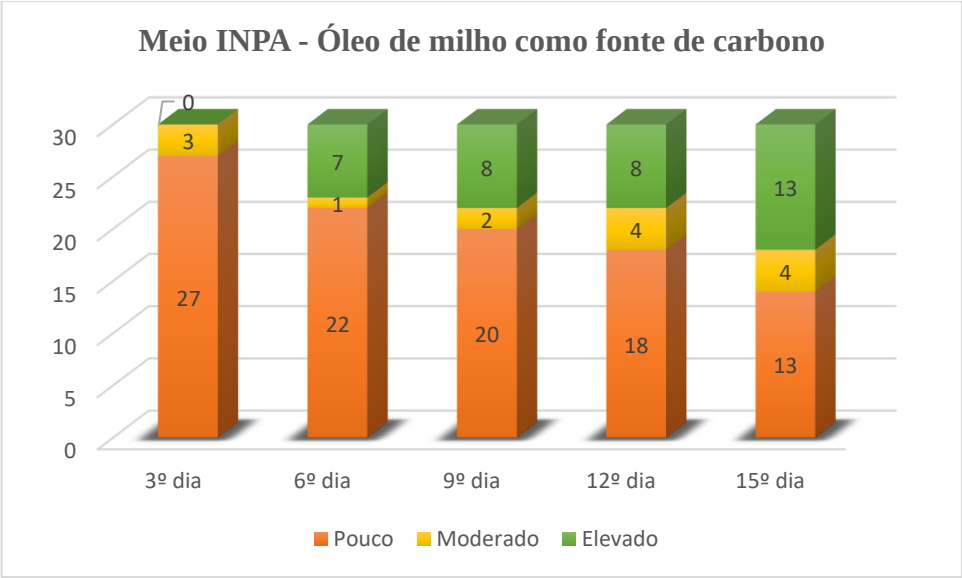


Figura 17 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA e óleo de milho ao longo de quinze dias de incubação.

Tabela 19 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo óleo de milho como fonte de carbono.

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	1,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R178	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R233	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R236	1,13	1,38	1,38	1,50	2,00
INPA R302	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R304	1,13	1,75	3,44	3,56	4,00
INPA R311	1,00	1,00	1,00	1,00	2,38
INPA R321	1,00	1,25	1,25	1,38	1,38
INPA R332	2,19	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R529	1,00	1,13	1,13	1,38	2,00
INPA R546	1,13	1,50	1,50	1,50	2,25
INPA R547	1,13	1,13	1,00	1,25	3,25
INPA R552	1,06	1,25	1,38	1,75	2,50
INPA R555	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R564	1,38	1,75	2,44	2,63	3,50
INPA R565	1,00	3,00	3,00	3,00	3,13
INPA R566	2,19	3,25	3,75	3,88	4,00
INPA R568	1,13	1,25	1,25	1,25	1,25
INPA R571	1,38	1,75	1,75	2,00	2,00
INPA R577	1,06	1,00	1,00	1,25	1,38
INPA R618	1,06	1,00	1,25	1,25	2,75
INPA R631	1,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R634	1,38	1,50	2,13	2,63	4,00
INPA R657	1,00	1,00	1,00	1,13	1,13
INPA R666	1,25	1,63	1,88	2,25	3,25
INPA R672	2,38	3,75	3,88	4,00	4,00
INPA R674	1,06	1,38	1,38	1,38	1,38
INPA R675	1,75	3,88	4,00	4,00	4,00
INPA R677	1,81	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R713	1,38	1,00	1,13	1,25	1,50

4.4.4. Meio INPA – Óleo de canola como fonte de carbono

Ao se usar o óleo de canola no meio INPA como fonte de carbono, observou-se que com três dias de incubação, 23 rizobactérias apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), duas apresentaram crescimento médio (nota 2,06 a 3,00) e apenas cinco apresentaram crescimento elevado (3,06 a 4,00). E após seis dias de incubação não houve alterações em relação ao 3º dia, sendo apenas as bactérias INPA R332, INPA R566, INPA R672, INPA R675 e INPA R713 apresentaram crescimento elevado (Figura 18, Tabela 20), mostrando-se as com maiores potenciais de degradação desse óleo.

Com 15 dias de incubação, treze rizobactérias apresentaram pouco crescimento, cinco apresentaram crescimento moderado e doze, crescimento elevado. De um modo geral, a maioria desses microrganismos necessitaram mais de nove dias para crescerem adequadamente quando esse óleo é usado como fonte de carbono (Tabela 20).

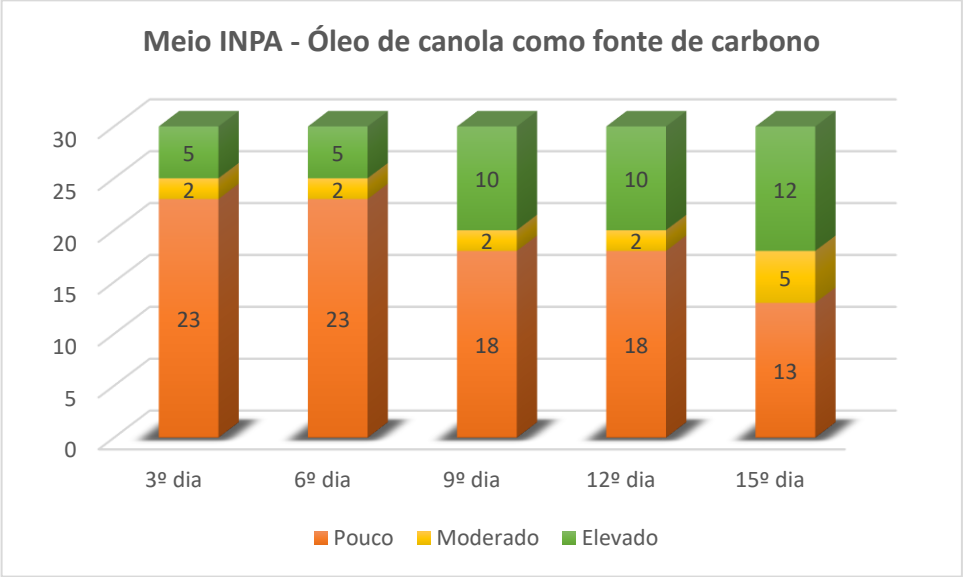


Figura 18 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA e óleo de canola ao longo de quinze dias de incubação.

Tabela 20 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo óleo de canola como fonte de carbono.

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R178	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
INPA R233	1,38	1,38	1,38	1,38	2,00
INPA R236	1,25	1,25	1,25	1,25	1,50
INPA R302	1,94	1,94	2,50	2,50	4,00
INPA R304	1,63	1,63	1,63	1,63	1,63
INPA R311	1,38	1,38	1,38	1,38	2,00
INPA R321	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06
INPA R332	3,75	3,75	4,00	4,00	4,00

Tabela 20 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo óleo de canola como fonte de carbono.

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R529	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R546	1,00	1,00	1,00	1,00	2,25
INPA R547	1,31	1,31	1,31	1,31	1,56
INPA R552	1,25	1,25	3,63	3,63	3,63
INPA R555	1,13	1,13	3,75	3,75	3,75
INPA R564	1,81	1,81	1,50	1,50	2,56
INPA R565	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38
INPA R566	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R568	1,31	1,31	1,31	1,31	1,31
INPA R571	1,63	1,63	2,63	2,63	2,63
INPA R577	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
INPA R618	1,50	1,50	2,00	2,00	2,00
INPA R631	2,25	2,25	4,00	4,00	4,00
INPA R634	1,69	1,69	1,88	1,88	3,13
INPA R657	1,19	1,19	1,31	1,31	2,38
INPA R666	1,25	1,25	3,63	3,63	4,00
INPA R672	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R674	1,25	1,25	2,00	2,00	3,00
INPA R675	3,25	3,25	3,75	3,75	4,00
INPA R677	2,50	2,50	4,00	4,00	4,00
INPA R713	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00

4.4.5. Meio INPA – Margarina como fonte de carbono

Ao se usar a margarina (Figura 19), observou-se que com três dias de incubação, 28 das bactérias apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), apenas uma apresentou crescimento médio (nota 2,06 a 3,00), bem como apenas a INPA R332 apresentou crescimento elevado (3,13) (Tabela 21). E após seis dias de incubação houve poucas alterações em relação ao 3º dia de incubação, e apenas as rizobactérias INPA R332, INPA R568, INPA R672 e INPA R677 apresentaram crescimento elevado (Tabela 21), mostrando, assim, os maiores potenciais de degradação de margarina.

Com 15 dias de incubação, 19 apresentaram pouco crescimento, sete apresentaram crescimento moderado e apenas as bactérias INPA R332, INPA R568, INPA R672 e INPA R677 apresentando crescimento elevado.

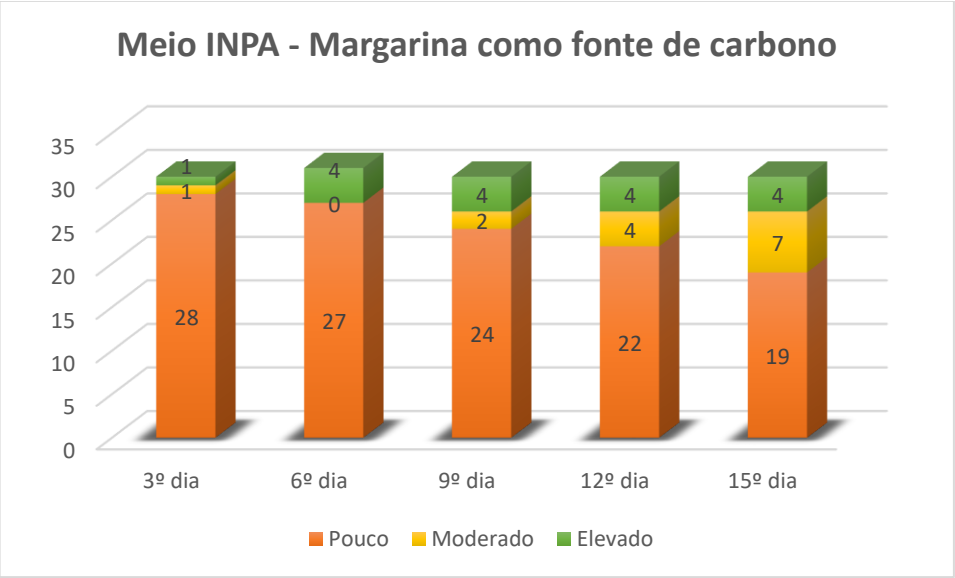


Figura 19 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA e margarina ao longo de quinze dias de incubação.

Tabela 21 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo margarina como fonte de carbono.

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R178	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R233	1,00	1,13	1,13	1,25	1,25
INPA R236	1,00	1,19	1,19	1,25	1,25
INPA R302	1,00	1,19	1,19	1,25	1,25
INPA R304	1,00	1,13	1,13	1,25	1,25
INPA R311	1,13	1,38	1,38	1,44	1,50
INPA R321	1,00	1,25	1,25	1,25	1,25
INPA R332	3,13	4,00	4,00	4,00	4,00
INPA R529	1,00	1,13	1,13	1,13	1,13
INPA R546	1,00	1,00	2,00	2,25	2,50
INPA R547	1,00	1,25	1,25	1,25	1,25
INPA R552	1,00	1,44	1,75	1,88	1,88
INPA R555	1,00	1,31	1,31	1,31	1,38
INPA R564	1,00	1,06	1,25	1,63	2,50
INPA R565	1,00	1,06	2,50	2,50	2,50
INPA R566	1,13	1,19	2,25	2,25	2,25
INPA R568	1,19	3,13	4,00	4,00	4,00
INPA R571	1,00	1,00	1,00	1,06	1,13
INPA R577	1,00	1,06	1,06	1,06	1,06
INPA R618	1,00	1,06	1,19	1,38	1,44
INPA R631	1,13	1,31	1,31	2,50	2,75
INPA R634	1,00	1,25	1,38	1,69	1,69
INPA R657	1,00	1,13	1,13	1,13	1,19
INPA R666	1,00	1,13	1,50	2,00	2,25
INPA R672	2,13	3,50	4,00	4,00	4,00
INPA R674	1,00	1,50	1,50	1,63	1,75
INPA R675	1,31	1,50	1,63	2,00	2,50
INPA R677	2,00	3,19	4,00	4,00	4,00
INPA R713	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

4.4.6. Meio INPA – Manteiga de garrafa como fonte de carbono

Ao se utilizar a manteiga de garrafa no meio INPA (Figura 19), observou-se que com três dias de incubação, 29 rizobactérias apresentaram pouco crescimento (notas de 1,00 a 2,00), apenas uma apresentou crescimento médio (nota 2,06 a 3,00) e nenhuma apresentou crescimento elevado (3,06 a 4,00). Após seis dias de incubação, houve poucas alterações em relação ao 3º dia de incubação, e apenas as bactérias INPA R332, INPA R675 e INPA R677 apresentaram crescimento elevado (Figura 20, Tabela 22), mostrando-se como as com maiores potenciais de crescimento e degradação dessa manteiga.

Com 15 dias de incubação, 24 apresentaram pouco crescimento, três apresentaram crescimento moderado e apenas as três bactérias (INPA R332, INPA R675 e INPA R676) apresentando crescimento elevado. Apesar de haver pouco crescimento neste meio, e com esta fonte de carbono, estes microrganismos apresentaram algum tipo de crescimento (Tabela 22).

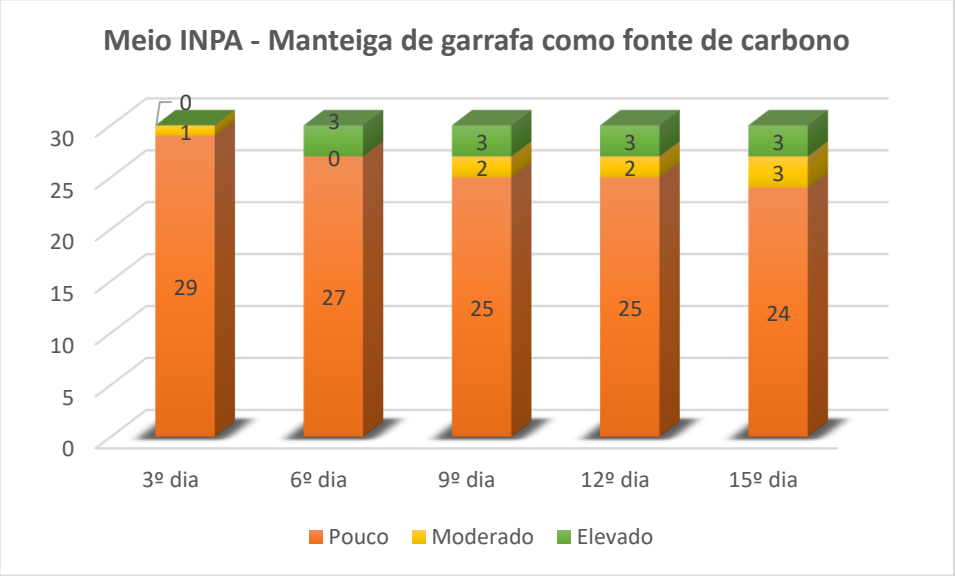


Figura 20 - Crescimento dos isolados de rizobactérias em meio INPA e manteiga de garrafa ao longo de quinze dias de incubação.

Tabela 22 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo manteiga de garrafa como fonte de carbono.

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R020	1,38	1,38	1,38	1,50	1,38
INPA R178	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R233	1,00	1,13	1,13	1,25	1,25
INPA R236	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R302	1,00	1,00	1,38	1,38	1,38
INPA R304	1,00	1,06	2,50	2,50	2,75
INPA R311	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R321	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R332	1,88	3,19	4,00	4,00	4,00
INPA R529	1,25	1,25	1,50	1,50	1,75

Tabela 22 - Crescimento de estirpes de rizobactérias em meio INPA sólido contendo manteiga de garrafa como fonte de carbono.

Isolados	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	15º dia
INPA R546	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R547	1,00	1,13	2,75	2,75	2,88
INPA R552	1,00	1,13	1,63	1,63	1,69
INPA R555	1,00	1,13	1,50	1,50	1,75
INPA R564	1,06	1,25	1,25	1,25	1,50
INPA R565	1,00	1,13	1,50	1,50	1,88
INPA R566	1,13	1,50	2,00	2,00	2,00
INPA R568	1,19	1,44	2,00	2,00	2,13
INPA R571	1,00	1,19	2,00	2,00	2,00
INPA R577	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R618	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R631	1,00	1,00	1,50	1,50	1,63
INPA R634	1,00	1,13	1,13	1,13	1,31
INPA R657	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INPA R666	1,00	1,38	1,38	1,38	1,44
INPA R672	1,06	1,25	1,25	1,25	1,38
INPA R674	1,06	1,25	1,25	1,25	1,50
INPA R675	2,13	3,13	4,00	4,00	4,00
INPA R677	2,00	3,13	4,00	4,00	4,00
INPA R713	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Com tudo, os resultados de crescimento utilizando o meio YMA permitiu selecionar 27 bactérias que atingiram notas elevadas (3,06 a 4,00) no terceiro dia de crescimento demonstrando com isso, que essas bactérias são potenciais degradadores de óleos e gorduras. As demais, que não foram selecionadas, mas apresentaram notas de crescimentos elevados e moderados após o sexto dia, e podem ser utilizadas formando consórcios em testes de biodegradação, pois até o 15º dia apresentaram crescimento significativo tanto com a fonte de carbono manitol, quanto com os óleos e gorduras.

O extrato de levedura, componente orgânico nitrogenado que possui quantidades de vitaminas essenciais para o melhor crescimento e biossíntese microbiana (Matsuura, 2004), não está presente meio INPA, o que pode dificultar o crescimento inicial das bactérias. Por isso, foram selecionadas 9 bactérias que atingiram notas elevadas (3,06 a 4,00) no sexto dia de crescimento. A capacidade adaptativa em um meio que contém macro e micronutrientes geralmente encontrados nos solos de um modo geral demonstra que essas bactérias são potenciais degradadores de óleos e gorduras. Na tabela 23 estão descritos o tempo de incubação necessário para as rizobactérias apresentarem crescimentos superiores a 3,00 segundo a metodologia de Oliveira e Magalhães (1999).

Esses dados são mais satisfatórios quando comparados com os descritos por Cáuper et al. (2017) ao avaliarem a capacidade de biodegradação de 15 isolados de rizóbios óleo de cozinha, utilizado em frituras, como fonte de carbono. Esses autores descreveram que ao 3º dia de crescimento os 15 isolados apresentaram pouco crescimento. Resultados semelhantes com a

utilização de bactérias na degradação de compostos oleosos derivados de petróleo também sendo demonstrados. Cerqueira et. al. (2011) descreveram que três bactérias isoladas a partir de lamas petroquímica oleosas, identificado como *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus cibi*, e duas bactérias isoladas de solo contaminado por resíduos petroquímicos, identificado como *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* demonstrado eficiência na degradação de borra oleosa quando cultivada durante 40 dias.

Tabela 23 – Tempos de incubação necessários para as rizobactérias apresentarem crescimentos superiores a 3,00 segundo a metodologia de Oliveira e Magalhães (1999).

Isolados	Óleo de Soja		Óleo de Girassol		Óleo de Milho		Óleo de Canola		Manteiga		Margarina	
	YMA	INPA	YMA	INPA	YMA	INPA	YMA	INPA	YMA	INPA	YMA	INPA
INPA R020	12º dia (3,75)	9º dia (3,50)	3º dia (4,00)	-------	9º dia (3,69)	6º dia (4,00)	9º dia (3,25)	-------	12º dia (3,50)	-------	9º dia (3,38)	-------
INPA R178	9º dia (3,63)	9º dia (3,44)	6º dia (3,56)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	15º dia (3,88)	-------	3º dia (4,00)	-------
INPA R233	3º dia (4,00)	-------	3º dia (3,88)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	6º dia (3,38)	-------	3º dia (3,63)	-------
INPA R236	12º dia (3,50)	-------	6º dia (3,56)	-------	6º dia (3,75)	-------	9º dia (4,00)	-------	12º dia (3,31)	-------	-------	-------
INPA R302	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	15º dia (4,00)	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------
INPA R304	3º dia (4,00)	9º dia (4,00)	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	9º dia (3,44)	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------
INPA R311	3º dia (4,00)	-------	6º dia (3,75)	9º dia (4,00)	6º dia (4,00)	-------	9º dia (4,00)	-------	6º dia (3,38)	-------	-------	-------
INPA R321	3º dia (4,00)	-------	9º dia (4,00)	9º dia (3,13)	3º dia (4,00)	-------	9º dia (4,00)	-------	15º dia (3,50)	-------	15º dia (3,50)	-------
INPA R332	3º dia (4,00)	9º dia (4,00)	3º dia (4,00)	9º dia (4,00)	3º dia (4,00)	6º dia (4,00)	3º dia (4,00)	3º dia (3,75)	3º dia (3,75)	3º dia (3,13)	3º dia (4,00)	6º dia (3,19)
INPA R529	3º dia (4,00)	9º dia (3,44)	6º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (3,25)	-------	3º dia (4,00)	-------
INPA R546	------- -------	9º dia (3,81)	3º dia (3,25)	15º dia (3,50)	12º dia (3,25)	-------	3º dia (4,00)	-------	12º dia (3,88)	-------	9º dia (3,06)	-------
INPA R547	3º dia (4,00)	9º dia (3,75)	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	15º dia (3,25)	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------
INPA R552	3º dia (4,00)	9º dia (4,00)	3º dia (4,00)	12º dia (3,13)	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	9º dia (3,63)	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------

Tabela 23 – Tempos de incubação necessários para as rizobactérias apresentarem crescimentos superiores a 3,00 segundo a metodologia de Oliveira e Magalhães (1999).

Isolados	Óleo de Soja		Óleo de Girassol		Óleo de Milho		Óleo de Canola		Manteiga		Margarina	
	YMA	INPA	YMA	INPA	YMA	INPA	YMA	INPA	YMA	INPA	YMA	INPA
INPA R555	6º dia (3,50)	9º dia (4,00)	6º dia (3,88)	-------	9º dia (3,75)	-------	3º dia (4,00)	9º dia (3,75)	6º dia (3,13)	-------	9º dia (4,00)	-------
INPA R564	6º dia (4,00)	9º dia (4,00)	6º dia (3,13)	9º dia (3,13)	6º dia (4,00)	15º dia (3,50)	9º dia (4,00)	-------	9º dia (3,06)	-------	9º dia (3,25)	-------
INPA R565	3º dia (4,00)	9º dia (3,50)	3º dia (3,75)	-------	3º dia (4,00)	15º dia (3,13)	3º dia (4,00)	-------	12º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------
INPA R566	3º dia (4,00)	3º dia (4,00)	3º dia (3,25)	6º dia (3,69)	3º dia (4,00)	6º dia (3,25)	3º dia (4,00)	3º dia (4,00)	3º dia (3,50)	-------	3º dia (4,00)	-------
INPA R568	6º dia (3,75)	9º dia (3,69)	9º dia (3,81)	6º dia (3,44)	6º dia (4,00)	-------	6º dia (3,63)	-------	9º dia (3,31)	6º dia (3,13)	9º dia (3,75)	-------
INPA R571	3º dia (4,00)	9º dia (4,00)	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------
INPA R577	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (3,75)	-------	3º dia (4,00)	-------
INPA R618	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	6º dia (3,38)	-------	3º dia (4,00)	-------
INPA R631	3º dia (4,00)	9º dia (4,00)	3º dia (4,00)	6º dia (3,13)	3º dia (4,00)	6º dia (4,00)	3º dia (3,13)	9º dia (4,00)	6º dia (3,50)	-------	3º dia (3,75)	-------
INPA R634	3º dia (4,00)	9º dia (3,38)	3º dia (4,00)	15º dia (3,06)	3º dia (4,00)	15º dia (4,00)	3º dia (4,00)	15º dia (3,13)	9º dia (3,19)	-------	9º dia (3,75)	-------
INPA R657	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------
INPA R666	3º dia (4,00)	9º dia (4,00)	3º dia (4,00)	9º dia (4,00)	3º dia (4,00)	15º dia (3,25)	3º dia (4,00)	9º dia (3,63)	3º dia (4,00)	-------	3º dia (4,00)	-------
INPA R672	3º dia (4,00)	3º dia (4,00)	3º dia (4,00)	3º dia (3,13)	3º dia (4,00)	6º dia (3,75)	3º dia (4,00)	3º dia (4,00)	12º dia (4,00)	6º dia (3,50)	3º dia (4,00)	-------

Tabela 23 – Tempos de incubação necessários para as rizobactérias apresentarem crescimentos superiores a 3,00 segundo a metodologia de Oliveira e Magalhães (1999).

Isolados	Óleo de Soja		Óleo de Girassol		Óleo de Milho		Óleo de Canola		Manteiga		Margarina	
	YMA	**INPA**	**YMA**	**INPA**	**YMA**	**INPA**	**YMA**	**INPA**	**YMA**	**INPA**	**YMA**	**INPA**
INPA R674	3º dia (4,00)	9º dia (4,00)	3º dia (4,00)	------- -------	3º dia (4,00)	------- -------	3º dia (4,00)	------- -------	6º dia (4,00)	------- -------	3º dia (4,00)	------- -------
INPA R675	3º dia (4,00)	9º dia (4,00)	3º dia (4,00)	6º dia (3,50)	3º dia (4,00)	6º dia (3,88)	3º dia (4,00)	3º dia (3,25)	3º dia (3,88)	------- -------	3º dia (4,00)	6º dia (3,13)
INPA R677	3º dia (4,00)	------- -------	3º dia (3,38)	6º dia (3,31)	3º dia (4,00)	6º dia (4,00)	3º dia (4,00)	9º dia (4,00)	6º dia (4,00)	6º dia (3,19)	3º dia (4,00)	6º dia (3,13)
INPA R713	3º dia (4,00)	9º dia (3,38)	3º dia (4,00)	6º dia (3,25)	3º dia (4,00)	------- -------	3º dia (4,00)	3º dia (4,00)	------- -------	------- -------	3º dia (4,00)	------- -------
Média de notas*	**3.80**	**2.66**	**3.84**	**1.71**	**3.95**	**1.58**	**3.93**	**1.50**	**3.55**	**0.43**	**3.60**	**0.32**

**apenas das bactérias que atingiram notas elevadas.*
***não houve crescimento no período de incubação para as amostras que possuem ------*

4.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO, UTILIZANDO O INDICADOR REDOX – DCPIP

Esse teste demonstra a capacidade de 27 rizobactérias, que foram previamente selecionadas no teste anterior, em utilizar hidrocarbonetos como substrato utilizando o indicador redox diclorofenol indofenol (DCPIP), observando a mudança de cor do azul (oxidado) para incolor (reduzido). Esta mudança oscila entre coloração total e descoloração total. A leitura desse teste foi realizada durante um período de seis dias em intervalos de 24 horas, onde foi observada a redução total do DCPIP. Com alguns isolados, nos diferentes derivados, essa redução ocorreu principalmente nos tempos de 24h, 48h e 72h. Após a oxidação total do DCPIP o meio volta a ficar azul novamente por ser um indicador reversível (Rao et al., 1987; Peixoto et al., 2018)

Nas tabelas 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30 são apresentadas as porcentagens de descoloração do DCPIP observadas nos meios com diferentes fontes de carbono, obtidas a partir de leituras de espectrofotômetro dos valores de concentração do indicador. Para efeito ilustrativo, na figura 21 mostra o teste com a coloração total do indicador DCPIP contendo alguns isolados com 72 horas de incubação.

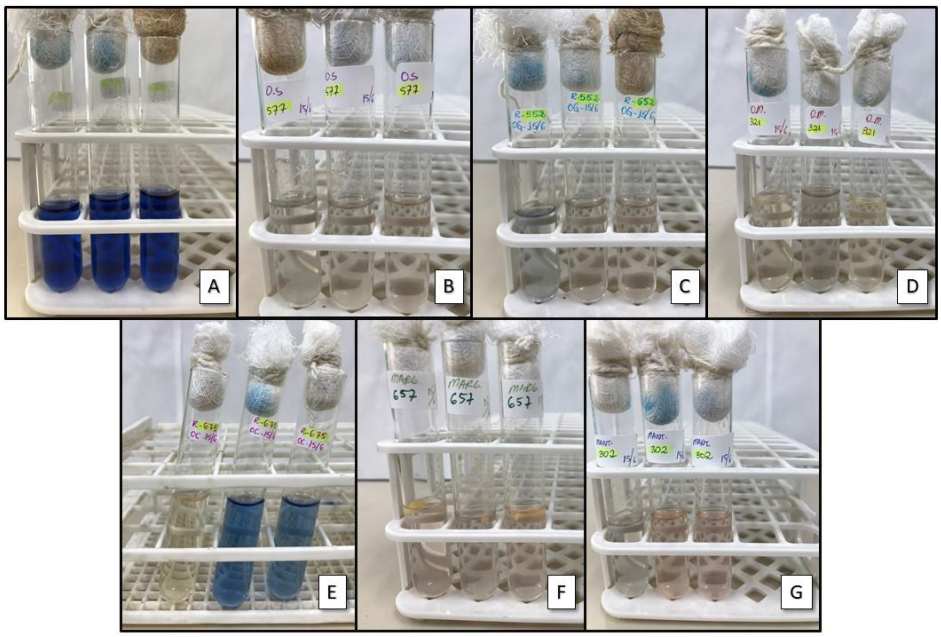


Figura 21 - Demonstração do teste de biodegradação, utilizando o indicador DCPIP, onde A é o controle sem descoloração do indicador; B óleo de soja com 72 horas de incubação; C óleo de girassol com 72 horas; D óleo milho com 72 horas; E óleo de canola com 72 horas; F margarina com 72 horas e F manteiga de garrafa com 72 horas.

Para a realização desse teste, foram utilizadas distintas fontes de carbono: manitol (M), óleo de soja (OS), óleo de girassol (OG), óleo de milho (OM), óleo de canola (OC), margarina (M) e manteiga de garrafa (MG). A tabela 24 mostra os resultados do percentual de degradação utilizando-se a fonte de carbono manitol, que com 24 horas de incubação o isolado INPA R677 apresentou o melhor percentual de descoloração (60%). Com 48 horas de incubação 11 isolados apresentaram degradação acima de 50%, e no período de 144 horas de incubação, 16 isolados três isolados apresentaram isolados apresentaram degradação igual ou acima de 60%. A Figura 22 mostra a média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YMA com manitol como fonte de carbono. Esse resultado é esperado, pois a fonte de carbono manitol é ideal para o crescimento desse microrganismo em laboratório.

Tabela 24 – Percentual de descoloração em meio YMA em relação ao controle sem inóculo.

Isolados	**% de descoloração de DCPIP ($mg.L^{-1}$)**						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Controle	0	0	0	0	0	0	0
INPA R020	25	29	90	90	89	66	84
INPA R178	30	39	89	90	88	45	72
INPA R233	25	19	19	18	19	28	26
INPA R302	20	18	19	21	20	13	29
INPA R304	7	16	42	67	61	39	69
INPA R311	19	18	87	90	90	82	64
INPA R321	23	21	90	91	85	88	75
INPA R332	22	7	13	10	12	63	75
INPA R529	11	14	25	27	39	53	84
INPA R546	11	9	62	65	90	72	60
INPA R547	5	10	18	11	15	28	28
INPA R552	15	17	23	20	19	29	24
INPA R555	15	10	27	42	90	89	74
INPA R565	19	11	22	14	12	11	21
INPA R566	10	7	64	89	91	87	89
INPA R571	15	10	15	19	13	26	14
INPA R577	22	20	48	92	91	84	32
INPA R618	8	11	20	19	21	35	23
INPA R631	3	6	15	1	14	15	9
INPA R634	13	11	20	12	12	11	20
INPA R657	19	18	28	22	22	30	20
INPA R666	2	38	90	91	89	88	84

Isolados	% de descoloração de DCPIP (mg.L^{-1})						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R672	12	23	44	65	88	88	63
INPA R674	27	28	69	89	90	88	82
INPA R675	7	6	64	91	91	90	71
INPA R677	1	60	50	49	52	60	62
INPA R713	22	19	84	91	90	88	81

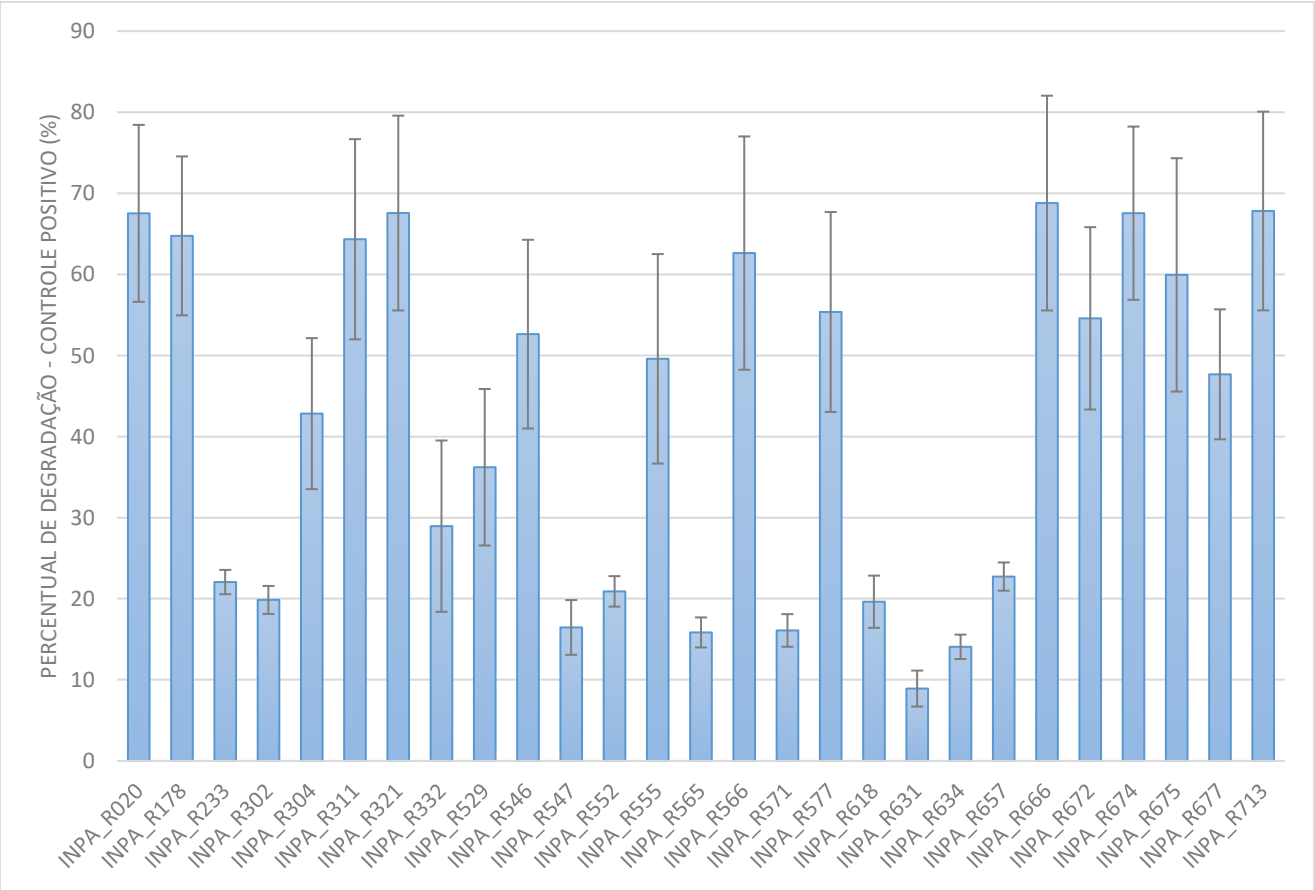


Figura 22 - Média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YMA com manitol como fonte de carbono.

4.5.1. Avaliação do potencial de degradação de óleo de soja, utilizando o indicador redox – DCPIP

No experimento contendo óleo de soja como fonte de carbono, no início da incubação (0 hora), os isolados INPA R233, INPA R302, INPA R304, INPA R321, INPA R547, INPA R565, INPA R577, INPA R666 e INPA R677 apresentaram percentual de descolorações variando entre 14 e 28%. Os microrganismos INPA R233, INPA R565,

INPA R577 e INPA R666 apresentaram as maiores porcentagens de descoloração, entre 27% e 34%, após 24 horas. E após 48 horas, os microrganismos INPA R020, INPA R302, INPA R311, INPA R321, INPA R566, INPA R577 e INPA R666 apresentaram seus picos de descoloração entre 80 e 90%. Entretanto, os isolados com os menores percentuais de descoloração ao longo de 144 horas foram INPA R631 e INPA R657, variando entre 2 e 25% (Tabela 25).

Nesta fonte de carbono, foram selecionadas nove bactérias que apresentaram resultados positivos: INPA 020, INPA 302, INPA 311, INPA 321, INPA R332, INPA 566, INPA 577, INPA 666 e INPA R674. A Figura 23 mostra a média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido com óleo de soja como fonte de carbono.

Tabela 25 – Percentual de descoloração em meio YM acrescido com óleo de soja, em relação ao controle sem inóculo.

Isolados	**% de descoloração de DCPIP (mg.L^{-1})**						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Controle	0	0	0	0	0	0	0
INPA R020	8	11	87	55	56	41	22
INPA R178	1	3	45	53	64	46	17
INPA R233	26	21	44	33	29	39	22
INPA R302	15	21	88	70	61	45	44
INPA R304	23	2	54	48	58	61	39
INPA R311	4	1	83	74	47	39	31
INPA R321	21	0	88	53	24	37	13
INPA R332	3	9	44	83	72	42	17
INPA R529	4	11	46	6	10	23	1
INPA R546	6	1	54	53	69	54	15
INPA R547	15	16	33	12	36	22	3
INPA R552	10	3	57	55	72	58	14
INPA R555	8	3	57	55	74	66	6
INPA R565	28	13	41	21	16	44	10
INPA R566	6	22	88	71	53	39	23
INPA R571	10	37	39	52	37	17	4
INPA R577	28	24	89	82	63	54	24
INPA R618	10	14	35	7	10	20	0
INPA R631	5	16	20	3	4	21	2
INPA R634	3	19	33	3	0	13	1
INPA R657	4	19	13	19	12	25	2
INPA R666	28	25	88	75	51	49	31

Isolados	% de descoloração de DCPIP (mg.L^{-1})						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R672	2	50	36	46	55	25	14
INPA R674	10	32	35	30	83	48	18
INPA R675	7	34	50	28	35	23	2
INPA R677	24	30	19	22	16	31	14
INPA R713	10	29	79	77	37	48	18

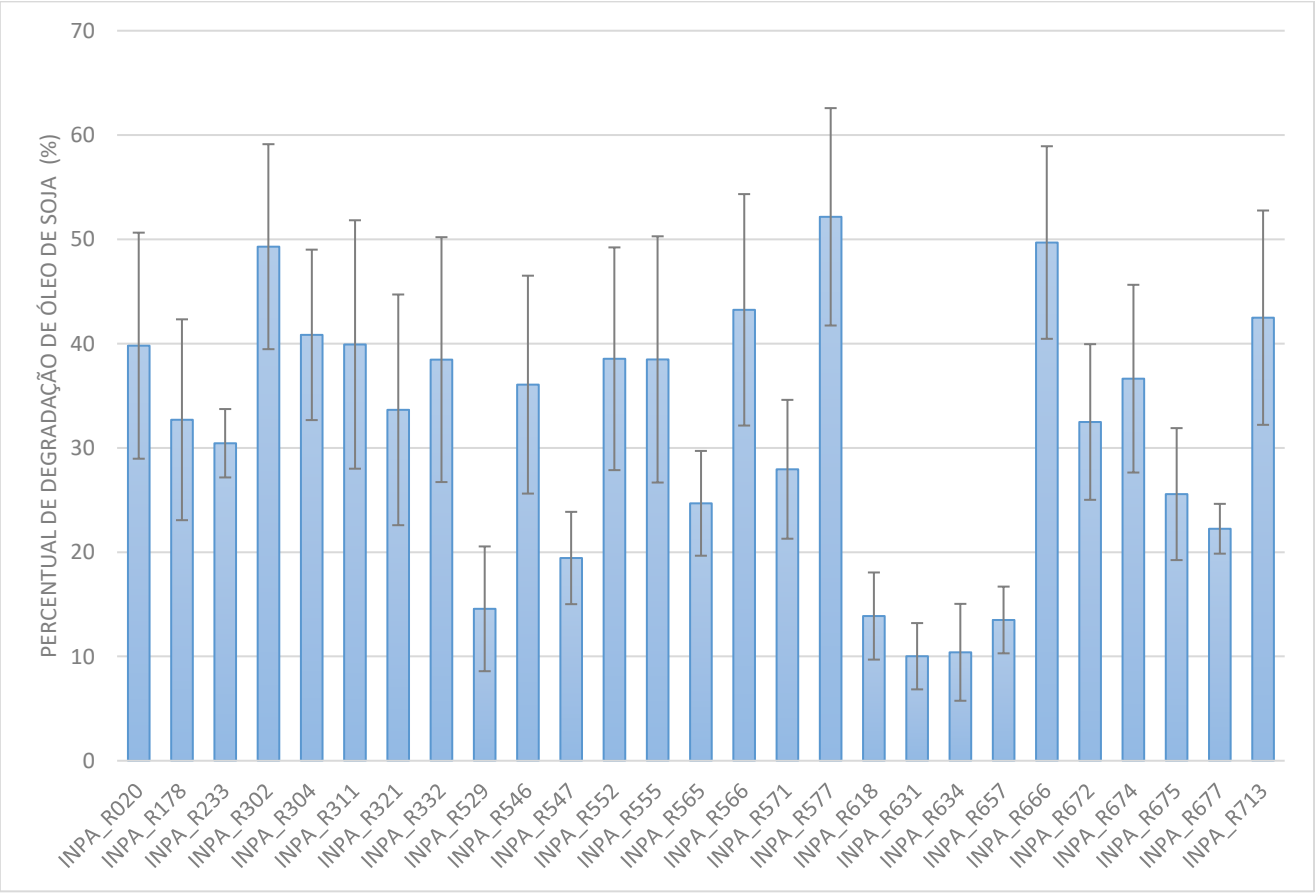


Figura 23 – Média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido de óleo de soja como fonte de carbono.

4.5.2. Avaliação do potencial de degradação de óleo de girassol, utilizando o indicador redox – DCPIP

No experimento contendo óleo de girassol como fonte de carbono, no início da incubação (0 hora), 19 isolados já apresentaram percentual de descolorações variando entre 12 e 48%, (INPA R020, INPA R178, INPA R233, INPA R302, INPA R304, INPA 311, INPA R321, INPA R332, INPA R529, INPA R546, INPA R547, INPA R552, INPA R555,

INPA R571, INPA R577, INPA R631, INPA R666, NPA R675, e INPA R713). Os microrganismos INPA R020, INPA R233, INPA R302, INPA R311, INPA R321, INPA R332, INPA R529, INPA R547, INPA R552, INPA R555, e INPA R672 apresentaram as maiores porcentagens de descoloração, entre 28% e 57%, após 24 horas. E após 48 horas, os microrganismos INPA R302, INPA R311, INPA R321, INPA R332, INPA R552 e INPA R555 apresentaram seus picos de descoloração entre 80 e 90%. Entretanto, os isolados com os menores percentuais de descoloração ao longo de 144 horas foram INPA R565, INPA R571, INPA R618, INPA R634 e INPA R672, variando entre 1 e 25% (Tabela 25).

Nesta fonte de carbono, foram selecionadas oito bactérias que apresentaram resultados positivos: INPA R302, INPA R304, INPA R311, INPA R321, INPA R332, INPA R552, INPA R555 e INPA R566. A Figura 24, monstra a média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido com óleo de girassol como fonte de carbono.

Tabela 26 – Percentual de descoloração em meio YM acrescido com óleo de girassol, em relação ao controle sem inóculo.

Isolados	**% de descoloração de DCPIP (mg.L^{-1})**						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Controle	0	0	0	0	0	0	0
INPA R020	35	57	78	59	55	58	41
INPA R178	31	12	68	68	42	68	54
INPA R233	42	34	38	32	36	49	23
INPA R302	36	48	86	73	55	63	49
INPA R304	48	11	65	79	74	71	69
INPA R311	27	37	82	81	62	57	98
INPA R321	36	31	82	61	35	48	27
INPA R332	43	35	87	86	73	65	44
INPA R529	42	53	62	43	37	46	29
INPA R546	21	24	63	59	51	37	26
INPA R547	30	47	52	20	21	37	15
INPA R552	37	42	87	87	49	54	41
INPA R555	32	49	89	86	71	62	56
INPA R565	5	11	10	3	0	2	0
INPA R566	1	9	50	86	25	25	2
INPA R571	12	19	21	3	2	11	1
INPA R577	12	15	9	2	22	56	57
INPA R618	1	10	9	10	0	8	1
INPA R631	12	12	21	8	2	29	59

Isolados	% de descoloração de DCPIP (mg.L^{-1})						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R634	11	3	23	1	1	23	0
INPA R657	4	9	30	3	2	8	1
INPA R666	19	16	48	61	52	32	6
INPA R672	9	28	25	7	5	15	2
INPA R674	4	20	22	0	0	29	2
INPA R675	12	9	47	37	12	39	5
INPA R677	7	13	5	1	1	18	0
INPA R713	17	19	8	65	41	33	2

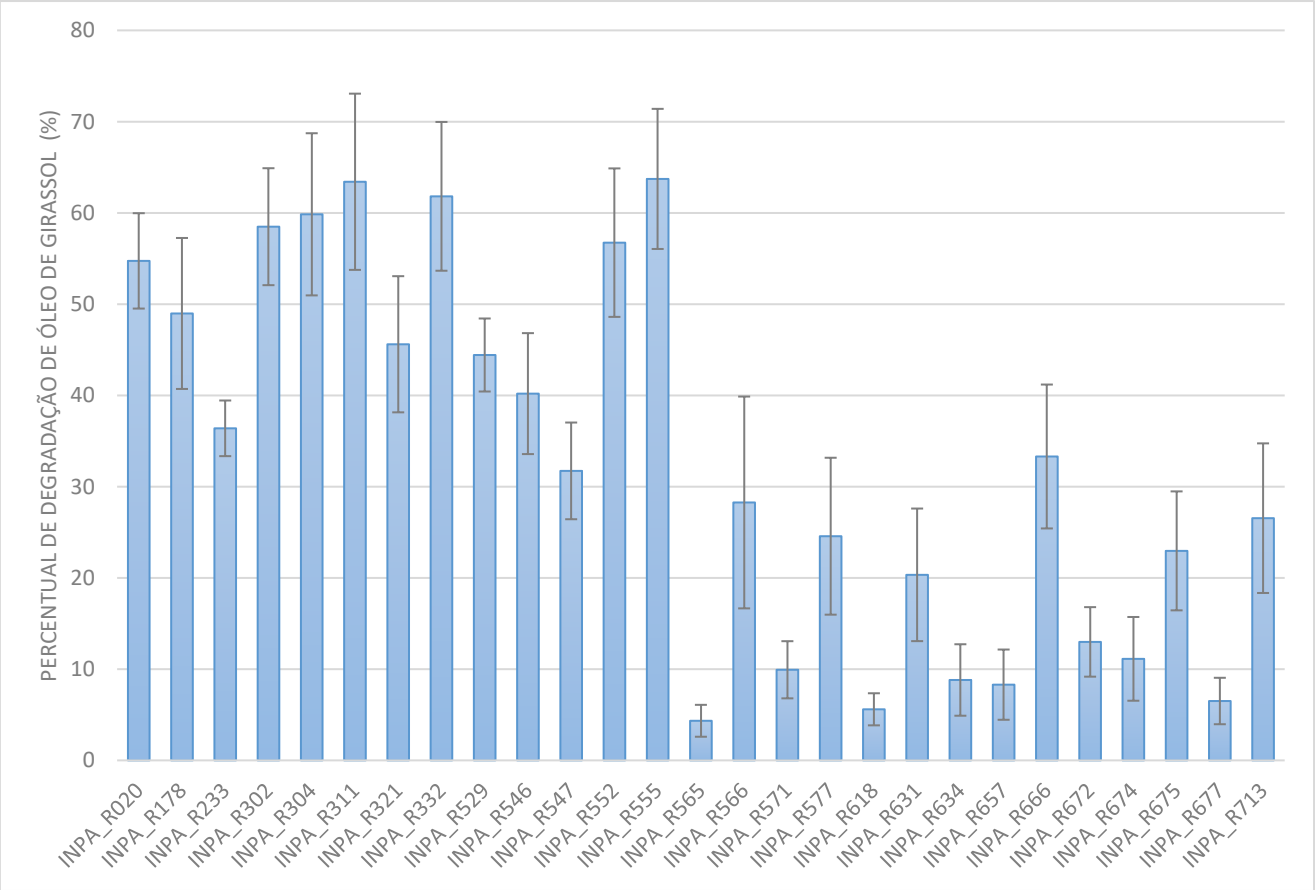


Figura 24 – Média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido de óleo de girassol como fonte de carbono.

4.5.3. Avaliação do potencial de degradação de óleo de milho, utilizando o indicador redox – DCPIP

No experimento contendo óleo de milho como fonte de carbono, no início da incubação (0 hora), dentre os 27 isolados testados, apenas seis não apresentaram percentual

de descolorações variando entre 12 e 48%, (INPA R311, INPA R332, INPA R529, INPA R631, INPA R666 e INPA R677). Os microrganismos INPA R020, INPA R302, INPA R304, INPA R321, INPA R547, INPA R565, INPA R566, INPA R618, INPA R634 e INPA R674 apresentaram as maiores porcentagens de descoloração, entre 26% e 85%, após 24 horas. E após 48 horas, os microrganismos INPA R020, INPA R311, INPA R321, INPA R555, INPA R566, INPA R571, INPA R666 e INPA R672 apresentaram seus picos de descoloração acima de 80%. Entretanto, o isolados INPA R631 apresentou os menores percentuais de descoloração ao longo de 144 horas, variando entre 1 e 20% (Tabela 27).

Nesta fonte de carbono, foram selecionadas 13 bactérias que apresentaram resultados positivos: INPA R020, INPA R178, INPA R302, INPA R311, INPA R321, INPA R546, INPA R552, INPA R555, INPA R566, INPA R571, INPA R666, INPA R672 e INPA R674. A Figura 25, monstra a média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido com óleo de milho como fonte de carbono.

Tabela 27 – Percentual de descoloração em meio YM acrescido com óleo de milho, em relação ao controle sem inóculo.

Isolados	**% de descoloração de DCPIP (mg.L^{-1})**						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Controle	0	0	0	0	0	0	0
INPA R020	37	85	87	78	53	76	52
INPA R178	28	13	59	87	77	63	42
INPA R233	23	17	35	34	6	46	12
INPA R302	21	57	80	83	55	59	60
INPA R304	33	33	59	77	69	78	71
INPA R311	1	1	81	86	60	45	25
INPA R321	29	33	80	76	35	48	34
INPA R332	3	8	69	71	66	60	31
INPA R529	3	7	35	57	23	44	16
INPA R546	17	19	58	80	72	51	33
INPA R547	34	26	36	43	21	38	26
INPA R552	18	18	59	84	56	38	41
INPA R555	27	18	81	86	53	48	36
INPA R565	38	28	47	51	26	48	38
INPA R566	21	38	83	78	40	40	41
INPA R571	31	22	82	84	68	61	56
INPA R577	21	25	54	58	42	44	36
INPA R618	30	26	27	49	27	46	40
INPA R631	8	1	20	16	0	14	0
INPA R634	28	28	43	67	65	71	49

Isolados	% de descoloração de DCPIP (mg.L^{-1})						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R657	26	11	1	25	9	26	30
INPA R666	3	1	86	69	27	21	24
INPA R672	26	25	84	84	66	50	53
INPA R674	28	33	66	84	74	56	45
INPA R675	16	22	74	45	26	44	40
INPA R677	1	0	34	77	64	36	23
INPA R713	15	5	46	52	40	30	26

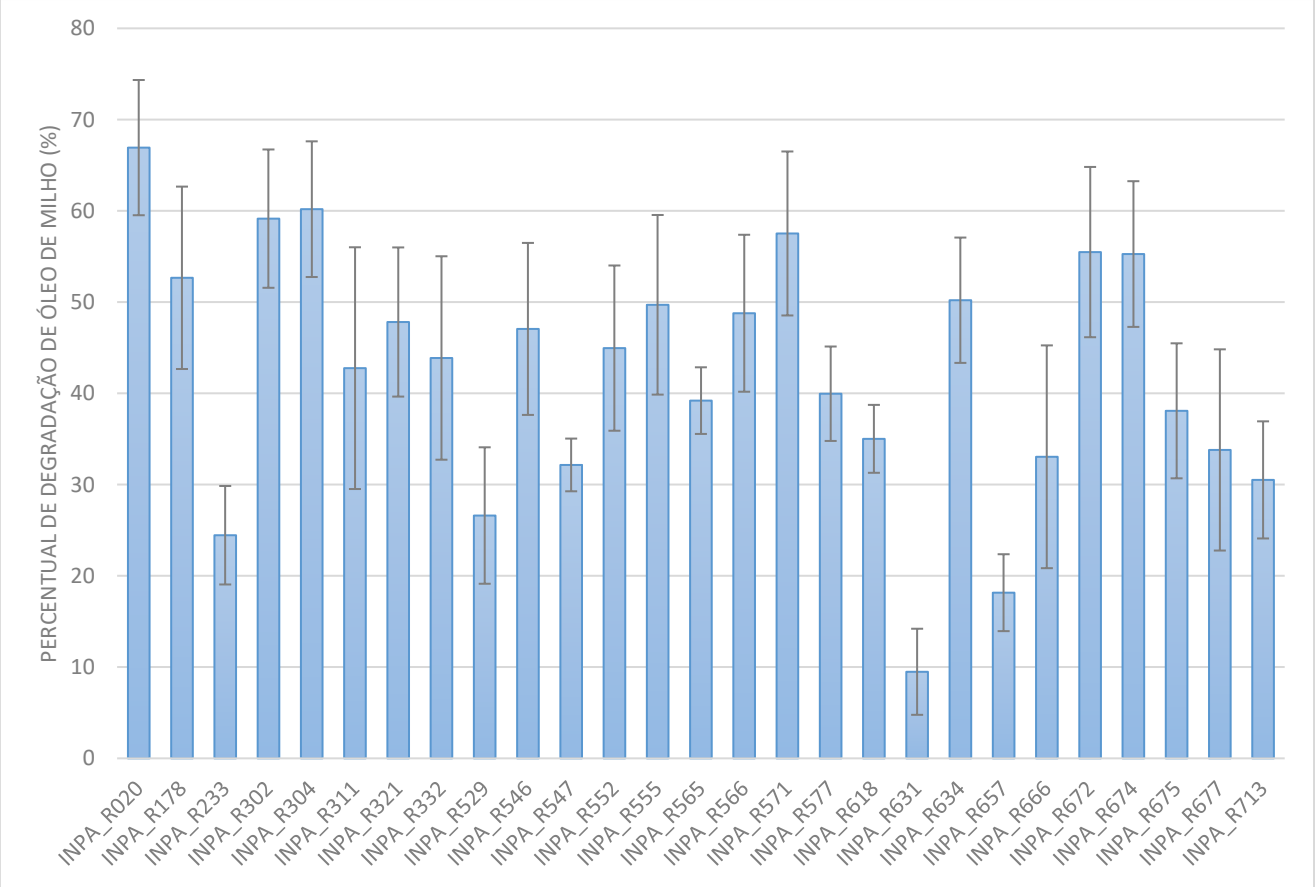


Figura 25 – Média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido de óleo de milho como fonte de carbono.

4.5.4. Avaliação do potencial de degradação de óleo de canola, utilizando o indicador redox – DCPIP

No experimento contendo óleo de canola como fonte de carbono, no início da incubação (0 hora), 17 isolados apresentaram percentual de descolorações variando entre 12 e 56%, (INPA R178, INPA R233, INPA R304, INPA R529, INPA R547, INPA R552, INPA

R555, INPA R565, INPA R566, INPA R571, INPA R577, INPA R631, INPA R672, INPA R674, INPA R675, INPA R677 e INPA R713). Após 24 horas de incubação, apenas seis isolados apresentaram percentual de descoloração superiores a 24% (INPA R565, INPA R566, INPA R674, INPA R675, INPA R677 e INPA R713), e com 48 horas de incubação apenas INPA R566, INPA R674 e INPA R713 apresentaram seus picos de descoloração acima de 80%. Em contrapartida, os isolados INPA R332, INPA R618, INPA R634 e INPA R657 apresentaram os menores percentuais de descoloração ao longo de 144 horas, variando entre 1 e 13% (Tabela 28).

Nesta fonte de carbono, foram selecionadas seis bactérias que apresentaram resultados positivos: INPA R302, INPA R566, INPA R577, INPA R674, INPA R675 e INPA R713. A Figura 26 mostra a média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido com óleo de canola como fonte de carbono.

Tabela 28 – Percentual de descoloração em meio YM acrescido com óleo de canola, em relação ao controle sem inóculo.

Isolados	**% de descoloração de DCPIP (mg.L^{-1})**						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Controle	0	0	0	0	0	0	0
INPA R020	9	18	13	39	40	11	18
INPA R178	27	12	14	6	0	2	20
INPA R233	23	10	13	2	0	16	13
INPA R302	8	5	26	66	80	17	9
INPA R304	15	11	14	34	38	26	25
INPA R311	11	11	69	60	15	12	28
INPA R321	8	7	57	52	10	31	11
INPA R332	10	6	2	0	1	13	6
INPA R529	13	12	6	5	3	6	3
INPA R546	3	7	12	11	1	7	4
INPA R547	14	5	13	5	2	2	3
INPA R552	21	13	12	34	29	21	26
INPA R555	12	9	33	28	49	21	3
INPA R565	25	25	28	23	21	14	19
INPA R566	22	43	83	81	33	32	40
INPA R571	26	24	51	60	45	35	40
INPA R577	21	17	45	89	57	23	27
INPA R618	5	2	5	2	6	1	3
INPA R631	17	10	31	26	30	18	11
INPA R634	2	7	2	3	5	1	10

Isolados	% de descoloração de DCPIP (mg.L^{-1})						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R657	5	6	1	4	1	0	1
INPA R666	11	10	14	32	43	43	18
INPA R672	12	9	6	2	0	8	6
INPA R674	56	78	89	89	69	57	61
INPA R675	48	84	77	62	51	53	56
INPA R677	35	35	60	52	45	43	46
INPA R713	46	56	90	80	44	55	47

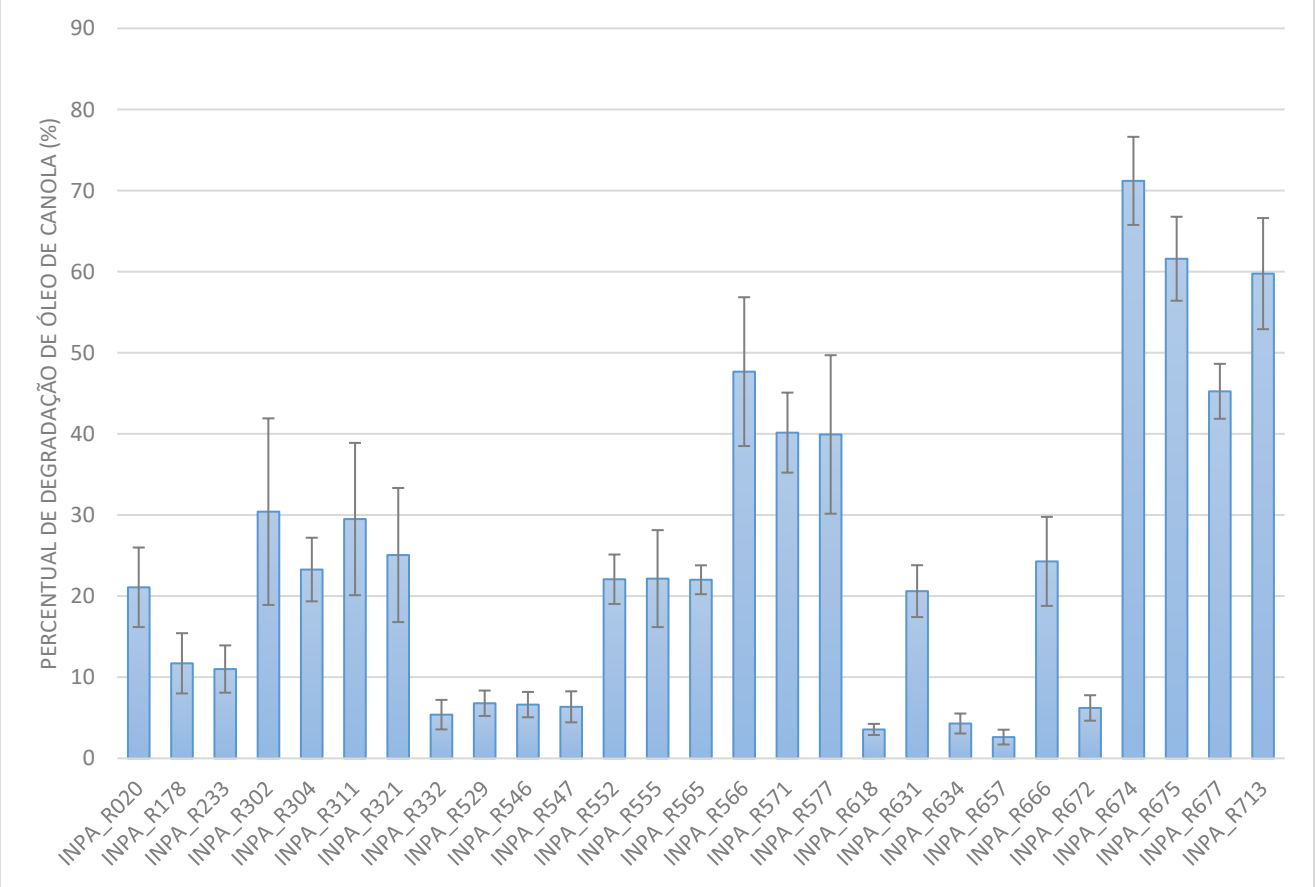


Figura 26 – Médias e desvios padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido de óleo de canola como fonte de carbono.

4.5.5. Avaliação do potencial de degradação de margarina, utilizando o indicador redox – DCPIP

No experimento contendo margarina como fonte de carbono, no início da incubação (0 hora), observou-se que dentre todos os 27 isolados, apenas o INPA R178 apresentou percentual de descolorações inferior a 19%, e após 24 horas de incubação, 17 isolados

apresentaram percentual de descoloração superiores a 24% (INPA R020, INPA R178, INPA R233, INPA R302, INPA R304, INPA R311, INPA R546, INPA R547, INPA R565, INPA R566, INPA R571, INPA R577, INPA R618, INPA R631, INPA R634, INPA R657 e INPA R677). Com 48 horas de incubação apenas INPA R020, INPA R302, INPA R311 e INPA R577 apresentaram seus picos de descoloração acima de 80%. Em contrapartida, apenas o isolado INPA R529 apresentou percentuais de descoloração inferiores a 20% ao longo de 144 horas (Tabela 29).

Nesta fonte de carbono, foram selecionadas 13 bactérias que apresentaram resultados positivos: INPA R020, INPA R302, INPA R311, INPA R321, INPA R546, INPA R565, INPA R566, INPA R571, INPA R577, INPA R634, INPA R657, INPA R666 e INPA R674. A Figura 27, mostra a média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido com óleo de canola como fonte de carbono.

Tabela 29 – Percentual de descoloração em meio YM acrescido com margarina, em relação ao controle sem inóculo.

Isolados	**% de descoloração de DCPIP (mg.L^{-1})**						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Controle	0	0	0	0	0	0	0
INPA R020	33	42	86	71	40	46	55
INPA R178	12	26	40	45	78	72	54
INPA R233	30	35	33	37	35	38	52
INPA R302	49	32	87	88	75	58	60
INPA R304	30	41	43	58	77	77	66
INPA R311	33	35	84	84	67	45	61
INPA R321	23	15	65	83	57	49	43
INPA R332	25	18	34	23	60	61	69
INPA R529	19	15	9	11	7	4	17
INPA R546	42	32	41	32	85	83	67
INPA R547	34	27	29	31	55	22	36
INPA R552	24	13	23	13	64	51	51
INPA R555	37	24	55	7	68	40	43
INPA R565	45	37	42	1	62	60	81
INPA R566	21	25	41	88	84	70	50
INPA R571	39	33	37	26	82	87	78
INPA R577	43	37	87	78	90	87	75
INPA R618	33	27	28	25	55	31	44
INPA R631	23	26	21	24	35	30	46
INPA R634	34	31	43	32	87	89	82
INPA R657	41	32	56	6	90	89	89

Isolados	% de descoloração de DCPIP (mg.L^{-1})						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R666	25	18	46	90	82	63	50
INPA R672	19	15	19	76	36	41	47
INPA R674	36	23	58	90	81	70	60
INPA R675	29	23	57	32	37	35	48
INPA R677	52	38	34	62	25	31	63
INPA R713	32	20	76	8	52	44	50

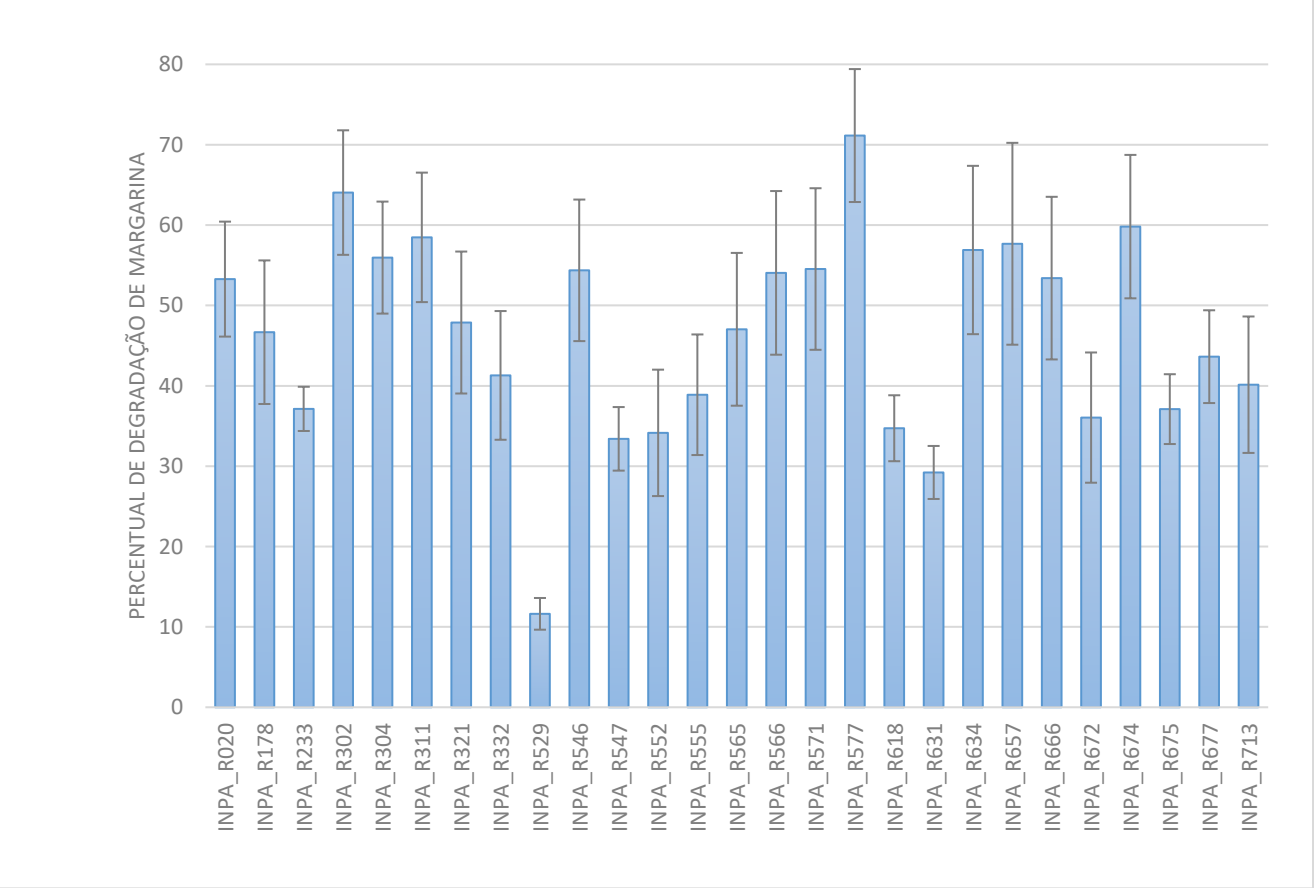


Figura 27 – Média e desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido de margarina como fonte de carbono.

4.5.6. Avaliação do potencial de degradação de manteiga de garrafa, utilizando o indicador redox – DCPIP

No experimento contendo margarina como fonte de carbono, no início da incubação (0 hora), dentre todos os 27 isolados, apenas INPA R321 e INPA R713 apresentaram

percentual de descolorações inferior a 12%, e após 24 horas de incubação, todos os isolados apresentaram percentual de descoloração superiores a 26%. Com 48 horas de incubação os isolados INPA R020 e INPA R666 atingiram seus picos de descoloração acima de 80%. Em contrapartida, apenas os isolados INPA R565, INPA R657 e INPA R713 apresentaram percentuais de descoloração inferiores a 33% ao longo de 144 horas (Tabela 30).

Nesta fonte de carbono foram selecionadas oito bactérias que apresentaram resultados positivos: INPA R020, INPA R302, INPA R311, INPA R321, INPA R566, INPA R666, INPA R672 e INPA R674. A Figura 28, mostra a média e o desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido com manteiga de garra como fonte de carbono.

Tabela 30 – Percentual de descoloração em meio YM acrescido com manteiga de garrafa, em relação ao controle sem inóculo.

Isolados	**% de descoloração de DCPIP ($mg.L^{-1}$)**						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Controle	0	0	0	0	0	0	0
INPA R020	54	75	89	71	60	69	67
INPA R178	46	28	40	46	62	70	55
INPA R233	53	44	39	38	45	35	43
INPA R302	40	26	40	88	77	48	39
INPA R304	40	27	35	58	58	64	47
INPA R311	36	32	79	84	73	47	35
INPA R321	8	49	39	83	43	38	16
INPA R332	38	26	10	24	43	25	38
INPA R529	25	27	5	11	31	2	5
INPA R546	23	32	9	32	47	58	17
INPA R547	40	49	19	31	31	22	24
INPA R552	48	39	15	13	44	12	3
INPA R555	27	40	6	8	29	20	2
INPA R565	13	32	4	2	11	25	0
INPA R566	32	42	23	88	54	42	15
INPA R571	44	38	21	26	30	24	9
INPA R577	35	36	26	78	62	38	12
INPA R618	47	37	21	26	33	17	14
INPA R631	29	43	21	25	15	14	7
INPA R634	22	26	5	33	53	38	14
INPA R657	21	32	6	7	19	8	0
INPA R666	40	44	80	90	63	42	32
INPA R672	51	53	54	76	85	75	62

Isolados	% de descoloração de DCPIP (mg.L^{-1})						
	1 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R674	51	55	64	90	70	61	66
INPA R675	31	43	33	33	26	22	7
INPA R677	29	42	34	62	61	42	38
INPA R713	10	31	17	9	11	14	17

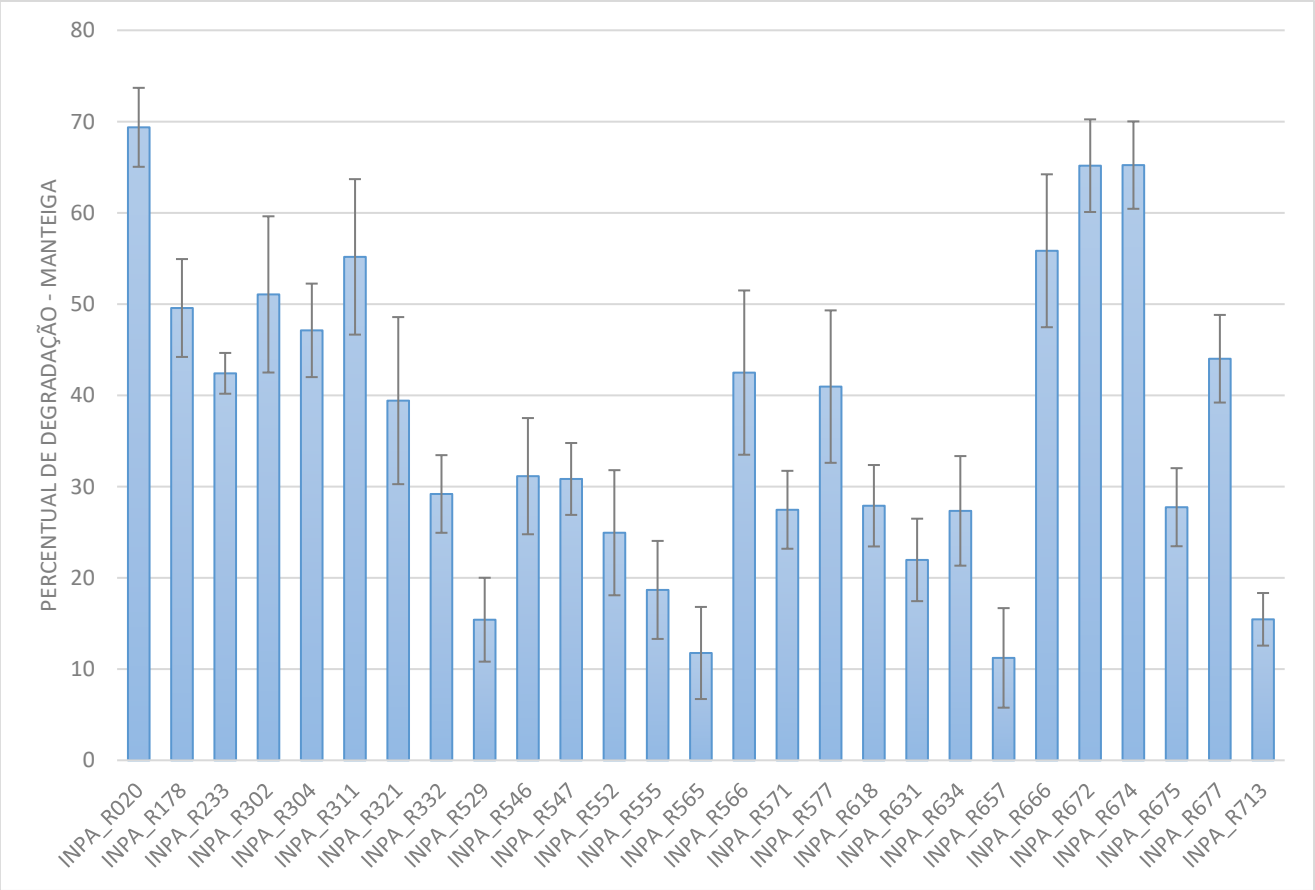


Figura 28 – Média e desvio padrão para o percentual de degradação entre os microrganismos no meio YM acrescido de manteiga de garrafa como fonte de carbono.

4.5.7. Avaliação do potencial de degradação utilizando o indicador redox – DCPIP após a primeira hora de incubação

O percentual de degradação de todos os óleos e gorduras, utilizando o indicador redox – DCPIP, foi medido após a primeira hora de incubação. Podemos verificar que, com uma hora de incubação, os indivíduos INPA R020, INPA R233, INPA R304 e INPA R674 apresentaram os melhores percentuais de degradação, variando entre 28% e 30%, assim como os microrganismos INPA R529, INPA R566, INPA R361 e INPA R634 apresentaram os

menores percentuais de degradação, variando entre 14% e 17% (Tabela 31 e Figura 29). Mesmo com valores de percentual de degradação atingindo no máximo 30%, estes microrganismos já demonstram a capacidade de degradação desses óleos e gorduras já na primeira hora de incubação.

Tabela 31 – Percentual de descoloração de cada microrganismo em meio YM acrescido com as diferentes fontes de carbono após a primeira hora de incubação

Isolados	% de descoloração de DCPIP ($mg.L^{-1}$)						
	Controle	**Soja**	**Girassol**	**Milho**	**Canola**	**Margarina**	**Manteiga**
INPA R020	25	8	35	37	9	33	54
INPA R178	30	1	31	28	27	12	46
INPA R233	25	26	42	23	23	30	53
INPA R302	20	15	36	21	8	49	40
INPA R304	7	23	48	33	15	30	40
INPA R311	19	4	27	1	11	33	36
INPA R321	23	21	36	29	8	23	8
INPA R332	22	3	43	3	10	25	38
INPA R529	11	4	42	3	13	19	25
INPA R546	11	6	21	17	3	42	23
INPA R547	5	15	30	34	14	34	40
INPA R552	15	10	37	18	21	24	48
INPA R555	15	8	32	27	12	37	27
INPA R565	19	28	5	38	25	45	13
INPA R566	10	6	1	21	22	21	32
INPA R571	15	10	12	31	26	39	44
INPA R577	22	28	12	21	21	43	35
INPA R618	8	10	1	30	5	33	47
INPA R631	3	5	12	8	17	23	29
INPA R634	13	3	11	28	2	34	22
INPA R657	19	4	4	26	5	41	21
INPA R666	2	28	19	3	11	25	40
INPA R672	12	2	9	26	12	19	51
INPA R674	27	10	4	28	56	36	51
INPA R675	7	7	12	16	48	29	31
INPA R677	1	24	7	1	35	52	29
INPA R713	22	10	17	15	46	32	10

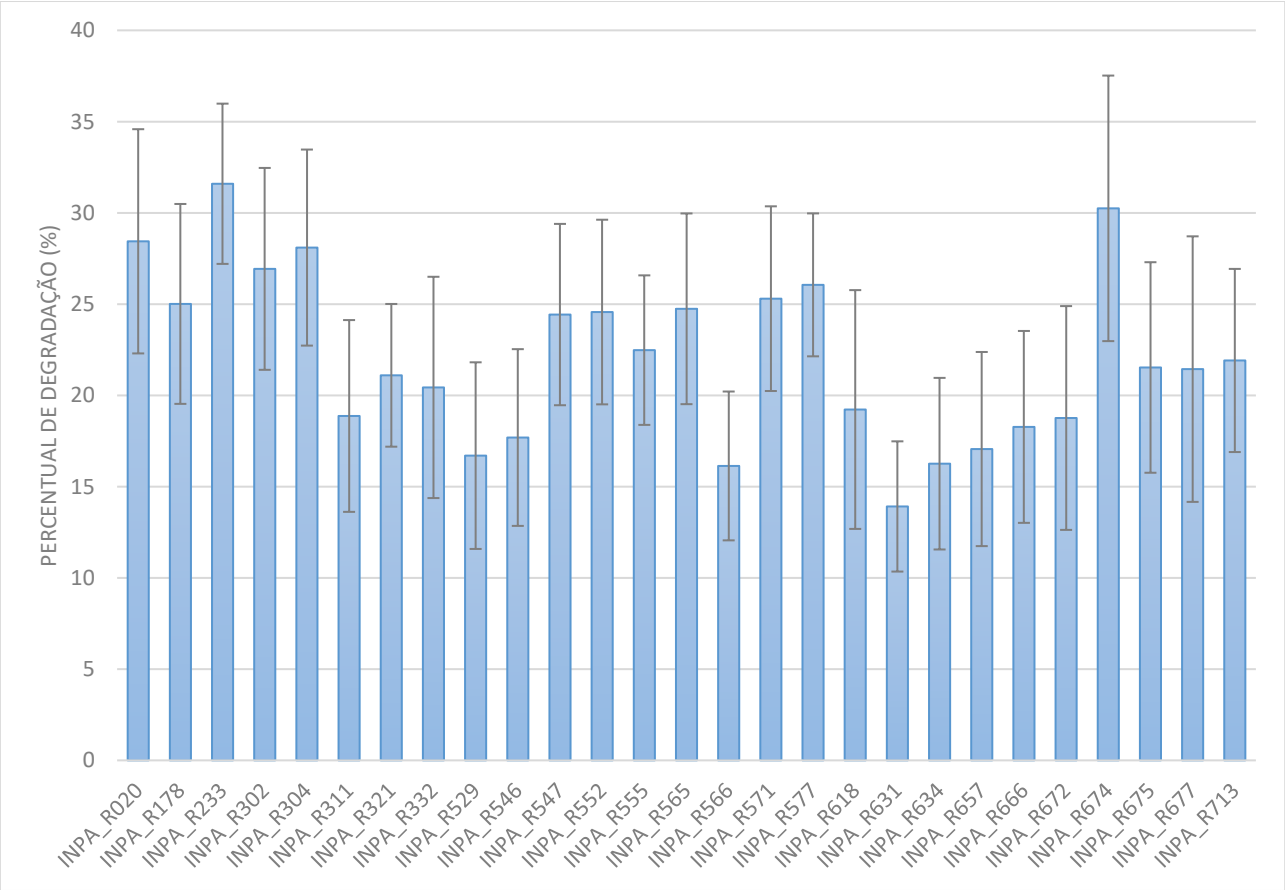


Figura 29 – Médias e desvios padrão para o percentual de degradação de cada microrganismo de cada fonte de carbono após a primeira hora de incubação.

4.5.8. Avaliação visual de descoloração do indicador redox – DCPIP

Além da avaliação do percentual de degradação obtidos por meio das leituras de espectrofotômetro, foi realizada ainda uma avaliação visual da descoloração do indicador redox diclorofenol indofenol (DCPIP), onde esta mudança oscila entre coloração total e descoloração total (BIDOIA et al., 2010).

Quando submetidos a fontes de carbono distintas (manitol, óleo de soja, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de canola, margarina e manteiga de garrafa), apresentaram diferenças significativas entre os isolados e entre os tempos estudados (24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas).

A tabela 32 mostra os resultados de descoloração visual utilizando-se a fonte de carbono manitol (açúcar utilizado tradicionalmente para o crescimento destes microrganismos), que com 48 horas de incubação ocorreu uma descoloração quase total

na amostra contendo o isolado INPA R713 e descoloração total nas INPA R020, INPA R178, INPA R311, INPA R321, INPA R546, INPA R566, INPA R577, INPA 666, INPA R674 e INPA R675. Após 72 horas de incubação ocorreu uma descoloração quase total na amostra contendo o isolado INPA R304 e descoloração total nas INPA R020, INPA R178, INPA R311, INPA R321 e INPA 666. Com 120 horas de incubação, 13 isolados apresentaram descoloração total. Esse resultado é esperado, pois a fonte de carbono manitol é ideal para o crescimento desse micro-organismo em laboratório.

Tabela 32 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e o manitol como fonte de carbono em meio líquido

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R020	1	5	5	5	5	4
INPA R178	1	5	5	5	5	3
INPA R233	1	1	1	1	1	1
INPA R302	1	1	1	1	1	1
INPA R304	1	1	4	4	5	4
INPA R311	1	5	5	5	5	2
INPA R321	1	5	5	5	5	1
INPA R332	1	1	1	1	4	1
INPA R529	1	1	1	3	2	1
INPA R546	1	5	4	5	5	1
INPA R547	1	1	1	1	1	1
INPA R552	1	1	1	1	1	1
INPA R555	1	1	2	5	5	1
INPA R565	1	1	1	1	1	1
INPA R566	1	5	5	5	5	1
INPA R571	1	1	1	1	1	1
INPA R577	1	2	5	5	5	4
INPA R618	1	1	1	1	1	1
INPA R631	1	1	1	1	1	1
INPA R634	1	1	1	1	1	1
INPA R657	1	1	1	1	1	1
INPA R666	1	5	5	5	5	1
INPA R672	1	2	4	4	5	1
INPA R674	1	5	5	5	5	1
INPA R675	1	5	5	5	2	1
INPA R677	3	2	2	2	1	1
INPA R713	1	4	5	5	5	2

Observação: Nota: 1 – Coloração Total; 2 – Início da Descoloração; 3 – Descoloração Parcial; 4 – Descoloração Quase Total e 5 – Descoloração Total.

4.5.9. Avaliação visual da descoloração do indicador redox – DCPIP em óleo de soja.

Apenas a INPA R666 apresentou índice de descoloração parcial após 24 hora de incubação. Um dado relevante foi que com 48 horas de incubação, os números de amostras com descoloração quase total chegaram muito próximos ao controle (INPA

R713), assim como os números de amostras com descoloração total (INPA R302, INPA R311, INPA R321, INPA R566, INPA R577 e INPA R666). Um total de 7 isolados foram selecionados pois atingiram, até seis dias, a nota máxima de descoloração (INPA R302, INPA R311, INPA R321, INPA R 332, INPA R566, INPA R577 e INPA R666**)** conforme mostra a Tabela 33.

Tabela 33 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e óleo de soja como fonte de carbono em meio líquido.

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R020	1	4	3	2	1	1
INPA R178	1	2	4	4	2	1
INPA R233	1	1	2	2	1	1
INPA R302	1	5	5	4	1	1
INPA R304	1	2	3	4	4	5
INPA R311	1	5	5	3	1	1
INPA R321	1	5	4	1	1	1
INPA R332	1	1	5	4	1	1
INPA R529	1	1	1	1	1	1
INPA R546	1	1	4	4	2	1
INPA R547	1	1	1	1	1	1
INPA R552	1	1	3	4	1	1
INPA R555	1	2	4	4	3	1
INPA R565	1	1	1	1	1	1
INPA R566	1	5	5	3	1	1
INPA R571	1	1	4	3	1	1
INPA R577	2	5	5	3	1	1
INPA R618	1	1	1	1	1	1
INPA R631	1	1	1	1	1	1
INPA R634	1	1	1	1	1	1
INPA R657	1	1	1	1	1	1
INPA R666	3	5	5	2	1	1
INPA R672	1	2	3	3	1	1
INPA R674	1	2	2	4	2	1
INPA R675	1	3	2	2	1	1
INPA R677	1	1	1	1	1	1
INPA R713	2	4	4	2	1	1

Observação: Nota: 1 – Coloração Total; 2 – Início da Descoloração; 3 – Descoloração Parcial; 4 – Descoloração Quase Total e 5 – Descoloração Total.

4.5.10. Avaliação visual relacionada a descoloração do indicador redox – DCPIP em óleo de girassol.

Apenas um microrganismo, INPA R020 apresentou índice de descoloração quase total após 24 hora de incubação. Após 48 horas de incubação sete isolados apresentaram descoloração total (INPA R020, INPA R302, INPA R311, INPA R321, INPA R332, INPAR552 e INPA R555). Um total de 9 isolados foram selecionados pois atingiram, até

seis dias, a nota máxima de descoloração (INPA R020, INPA R302, INPA R304, INPA R311, INPA R321, INPA R332, INPAR552, INPA R555 e INPA R566) conforme mostra a Tabela 34. Esses resultados confirmaram que esses isolados se adaptaram a fonte de carbono óleo de girassol, quase da mesma forma como utilizam o manitol.

Tabela 34 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e óleo de girassol como fonte de carbono em meio líquido.

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R020	4	5	2	3	2	1
INPA R178	1	4	3	2	4	5
INPA R233	1	1	1	1	1	1
INPA R302	3	5	4	2	1	1
INPA R304	1	3	4	5	5	5
INPA R311	1	5	4	3	2	1
INPA R321	1	5	2	1	1	1
INPA R332	1	5	5	4	2	1
INPA R529	1	2	2	2	1	2
INPA R546	1	3	3	3	1	1
INPA R547	1	1	1	1	1	1
INPA R552	1	5	5	2	1	1
INPA R555	3	5	5	3	2	2
INPA R565	1	1	1	1	1	1
INPA R566	1	1	5	1	1	1
INPA R571	1	1	1	1	1	1
INPA R577	1	1	1	2	3	5
INPA R618	1	1	1	1	1	1
INPA R631	1	1	1	1	1	4
INPA R634	1	1	1	1	1	1
INPA R657	1	1	1	1	1	1
INPA R666	1	2	4	1	1	1
INPA R672	1	1	1	1	1	1
INPA R674	1	1	1	1	1	1
INPA R675	1	1	1	1	1	1
INPA R677	1	1	1	1	1	1
INPA R713	1	1	2	2	1	1

Observação: Nota: 1 – Coloração Total; 2 – Início da Descoloração; 3 – Descoloração Parcial; 4 – Descoloração Quase Total e 5 – Descoloração Total.

4.5.11. Avaliação visual relacionada a descoloração do indicador redox – DCPIP em óleo de milho.

Após 24 horas de incubação, o microrganismo INPA R020 já apresentou índice de descoloração total. Um dado relevante foi que com 48 horas de incubação, os números de amostras com descoloração quase total ultrapassaram os do controle (INPA R178, INPA R546, INPA R555, INPA R577, INPAR674 e INPA R675) assim como os números de amostras com descoloração total também ultrapassaram ao controle (INPA R020,

INPA R302, INPA R311, INPA R321, INPA R566, INPAR571, INPA R666 e INPA R672). Um total de 15 isolados foram selecionados pois atingiram, até seis dias, a nota máxima de descoloração (INPA R020, INPA R178, INPA R302, INPA R304, INPA R311, INPA R321, INPA R546, INPAR552, INPA R555, INPA R566, INPA R571, INPA R666, INPA R672, INPA R674 e INPA R677) conforme mostra a Tabela 35. Esses resultados confirmaram que esses isolados se adaptaram muito bem a fonte de carbono óleo de milho quando comparados com os resultados do experimento que utiliza o manitol.

Tabela 35 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e óleo de milho como fonte de carbono em meio líquido.

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R020	5	5	5	3	4	2
INPA R178	1	4	5	5	2	1
INPA R233	3	1	1	2	1	1
INPA R302	3	5	5	3	3	1
INPA R304	3	3	4	5	5	5
INPA R311	1	5	5	4	1	1
INPA R321	1	5	4	2	1	1
INPA R332	1	3	4	4	1	1
INPA R529	2	3	2	3	2	1
INPA R546	1	4	5	4	2	1
INPA R547	1	1	1	1	1	1
INPA R552	1	3	5	4	1	1
INPA R555	1	4	5	3	1	1
INPA R565	2	2	1	2	1	1
INPA R566	2	5	5	3	1	1
INPA R571	1	5	5	4	3	1
INPA R577	2	4	4	3	2	3
INPA R618	1	2	1	2	1	1
INPA R631	1	1	1	1	1	1
INPA R634	1	2	4	4	3	1
INPA R657	1	1	1	1	1	1
INPA R666	1	5	4	2	1	1
INPA R672	1	5	5	4	1	2
INPA R674	2	4	5	4	1	1
INPA R675	2	4	2	1	1	2
INPA R677	1	3	5	4	1	1
INPA R713	1	2	2	4	1	1

Observação: Nota: 1 – Coloração Total; 2 – Início da Descoloração; 3 – Descoloração Parcial; 4 – Descoloração Quase Total e 5 – Descoloração Total.

4.5.12. Avaliação visual relacionada a descoloração do indicador redox – DCPIP em óleo de canola.

Após 24 hora de incubação o microrganismo INPA R675 já apresentou índice de descoloração quase total. Após 48 horas de incubação 3 isolados apresentaram descoloração quase total (INPA R311, INPA R321, e INPA R566) e 3 isolados apresentaram descoloração total (INPA R674, INPA R675, e INPA R713). Um total de 7 isolados foram selecionados pois atingiram, até seis dias, a nota máxima de descoloração (INPA R302, INPA R566, INPA R577, INPA R674, INPA R675, INPA R677 e INPA R713) conforme mostra a Tabela 36.

Tabela 36 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e óleo de canola como fonte de carbono em meio líquido.

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R020	1	1	2	2	2	1
INPA R178	1	1	1	1	1	1
INPA R233	1	1	1	1	1	1
INPA R302	1	2	3	5	2	1
INPA R304	1	1	2	2	2	3
INPA R311	1	4	4	1	1	1
INPA R321	1	4	3	1	1	1
INPA R332	1	1	1	1	1	1
INPA R529	1	1	1	1	1	1
INPA R546	1	1	1	1	1	1
INPA R547	1	1	1	1	1	1
INPA R552	1	1	2	1	2	1
INPA R555	1	2	2	3	2	1
INPA R565	1	1	1	1	1	1
INPA R566	2	4	5	4	1	1
INPA R571	1	3	4	2	1	1
INPA R577	1	1	5	3	1	1
INPA R618	1	1	1	1	1	1
INPA R631	1	1	1	2	1	1
INPA R634	1	1	1	1	1	1
INPA R657	1	1	1	1	1	1
INPA R666	1	1	2	3	4	1
INPA R672	1	1	1	1	1	1
INPA R674	3	5	5	3	1	2
INPA R675	4	5	3	2	1	1
INPA R677	1	2	2	2	2	5
INPA R713	2	5	4	2	1	1

Observação: Nota: 1 – Coloração Total; 2 – Início da Descoloração; 3 – Descoloração Parcial; 4 – Descoloração Quase Total e 5 – Descoloração Total.

4.5.13. Avaliação visual relacionada a descoloração do indicador redox – DCPIP em margarina.

Após 48 horas de incubação apenas os isolados INPA R020, INPA R302, INPA R311 e INPA R577 apresentaram descoloração total, todavia após 72 horas, houve um

pico de descoloração para o teste com esta fonte de carbono. Neste período 5 isolados (INPA R178, INPA R 304, INPA R 552, INPA R634 e INPA R 657) apresentaram descoloração quase total, e doze isolados apresentaram descoloração total (INPA R020, INPA R233, INPA R302, INPA R311, INPA R321, INPA R332, INPA R555, INPA R566, INPA R577, INPA R666, INPA R674 e INPA R713). Um total de 19 isolados foram selecionados pois atingiram, até seis dias, a nota máxima de descoloração (INPA R020, INPA R233, INPA R302, INPA R304, INPA R311, INPA R321, INPA R332, INPA R546, INPA R555, INPA R565, INPA R566, INPA R571, INPA R577, INPA R634, INPA R657, INPA R666, INPA R674, INPA R677 e INPA R713) conforme mostra a Tabela 37. Esses resultados confirmaram que esses isolados se adaptaram muito bem a fonte de carbono margarina quando comparados com os resultados do experimento que utiliza o manitol.

Tabela 37 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e margarina como fonte de carbono em meio líquido.

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R020	2	5	5	1	1	1
INPA R178	1	2	4	4	4	1
INPA R233	1	1	5	1	1	1
INPA R302	1	5	5	3	2	1
INPA R304	1	1	4	5	5	5
INPA R311	1	5	5	4	2	5
INPA R321	1	2	5	3	1	1
INPA R332	1	2	5	3	3	5
INPA R529	2	2	1	1	1	1
INPA R546	1	2	2	5	5	3
INPA R547	1	1	1	1	1	1
INPA R552	1	1	4	4	2	2
INPA R555	1	3	5	4	2	1
INPA R565	1	2	2	4	3	5
INPA R566	1	2	5	5	4	1
INPA R571	1	1	2	5	5	5
INPA R577	1	5	5	5	5	4
INPA R618	1	1	2	1	1	1
INPA R631	1	1	1	1	1	1
INPA R634	1	2	4	5	5	5
INPA R657	1	3	4	5	5	5
INPA R666	1	2	5	4	3	1
INPA R672	1	1	1	1	1	1
INPA R674	1	3	5	4	4	4
INPA R675	1	3	3	1	1	1
INPA R677	1	1	1	1	1	5
INPA R713	1	3	5	1	1	1

Observação: Nota: 1 – Coloração Total; 2 – Início da Descoloração; 3 – Descoloração Parcial; 4 – Descoloração Quase Total e 5 – Descoloração Total.

4.5.14. Avaliação visual relacionada a descoloração do indicador redox – DCPIP em manteiga de garrafa.

Apenas um microrganismo, INPA R020 apresentou índice de descoloração quase total após 24 hora de incubação. Após 48 horas de incubação 3 isolados apresentaram descoloração quase total (INPA R311, INPA R666 e INPA R674) e apenas INPA R020 apresentou descoloração total. Todavia, assim como no experimento contendo margarina, após 72 horas houve um pico de descoloração para o teste com manteiga de garrafa como fonte de carbono. Neste período 5 isolados (INPA R020, INPA R577, INPA R666, INPA R672 e INPA R 677) apresentaram descoloração total, e 5 isolados apresentaram descoloração total (INPA R302, INPA R311, INPA R321, INPA R566 e INPA R674). Um total de 11 isolados foram selecionados pois atingiram, até seis dias, a nota máxima de descoloração (INPA R020, INPA R302, INPA R304, INPA R311, INPA R321, INPA R332, INPA R546, INPA R566, INPA R672, INPA R674 e INPA R677) conforme mostra a Tabela 38. Esses resultados confirmaram que esses isolados se adaptaram a fonte de carbono manteiga de garrafa, quase da mesma forma como utilizam o manitol.

Tabela 38 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e manteiga de garrafa como fonte de carbono em meio líquido.

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R020	4	5	4	2	2	3
INPA R178	1	2	2	3	4	4
INPA R233	2	2	2	1	1	1
INPA R302	1	2	5	4	2	2
INPA R304	1	2	3	3	4	5
INPA R311	1	4	5	4	1	1
INPA R321	1	2	5	3	1	1
INPA R332	1	1	1	2	2	5
INPA R529	1	1	1	1	1	1
INPA R546	1	1	2	2	5	1
INPA R547	1	1	1	1	1	1
INPA R552	1	1	1	1	1	1
INPA R555	1	1	1	1	1	1
INPA R565	1	1	1	1	1	1
INPA R566	1	1	5	3	1	1
INPA R571	1	1	1	1	1	1
INPA R577	1	1	4	4	1	1
INPA R618	1	1	1	1	1	1
INPA R631	1	1	1	1	1	1
INPA R634	1	1	2	4	2	1
INPA R657	1	1	1	1	1	1
INPA R666	1	4	4	3	1	1
INPA R672	2	3	4	5	4	5
INPA R674	2	4	5	4	3	5
INPA R675	1	2	2	1	1	1
INPA R677	1	2	4	3	1	5

Tabela 38 - Avaliação visual da capacidade de biodegradação por isolados de rizobactérias utilizando o indicador DCPIP e manteiga de garrafa como fonte de carbono em meio líquido.

Isolados	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
INPA R713	1	1	1	1	1	1

Observação: Nota: 1 – Coloração Total; 2 – Início da Descoloração; 3 – Descoloração Parcial; 4 – Descoloração Quase Total e 5 – Descoloração Total.

As Figura 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36 são referentes as porcentagens de degradação das gorduras. Nota-se em cada óleo, manteiga e margarina um pico mais elevado de degradação. Com 48h de degradação os óleos de soja (22%), girassol (19%) e canola (11%) apresentaram seus maiores picos de degradação. Com 72h de degradação, óleo de milho (44%), margarina (44%) e manteiga de garrafa (19%) apresentaram seus maiores picos de degradação. Estas fontes de carbono quando comparados com o manitol que apresentaram índices de degradação similares, comprovando que esses microrganismos de solo têm capacidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono.

Os resultados indicam diferenças significativas entre as velocidades de biodegradação dos diferentes tipos de fontes de carbono na presença dos mesmos micro-organismos utilizados, assim verificou-se que apenas os isolados INPA R529, INPA R618 e INPA R631, não apresentaram descoloração total durante todo o período de incubação dos óleos e gorduras, mostrando-se assim, ineficientes na degradação de hidrocarbonetos. Todavia, os isolados INPA R302 e INPA R566 atingiram descoloração total em todos os derivados, sendo selecionados assim para serem utilizados em testes posteriores.

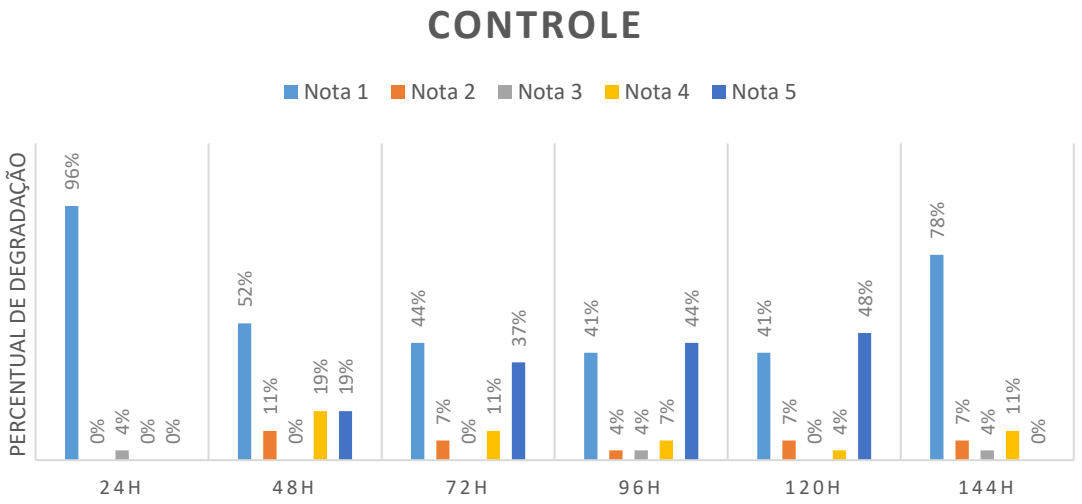


Figura 30 – Biodegradação de manitol por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP.

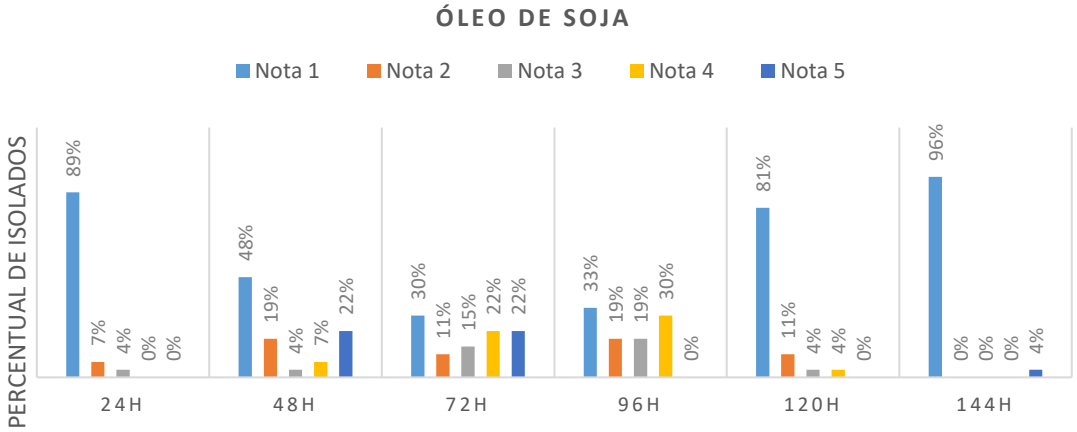


Figura 31 – Biodegradação de óleo de soja por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP.

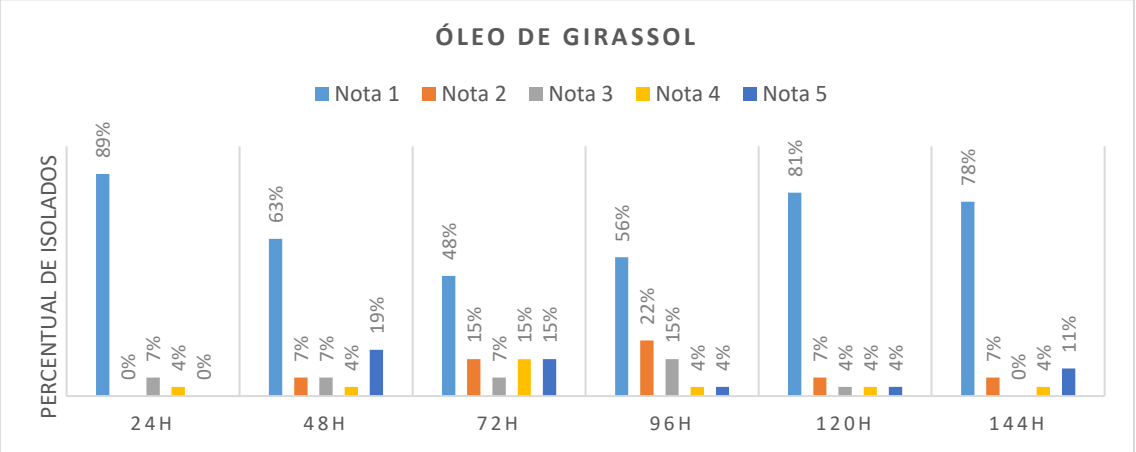


Figura 32 – Biodegradação de óleo de girassol por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP.

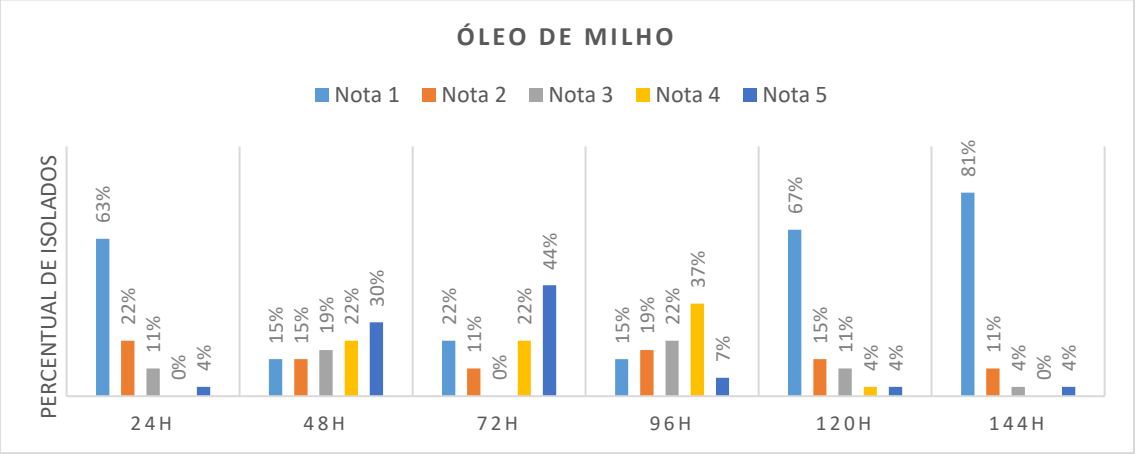


Figura 33 – Biodegradação de óleo de milho por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP.

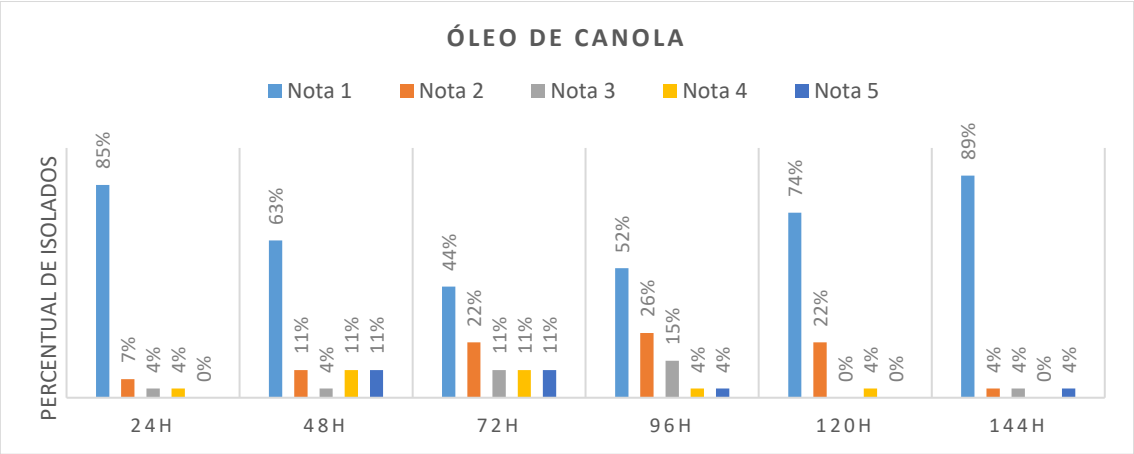


Figura 34 – Biodegradação de óleo de canola por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP.

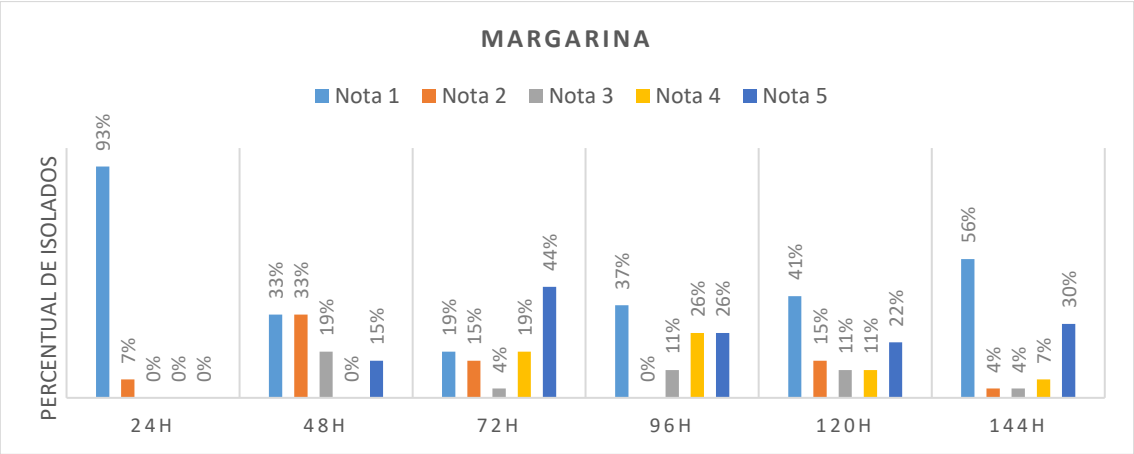


Figura 35 – Biodegradação de margarina por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP.

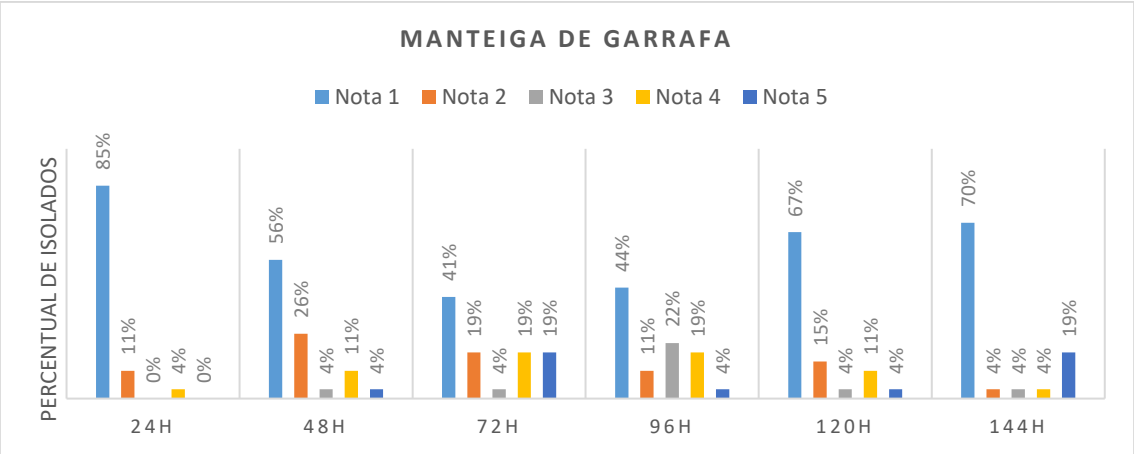


Figura 36 – Biodegradação de manteiga de garrafa por rizobactérias utilizando o indicador redox DCPIP.

Os lipídios produzidos pelas plantas e animais são ésteres complexos de ácidos graxos e álcoois, poucos conhecendo-se da sua degradação, mas sabe-se que microrganismos decompositores, principalmente as bactérias, atacam gorduras e ceras naturais (De Souza Moreira e Siqueira, 2006). O aumento na capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos que ocorrem nas populações de microrganismos autóctones, em ambientes poluídos por compostos oleosos, é chamado de adaptação (Spain et al., 1980). Essa adaptação resulta em um aumento da proporção de degradação dos hidrocarbonetos e pode ocorrer por três mecanismos inter-relacionados: Indução e/ou desrepressão de enzimas específicas, mudanças genéticas que resultam na aquisição de novas atividades metabólicas e enriquecimento seletivo de organismos capazes de transformar os compostos (Leahy; Colwell, 1990).

Os resultados do percentual de descoloração do indicador redox (DCPIP), ao utilizar-se o manitol como fonte de carbono, mostraram que 12 indivíduos dos 27 microrganismos testados atingiram percentual de descoloração acima dos 80%. As demais fontes de carbono testadas nestes mesmos microrganismos também mostraram valores semelhantes de percentual de descoloração (acima de 80%): Óleo de milho e margarina apresentaram 13 indivíduos; óleo de girassol 9 indivíduos; manteiga 8 indivíduos e canola 6 indivíduos. Esses resultados demonstram a capacidade de degradação desse grupo de microrganismos.

Ensaios colorimétricos como o ensaio redox DCPIP são valiosos devido à sua rápida detecção da ocorrência do metabolismo microbiano em estudos aeróbicos e anaeróbicos, uma vez que os processos de oxidação de hidrocarbonetos, em que elétrons são transferidos para aceptores de elétrons, como O_2, nitratos e sulfato, são prontamente demonstrados por meio da mudança de cor azul (oxidado) para incolor (reduzido). Esses resultados são semelhantes aos descritos por Peixoto et al. (2018), quando estes demonstraram a capacidade degradadora de petróleo em uma linhagem de *Bacillus toyonensis* isolados do dique de efluente da Província Petrolífera de Urucu, Coari também no Estado do Amazonas. Estes autores descreveram a atividade de degradação da cepa bacteriana AM07 após 16 horas de incubação. Da mesma forma, Habib et al. (2017) demonstraram a competência de nove bactérias isoladas de solo contaminado com óleo diesel sul da ilha Victoria, na Antártida. Estes autores reportam que micróbios são excelentes degradadores de hidrocarbonetos de petróleo que amplamente disponível em muitos nichos ambientais. Muitos outros trabalhos envolvendo o uso do corante DCPIP

utilizaram bactérias e fungos também mostram resultados satisfatórios (Ezeonu & Siman, 2020; Dos Anjos, De Lima et al., 2018; Obuotor, JOY, Pattanathu & Sharmaa, 2017; Sakariyau & Bada, 2016; Afuwale & Modi, 2012).

Weber & Santos (2013) ressaltam que a biorremediação é a alternativa biológica mais correta e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados, e esses resultados apontam um potencial das Rizobactérias para degradação de gorduras de origem vegetal e animal, pois a preferência microbiana por poluentes desta natureza pode ser atribuído à presença de gorduras ésteres metílicos ácidos, que são uma fonte melhor de carbono para suportar o crescimento microbiano quando comparado a hidrocarbonetos de petróleo.

4.6.PRODUÇÃO DE LIPASES INDUZIDA POR ÓLEO VEGETAL, MARGARINA E MATEIGA DE GARRAFA EM MEIO SÓLIDO

A atividade lipolítica em meio sólido contendo o substrato específico foi detectada através da formação de halo quando os corantes reagiram com os ácidos graxos liberados, indicando a produção de enzima lipase no meio (Jaeger e Kouker, 1987; Saxena, Sheoran et al., 2003). A coloração rosa fluorescente verificada na Figura 37 foi adquirida devido à formação de complexos oriundos da reação dos ácidos graxos, resultantes da hidrólise promovida pela ação da lipase, com a rodamina B presente no meio de cultura.

As tabelas 39, 40, 41, 42, 43, 44 e 45 mostram a produção de lipases das estirpes de rizóbios com as fontes de carbono óleo de oliva (OO), óleo de soja (OS), óleo de girassol (OG), óleo de milho (OM), óleo de canola (OC), margarina (M) e manteiga de garrafa (MG) onde foram obtidos os seguintes resultados.

Dez cepas foram testadas quanto à produção de lipase, dentre essas, apenas duas (INPA R547 e INPA R666) apresentaram resultados positivos de Índice Enzimático (IE%), como pode ser observado na Tabela 39.

Tabela 39 – Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em óleo de oliva.

Nº REGIST	Diâmetro Halo (cm)	Diâmetro Colônia (cm)	Índice Enzimático (IE%)
INPA R302	*ND	*ND	-
INPA R304	*ND	*ND	-
INPA R332	*ND	*ND	-
INPA R547	22,23	16,60	1,34

Nº REGIST	Diâmetro Halo (cm)	Diâmetro Colônia (cm)	Índice Enzimático (IE%)
INPA R552	*ND	*ND	-
INPA R566	*ND	*ND	-
INPA R577	*ND	*ND	-
INPA R631	*ND	*ND	-
INPA R657	*ND	*ND	-
INPA R666	43,63	40,38	1,08

*ND = NÃO DETECTADO

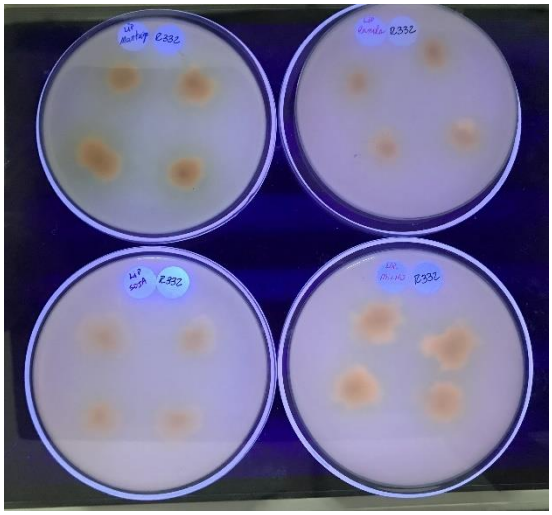


Figura 37 – A coloração rosa fluorescente adquirida devido à formação de complexos oriundos da reação dos ácidos graxos, resultantes da hidrólise promovida pela ação da lipase, com a rodamina B presente no meio de cultura.

4.6.1. Produção de lipases induzida por óleo de soja em meio sólido

Ao se adicionar óleo de soja como indutor de atividade enzimática os isolados INPA R302, INPA 332 e INPA R657 apresentaram resultados positivos de Índice Enzimático (IE%), como pode ser observado na Tabela 25. Estes três microrganismos apresentaram valor médio do IE < 1,00, indicando que houve atividade reduzida. Isso significa que o óleo de soja, mesmo semelhante ao de oliva quanto aos ácidos graxos (Uenojo *et al.*, 2007), apresenta características que o tornam de difícil decomposição pelas lipases, o que ressalta a importância dos isolados bacterianos a serem selecionados nesses bioensaios, pois são poucos os registros na literatura quanto à seleção de isolados microbianos promovendo hidrólise de óleo de soja.

Tabela 40 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em óleo de soja.

Nº REGIST	Diâmetro Halo (cm)	Diâmetro Colônia (cm)	Índice Enzimático (IE%)
INPA R302	16,09	13,25	1,21

Nº REGIST	Diâmetro Halo (cm)	Diâmetro Colônia (cm)	Índice Enzimático (IE%)
INPA R304	*ND	*ND	-
INPA R332	21,03	19,01	1,11
INPA R547	*ND	*ND	-
INPA R552	*ND	*ND	-
INPA R566	*ND	*ND	-
INPA R577	*ND	*ND	-
INPA R631	*ND	*ND	-
INPA R657	39,81	37,65	1,06
INPA R666	*ND	*ND	-

*ND = NÃO DETECTADO

4.6.2. Produção de lipases induzida por óleo de girassol em meio sólido

Ao se adicionar óleo de girassol como indutor de atividade enzimática, apenas os isolados INPA 332 e INPA R657, apresentaram resultados positivos de Índice Enzimático (IE%), todavia ambos apresentaram valores médios de IE muito inferiores a 1,00 como pode ser observado na Tabela 41. Este faro pode sugerir que o óleo de girassol apresenta características que o tornam de difícil decomposição pelas lipases.

Tabela 41 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em óleo de girassol.

Nº REGIST	Diâmetro Halo (cm)	Diâmetro Colônia (cm)	Índice Enzimático (IE%)
INPA R302	*ND	*ND	-
INPA R304	*ND	*ND	-
INPA R332	18,44	19,95	0,92
INPA R547	*ND	*ND	-
INPA R552	*ND	*ND	-
INPA R566	*ND	*ND	-
INPA R577	*ND	*ND	-
INPA R631	*ND	*ND	-
INPA R657	2,53	19,86	0,13
INPA R666	*ND	*ND	-

*ND = NÃO DETECTADO

4.6.3. Produção de lipases induzida por óleo de milho em meio sólido

Ao se adicionar o óleo de milho como indutor de atividade enzimática, os isolados INPA R302, INPA 304, INPA R547 e INPA R666 apresentaram resultados positivos de Índice Enzimático (IE%), como pode ser observado na Tabela 42. Estes três microrganismos apresentaram valor médio do IE < 1,00, indicando que também houve atividade reduzida na presença deste óleo vegetal.

Tabela 42 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em óleo de milho.

Nº REGIST	Diâmetro Halo (cm)	Diâmetro Colônia (cm)	Índice Enzimático (IE%)
INPA R302	18,08	15,95	1,13
INPA R304	24,27	19,36	1,25
INPA R332	*ND	*ND	-
INPA R547	19,47	18,96	1,03
INPA R552	*ND	*ND	-
INPA R566	*ND	*ND	-
INPA R577	*ND	*ND	-
INPA R631	*ND	*ND	-
INPA R657	*ND	*ND	-
INPA R666	14,00	17,24	0,81

*ND = NÃO DETECTADO

4.6.4. Produção de lipases induzida por óleo de canola em meio sólido

Ao se adicionar óleo de canola como indutor de atividade enzimática os isolados INPA R547, INPA 631, e INPA R657 apresentaram resultados positivos de Índice Enzimático (IE%), como pode ser observado na Tabela 43. Estes três microrganismos apresentaram valor médio do IE < 1,00, indicando que também houve atividade reduzida na presença deste óleo vegetal.

Tabela 43 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em óleo de canola.

Nº REGIST	Diâmetro Halo (cm)	Diâmetro Colônia (cm)	Índice Enzimático (IE%)
INPA R302	*ND	*ND	-
INPA R304	*ND	*ND	-
INPA R332	*ND	*ND	-
INPA R547	22,96	29,42	0,78
INPA R552	*ND	*ND	-
INPA R566	*ND	*ND	-
INPA R577	*ND	*ND	-

Nº REGIST	Diâmetro Halo (cm)	Diâmetro Colônia (cm)	Índice Enzimático (IE%)
INPA R631	14,17	28,71	0,49
INPA R657	27,09	32,62	0,83
INPA R666	*ND	*ND	-

*ND = NÃO DETECTADO

4.6.5. Produção de lipases induzida por margarina em meio sólido

Ao se adicionar margarina como indutor de atividade enzimática, apenas os isolados INPA 547 e INPA R552, apresentaram resultados positivos de Índice Enzimático (IE%), todavia um deles apresentou valore médio de IE inferior a 1,00 como pode ser observado na Tabela 44.

Tabela 44 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em margarina.

Nº REGIST	Diâmetro Halo (cm)	Diâmetro Colônia (cm)	Índice Enzimático (IE%)
INPA R302	*ND	*ND	-
INPA R304	*ND	*ND	-
INPA R332	*ND	*ND	-
INPA R547	28,20	22,03	1,28
INPA R552	15,29	18,53	0,82
INPA R566	*ND	*ND	-
INPA R577	*ND	*ND	-
INPA R631	*ND	*ND	-
INPA R657	*ND	*ND	-
INPA R666	*ND	*ND	-

*ND = NÃO DETECTADO

4.6.6. Produção de lipases induzida por manteiga de garrafa em meio sólido

Ao se adicionar margarina como indutor de atividade enzimática, apenas os isolados INPA 547 e INPA R552, apresentaram resultados positivos de Índice Enzimático (IE%), todavia um deles apresentou valore médio de IE inferior a 1,00 como pode ser observado na Tabela 45.

Tabela 45 - Medida dos halos observados na determinação da atividade lipolítica em manteiga de garrafa.

Nº REGIST	Diâmetro Halo (cm)	Diâmetro Colônia (cm)	Índice Enzimático (IE%)
INPA R302	21,10	17,61	1,20
INPA R304	*ND	*ND	-
INPA R332	*ND	*ND	-
INPA R547	*ND	*ND	-
INPA R552	20,87	19,65	1,06
INPA R566	*ND	*ND	-
INPA R577	*ND	*ND	-
INPA R631	*ND	*ND	-
INPA R657	*ND	*ND	-
INPA R666	*ND	*ND	-

*ND = NÃO DETECTADO

4.7 ANÁLISE DO pH.

Além dessas diferenças entre os meios, observou-se que durante o teste de emulsificação, os pHs dos tratamentos foram diferentes e dependentes desses meios. Nota-se que o pH ao se usar os sais do meio YM ficou acima de 7,0, entre 7,11 e 7,42 estando na faixa da neutralidade, enquanto que ao se usar os sais do meio INPA, o pH ficou levemente ácido, variando entre 5,79 e 6,45 (Tabela 50).

O pH é um fator químico que afeta diretamente a atividade microbiana, devido aos efeitos dos íons H^+ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, e, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos (Jacques et al., 2007). Segundo Vidali (2011), pH com valores próximos a neutralidade tornam o processo mais eficiente, uma vez que neste pH, existe uma melhor relação entre bactérias e fungos, formando uma microbiota com um melhor potencial para a biorremediação.

Ao fazer um comparativo entre os meios SYM e INPA, os tampões fosfatos (KH_2PO_4 e K_2HPO_4) presentes no meio INPA proporcionaram uma maior estabilidade para a solução, impedindo grandes oscilações de pH. Estudos apontam que quando a relação das quantidades dos tampões fosfatos KH_2PO_4 e K_2HPO_4 é de três para um, a solução tende a estabilizar em pH 6,4 (Deangelis, 2007; Deangelis, Lindow e Firestone, 2008). O pH ótimo para a ação de muitos microrganismos é usualmente próximo da

neutralidade (Corseuil e Alvarez, 1996). Em se tratando de biorremediação de solos contaminados, Jacques et al. (2010) demonstraram que as maiores degradações de hidrocarbonetos no solo ocorreram nos pH 6,5 e 7,0, demonstrando assim que, quanto mais próximo da neutralidade o pH do solo estiver, melhor será a atividade microbiana do solo, melhorando assim a eficiência da biorremediação. Portanto, microrganismos degradantes de óleos são mais abundantes em ambientes com pH entre 6,0 e 8,0, (Leahy; Colwell, 1990). De acordo com esses parâmetros, mesmo havendo variações de pH entre 5 e 7 nas amostras com os meios salinos (INPA e SYM) e com as diferentes fontes de carbono (óleos e gorduras), os valores obtidos estão dentro da faixa de pH ideal (Tabela 50).

Resultados semelhantes foram descritos por Cáuper et al., (2021) que ao realizarem testes para verificar o potencial de detração de petróleo também utilizando rizobactérias, observaram que logo após os primeiros minutos do teste, alguns tratamentos apresentaram uma alta espessura da camada emulsificante como os isolados INPA R555 (4.55) e INPA R713 (3,38), e com o Consórcio 5. Em trabalhos anteriores, utilizando rizobactérias como degradadoras óleo de cozinha, também apontam que a maioria desses microrganismos testados apresentaram atividade emulsificante em 1 minuto após a montagem do teste (Cáuper et al., 2017). Outras espécies de bactérias também foram testadas, e isolados *Lysnibacillus sp.* e *Bacillus sp*. foram capazes de produzir biossurfactantes a partir de diferentes óleos como fonte de carbono, sendo o óleo de soja, o substrato que apresentou os melhores resultados (De Almeida et al., 2020). A capacidade de produção de biossurfactantes e degradação de hidrocarbonetos foram testados por Marchut-Mikolajczyk et al., (2018). Estes mesmos descreveram os valores da atividade emulsificante para cepa 2A atingiu 1,96 e 1,2 para diesel e resíduos óleo do motor, respectivamente. Larik et al. (2019) descreveram taxas de degradação significativas, 88,5 e 71,8%, e excelente potencial para a produção de biossurfactantes por *Stenotrophomonas maltophilia* (ensaio de deslocamento de óleo = 6 mm; tensão superficial = 33,9 e 34,4 mNm^{-1}).

Tabela 46- Avaliação do pH durante o teste de avaliação do potencial de emulsificação – Meio SYM e/ou INPA com petróleo e inóculo.

Meio YMA														
Tratamentos	Soja		Girassol		Milho		Canola		Margarina		Manteiga de Garrafa		Controle P	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
INPA R302	7,13	7,58	7,29	7,20	7,15	7,26	6,99	7,41	6,95	5,25	6,99	6,53	7,25	7,21
INPA R304	7,30	7,22	7,34	7,42	7,25	7,31	7,32	7,28	7,15	6,99	7,43	7,20	7,31	7,34
INPA R332	6,92	7,72	7,44	7,38	7,23	7,53	7,33	7,40	7,27	7,21	7,48	7,24	7,21	7,21
INPA R547	7,45	7,29	7,20	7,63	7,30	7,20	7,30	7,27	7,20	7,32	7,36	7,14	7,28	7,52
INPA R552	7,10	7,56	7,41	7,68	6,81	7,30	7,31	7,33	7,30	7,30	7,05	7,21	7,58	7,44
INPA R566	7,21	7,32	7,44	7,22	7,30	7,41	7,31	7,20	7,30	7,55	7,24	7,40	7,22	7,53
INPA R577	7,23	7,47	7,53	7,22	7,35	7,32	7,23	7,11	7,10	7,49	7,40	7,30	7,31	7,13
INPA R631	7,45	7,39	6,90	7,12	7,55	7,25	7,00	7,23	6,57	7,29	7,44	7,80	6,94	7,18
INPA R657	6,91	7,88	7,20	7,63	7,38	7,25	7,03	7,27	6,83	7,87	7,30	7,15	7,27	7,13
INPA R666	7,22	7,58	6,80	7,33	7,48	7,88	6,90	6,90	7,10	7,26	7,00	7,28	7,43	7,21
Controle N	6,67	6,60	7,00	6,03	7,00	6,59	7,01	7,52	6,83	7,12	6,54	6,00		
Média	**7,14**	**7,42**	**7,23**	**7,26**	**7,25**	**7,30**	**7,16**	**7,27**	**7,05**	**7,15**	**7,20**	**7,11**	**7,28**	**7,29**

Meio INPA														
Tratamentos	Soja		Girassol		Milho		Canola		Margarina		Manteiga De Garrafa		Controle P	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
INPA R302	5,75	4,29	5,78	6,79	5,73	6,69	6,00	6,85	5,81	6,62	6,00	6,82	6,48	6,95
INPA R304	6,78	6,76	5,90	6,54	5,85	6,59	5,90	6,14	5,73	6,59	6,38	6,12	6,55	6,67
INPA R332	6,91	6,51	5,70	6,53	5,71	6,48	6,10	6,88	5,28	6,51	6,09	6,63	6,12	6,70
INPA R547	5,70	6,51	6,12	6,38	6,82	6,28	5,70	6,63	5,81	6,50	6,11	6,69	6,32	6,50
INPA R552	6,59	6,60	6,99	6,50	5,93	6,59	5,99	6,68	5,09	6,49	6,36	6,57	5,77	6,56
INPA R566	6,19	6,33	6,36	6,49	5,71	6,58	6,81	6,47	5,13	6,52	6,69	6,55	6,82	6,49
INPA R577	5,90	6,44	6,27	6,36	5,96	6,56	5,73	6,39	6,93	6,42	6,96	6,31	6,51	6,39
INPA R631	6,92	6,01	6,38	5,43	5,84	6,13	6,96	6,28	6,10	6,01	5,94	6,31	5,92	6,24
INPA R657	6,97	6,14	5,90	6,00	6,12	6,09	6,18	5,19	5,91	6,32	6,03	5,48	5,73	6,31
INPA R666	5,99	5,79	6,03	5,85	5,90	5,89	5,70	6,01	6,20	6,13	5,90	5,79	6,69	5,72
Controle N	5,91	6,00	5,99	5,90	7,00	5,80	6,32	6,00	5,70	5,90	6,00	6,10		
Média	**6,33**	**6,13**	**6,13**	**6,25**	**6,05**	**6,33**	**6,13**	**6,32**	**5,79**	**6,36**	**6,22**	**6,31**	**6,29**	**6,45**

4.7. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELOS MICRORGANISMOS SELECIONADOS

Biossurfactantes ou surfactantes biológicos são obtidos a partir de microrganismos, e apresentam as mesmas propriedades que os surfactantes sintéticos, ou seja, desempenham alta capacidade emulsificante e diminuem a tensão superficial devido à suas propriedades anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar consiste em uma cadeia carbônica podendo ser saturada, insaturada, hidroxilada ou ácido graxo ramificado. Já a porção polar possui uma variedade, podendo ser aminoácidos, ácidos graxos, grupo carboxila ou partes dos fosfolipídios que contenham o grupo fosfato, ou um complexo de monossacarídeos, dissacarídeos ou polissacarídeos de glicolipídios (Lanet al., 2015)

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes (Nitschke; Pastore, 2002). Essa camada representa a água dispersa dentro do óleo, onde se encontram os emulsificantes lipossolúveis (não iônicos, hidrofóbicos). Quanto mais espessa for a camada emulsificante, maior será a quantidade de biossurfactantes hidrofóbicos produzidos (Atlas, 1995). Diante disso, os quatro tipos de óleos vegetais (soja, girassol, milho e canola) foram escolhidos para a realização desse teste, devido à predominância de hidrocarbonetos existentes em sua composição química, pois estes são utilizados como indicadores de poluição quando há derramamentos em aquíferos ou no solo.

A partir de testes realizados com 27 isolados de rizobactérias capazes de crescerem em meio sólido e meio líquido contendo óleos vegetais (soja, girassol, milho e canola), margarina e manteiga de garrafa, cinco microrganismos foram selecionados por possuírem essa capacidade de crescimento e degradação quando testados em todos os derivados descritos e, cinco microrganismos que apresentaram as piores notas nos testes. Através da realização de uma investigação da capacidade desses isolados em produzir biossurfactantes e estes por poderem ser produzidos em substratos solúveis em água, foram cultivados em meio líquido (SYM), contendo óleo vegetal como fonte de carbono.

4.7.1. Produção de biossurfactantes utilizando óleo de soja como fonte de carbono

Foi possível visualizar a atividade de emulsificante do tipo água em óleo (A/O) pela formação de espuma com aparência de bolhas, entre a fonte de carbono óleo de soja e o sobrenadante somente após as 24 horas do teste (Tabela 47), onde alguns tratamentos apresentaram espessura de CE moderadas: INPA R547 (1,64 cm), INPA R631 (1,14 cm), INPA R657 (1,01 cm), INPA R666 (1,08 cm). Após 48 horas de repouso, essa camada tornou-se mais visível, sendo consideradas altas nos tratamentos INPA R304 e INPA R547 com valores de 2,0 e 2,6 cm. Já os isolados INPA R302, INPA R332, INPA R552, INPA R577, INPA R631, INPA R657 e INPA R666 apresentaram espessura de CE moderadas com valores entre 1,02 e 1,85 cm.

Tabela 47 - Espessura da camada emulsificante (CE) de estirpes de rizobactérias usando duas soluções de sais diferentes e óleo de soja como fontes de carbono.

Tratamentos	**CE – A/O**					
	---------- cm ----------					
	Inicial			**FINAL**		
CONTROLE	0,00	B	B	0,00	b	B
INPA R302	0,79	Ab	B	1,24	ab	M
INPA R304	0,77	Ab	B	2,00	ab	A
INPA R332	0,69	Ab	B	1,85	ab	M
INPA R547	1,64	A	M	2,60	a	A
INPA R552	0,79	ab	B	1,13	ab	M
INPA R566	0,67	ab	B	0,94	ab	B
INPA R577	0,81	ab	B	1,02	ab	M
INPA R631	1,14	a	M	1,46	ab	M
INPA R657	1,01	a	M	1,08	ab	M
INPA R666	1,08	a	M	1,71	ab	M
Médias *	**0,94**			**1,50**		

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.
Nota de Avaliação - Atividade Emulsificante: A (Alta), M (Moderada) e B (Baixa), segundo Matsuura (2004).

4.7.2. Produção de biossurfactantes utilizando óleo de girassol como fonte de carbono

A atividade de emulsificante do tipo água em óleo (A/O), observada pela formação de espuma com aparência de bolhas, entre a fonte de carbono óleo de girassol e o sobrenadante, foi visualizada somente após as 24 horas do teste, onde o tratamento com a INPA R552 já apresentou uma alta espessura da camada emulsificante (2,01 cm).

Os tratamentos com os microrganismos INPA R302, INPA R547, INPA R566, INPA R577 e INPA R631 apresentaram espessura de CE moderada com valores entre 1,07 e 1,75 cm. Após 48 horas de repouso, essa camada tornou-se mais visível, sendo consideradas altas em sete dentre as dez rizobactérias: INPA R302, INPA R304, INPA R332, INPA R547, INPA R552, INPA R566 e INPA R631, e estes apresentaram espessura de CE com valores entre 2,26 e 19,10 cm (Tabela 48).

Tabela 48 - Espessura da camada emulsificante (CE) de estirpes de rizobactérias usando duas soluções de sais diferentes e óleo de girassol como fontes de carbono.

Tratamentos	**CE – A/O**					
	---------- cm ----------					
	Inicial			**FINAL**		
CONTROLE	0,00	b	B	0,00	c	B
INPA R302	1,07	ab	M	19,10	a	A
INPA R304	0,81	ab	B	18,18	a	A
INPA R332	0,80	ab	B	3,04	b	A
INPA R547	1,50	a	M	2,76	bc	A
INPA R552	2,01	a	A	2,83	b	A
INPA R566	1,75	a	M	2,33	bc	A
INPA R577	1,43	a	M	1,71	bc	A
INPA R631	1,19	ab	M	2,23	bc	A
INPA R657	0,24	ab	B	0,54	bc	B
INPA R666	0,27	ab	B	1,33	bc	M
Médias *	**1,11**			**5,41**		

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.
Nota de Avaliação - Atividade Emulsificante: A (Alta), M (Moderada) e B (Baixa), segundo Matsuura (2004).

4.7.3. Produção de biossurfactantes utilizando óleo de milho como fonte de carbono

A atividade emulsificante do tipo água em óleo (A/O), observada pela formação de espuma com aparência de bolhas, entre o óleo de milho e o sobrenadante, foi visualizada somente após 24 horas do teste, onde quase todos os tratamentos apresentaram uma alta espessura da camada emulsificante, como os isolados INPA R302, INPA R304, INPA R332, INPA R547, INPA R552, INPA R631, INPA R657 e INPA R666, e estes apresentaram espessura de CE com valores entre 2,19 e 3,08 cm. Após 48 horas de repouso, essa camada tornou-se mais visível, sendo consideradas altas em todas as rizobactérias testadas. Estes apresentaram espessura de CE com valores entre 20,54 e 22,21 cm (Tabela 49)

Tabela 49 - Espessura da camada emulsificante (CE) de estirpes de rizobactérias usando duas soluções de sais diferentes e óleo de milho como fontes de carbono.

Tratamentos	CE – A/O					
	---------- cm ----------					
	Inicial			FINAL		
CONTROLE	0,00	b	B	0,00	B	B
INPA R302	2,26	a	A	20,84	a	A
INPA R304	2,43	a	A	22,00	a	A
INPA R332	2,93	a	A	22,33	a	A
INPA R547	2,34	a	A	20,95	a	A
INPA R552	2,33	a	A	20,79	a	A
INPA R566	1,54	ab	M	20,54	a	A
INPA R577	1,81	ab	M	20,57	a	A
INPA R631	2,61	a	A	21,07	a	A
INPA R657	2,19	a	A	21,49	a	A
INPA R666	3,08	a	A	22,21	a	A
Médias *	**2,35**			**21,28**		

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si.
Nota de Avaliação - Atividade Emulsificante: A (Alta), M (Moderada) e B (Baixa), segundo Matsuura (2004).

4.7.4. Produção de biossurfactantes utilizando óleo de canola como fonte de carbono

A atividade emulsificante do tipo água em óleo (A/O), observada pela formação de espuma com aparência de bolhas, entre o óleo de canola e o sobrenadante, foi visualizada somente após as 24 horas do teste, onde o tratamento com as rizobactérias INPA R566 e INPA R666 já apresentaram uma alta espessura da camada emulsificante (5,08 cm e 5,51 cm). Os tratamentos com INPA R302, INPA R304, INPA R332, INPA R547, INPA R577 e INPA R657 apresentaram espessura de CE moderada, com valores entre 1,03e 1,66 cm. Após 48 horas de repouso, essa camada tornou-se mais visível, sendo consideradas altas em sete dentre as dez rizobactérias: INPA R302, INPA R332, INPA R547, INPA R566, INPA R577, INPA R657, e INPA R666, e estes apresentaram espessura de CE com valores entre 2,11 e 15,96 cm (Tabela 50).

Tabela 50 - Espessura da camada emulsificante (CE) de estirpes de rizobactérias usando duas soluções de sais diferentes e óleo de canola como fontes de carbono.

Tratamentos	CE – A/O					
	---------- cm ----------					
	Inicial			FINAL		
CONTROLE	0,00	b	M	0,00	c	A
INPA R302	1,03	b	M	3,03	b	A
INPA R304	1,49	b	M	1,73	b	M
INPA R332	1,24	b	M	2,93	b	A
INPA R547	1,66	b	M	2,56	b	A
INPA R552	0,35	b	B	0,38	c	B
INPA R566	5,08	b	A	8,32	ab	A
INPA R577	1,18	b	M	2,11	b	A
INPA R631	0,72	b	B	1,73	b	M
INPA R657	1,40	a	M	2,11	b	A
INPA R666	5,51	a	A	15,96	a	A
Médias *	**1,97**			**4,09**		

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si.
Nota de Avaliação - Atividade Emulsificante: A (Alta), M (Moderada) e B (Baixa), segundo Matsuura (2004).

Com relação às médias inicial e final dos tratamentos, observou-se que nas primeiras 24 horas de incubação, cada solução de sais nas camadas emulsificantes, tanto no meio SYM contendo óleo de milho quanto no meio SYM contendo óleo de canola apresentaram valores mais altos (2,35 cm e 1,97 cm respectivamente), e após destacar que o meio SYM contendo óleo de milho apresentou média final muito superior a todos os outros tratamentos (21,28 cm). Esses resultados demonstram que todos os isolados testados apresentaram capacidade de produzir biossurfactantes (Figura 38).

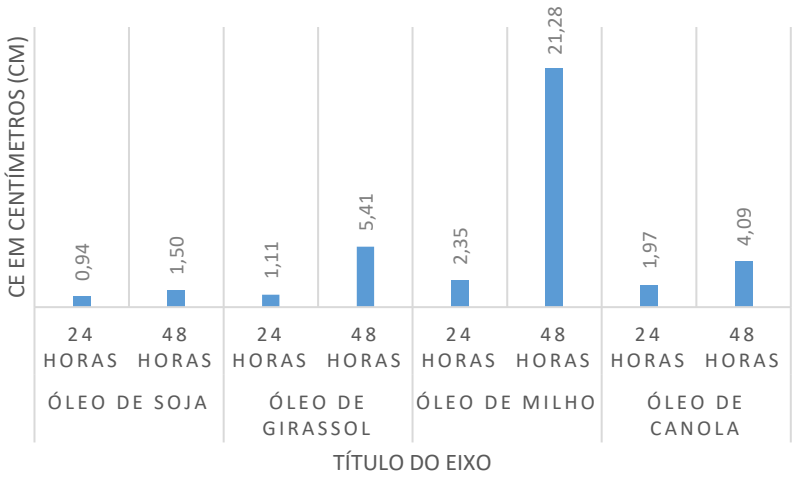


Figura 38- Espessura da camada emulsificante (CE), nos períodos de 24 e 48 horas, em cada óleo

4.7.5. Índice de Emulsificação e atividade emulsificante

Para a avaliação da atividade emulsificante (densidade óptica, Tabela 51), foram medidos os valores de absorbância do óleo em água - O/A (Figura 6), que é definida como a quantidade de biossurfactantes necessária para aumentar a absorbância em 1,0 unidade a 610 nm. Os tratamentos apresentaram quantidades altas de emulsificantes nos meios analisados. Após 48 horas de ensaio, podemos destacar o microrganismo INPA R547 que apresentou alta atividade nos óleos de soja (1,74U), milho (1,05U) e girassol (1,48U), bem como o microrganismo INPA 577 que apresentou atividade média no óleo de soja e atividade alta nos óleos de canola (1,05U) e de girassol (2,85U).

Tabela 51 - - Densidade Óptica - Atividade emulsificante de estirpes de rizobactérias usando meio YM e diferentes óleos vegetais como fonte de carbono.

Tratamentos	Óleo em água											
	Soja			Milho			Canola			Girassol		
	---------- U ----------											
Controle	0,13	g	B	0,14	f	B	0,15	e	B	0,22	f	B
INPA R302	0,31	fg	B	0,69	cd	B	0,48	bc	B	0,88	c	M
INPA R304	0,43	ef	B	0,18	f	B	0,35	cd	B	0,76	cd	M
INPA R332	0,74	cd	M	1,28	a	A	0,20	e	B	0,92	c	M
INPA R547	1,74	a	A	1,05	ab	A	0,55	b	B	1,48	b	A
INPA R552	0,23	fg	B	1,22	a	A	0,38	cd	B	0,47	def	B
INPA R566	0,79	c	M	0,35	ef	B	0,20	e	B	0,53	de	B
INPA R577	0,93	c	M	0,55	de	B	1,05	a	A	2,85	a	A
INPA R631	1,37	b	A	0,20	f	B	0,24	de	B	0,71	cd	M
INPA R657	0,53	de	B	0,92	bc	M	0,18	e	B	0,32	ef	B
INPA R666	0,23	fg	B	0,38	ef	B	0,27	de	B	0,29	ef	B

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

A produção de biossurfactantes, por microrganismos depende de vários fatores, como fontes de carbono e nitrogênio, oligoelementos, temperatura e aeração; uma pequena alteração em algum desses afeta diretamente a sua produção (Silva et al., 2018; Soares Da Silva et al., 2019). Esses resultados demonstram que essas bactérias são capazes de degradar os óleos vegetais produzindo surfactantes e são similares à produção de biossurfactantes de 15 rizóbios isolados da rizosfera de plantas leguminosas (Cáuper et al. 2017). Estes autores relataram que três isolados, UNIP R19, UNIP R21 e UNIP R22, destacaram-se por apresentarem índices emulsificantes respectivamente de 1,58, 1,51 e

1,56. Adamu et al. (2015) demonstraram a capacidade de duas espécies de *Bacillus* como importantes produtoras de biossurfactantes. Neste trabalho, *B. sphaericus* EN3 e *B. azotoformans* EN16 mostraram-se potentes produtores de biossurfactantes, e a glicose mostrou-se o melhor substrato para grandes quantidades de tensoativos, seguida do diesel e do petróleo bruto. Muitos microrganismos possuem capacidade enzimática para degradar hidrocarbonetos existentes no petróleo (Atlas, 1995; Brito et al, 2017a; Brito et. al, 2017b, Rivera et al, 2019).

A produção de biossurfactantes também foi demonstrada por amostras de fungos isolados de resíduos oleosos, dos quais 17 apresentaram atividade de produção após 14 dias de fermentação (SPEB et al. 2015). Sobrinho et al. (2008) descreveu um meio de cultura para a produção de biossurfactantes, usando *Candida sphaerica* UCP 0995 com 5,0% de resíduos da refinaria de óleo de amendoim e 2,5% licor de maceração de milho em água destilada. Eles obtiveram produção de biossurfactante de 4,5 g/L, com ST de 26 mN/m e um valor de CMC de 0,8 mg/L, demonstrando um uso potencial em recuperação de óleo, removendo 65% do óleo da areia.

4. CONCLUSÕES

- Das 30 rizobactérias testadas, 23 apresentaram a capacidade de degradar o óleo de soja, 23 o óleo de milho, 24 o óleo de canola, 12 a margarina e 21 a manteiga de garrafa, pois apresentaram a nota de crescimento sugerida (3,06) com três dias de crescimento, sendo selecionadas 27 bactérias no total. Onze delas apresentaram notas elevadas de crescimento em todos os óleos e gorduras no meio YMA e em ao menos um óleo no meio INPA (INPA R302, INPA R304, INPA R332, INPA R547, INPA R552, INPA R566, INPA R577, INPA R631, INPA R657, INPA R666 e INPA R675).
- Em relação ao teste de crescimento utilizando o indicador redox – DCPIP, para avaliação do potencial de degradação em meio líquido, ao utilizar-se o manitol como fonte de carbono, 12 indivíduos atingiram percentual de descoloração acima dos 80%. As demais fontes de carbono testadas nestes mesmos microrganismos também mostraram valores semelhantes de percentual de descoloração: Óleo de milho e margarina apresentaram 13 indivíduos; óleo de girassol 9 indivíduos; manteiga 8 indivíduos e canola 6 indivíduos. Esses resultados demonstram a capacidade de degradação desse grupo de microrganismos. Contudo, os microrganismos INPA R302, INPA R304, INPA R311, INPA R321 e INPA R566 apresentaram os maiores percentuais de degradação em todas as fontes de carbono apontando, com isso, a excelente capacidade de adaptação a fontes de carbono distintas.
- A atividade lipolítica em meio sólido contendo o substrato específico para indicar a produção de enzima lipase mostrou que esses mesmos microrganismos não apresentaram resultados significativos. Isso sugere que essas diferentes fontes de carbono apresentam características distintas e que as tornam de difícil decomposição pelas lipases.
- A avalição do pH foi considerada nos padrões de normalidade sem alterações significativas, ou seja, dentro dos níveis de normalidade no pH inicial e final, contudo, ocorreram diferenças entre os meios. O pH ao se usar os sais do meio YM ficou acima de 7,0, entre 7,11 e 7,42 estando na faixa da neutralidade, enquanto que ao se usar os sais do meio INPA, o pH ficou levemente ácido, variando entre 5,79 e 6,45.

- A produção de biossurfactantes durante o processo de degradação óleo de soja em meio SYM, mostrou que os isolados INPA R304 e INPA R547 foram os melhores, por apresentar uma Camada Emulsificante Água em Óleo (A/O), alta e mais espessa (Inicial – 0,77 cm e 1,64 cm; Final – 2,00 e 260, respectivamente.).
- A produção de biossurfactantes durante o processo de degradação óleo de girassol em meio SYM, demonstra que o isolado INPA R552 já apresentou uma alta espessura da camada emulsificante (2,01 cm). Após 48 horas de repouso, essa camada tornou-se mais visível, sendo consideradas altas em sete dentre as dez rizobactérias: INPA R302, INPA R304, INPA R332, INPA R547, INPA R552, INPA R566 e INPA R631, e estes apresentaram espessura de CE com valores entre 2,26 e 19,10 cm.
- A produção de biossurfactantes durante o processo de degradação óleo de milho em meio SYM, demonstra que o isolado INPA R666 já apresentou uma alta espessura da camada emulsificante (3,08 cm). Contudo, após 48 horas de repouso todos os isolados demonstraram boa capacidade de produção de biossurfactantes com valores entre 20,54 e 22,21 cm na espessura de CE.
- A produção de biossurfactantes durante o processo de degradação óleo de canola em meio SYM, mostrou que os isolados INPA R566 e INPA R666 foram os melhores, por apresentar uma Camada Emulsificante Água em Óleo (A/O), alta e mais espessa (Inicial – 5,08 cm e 5,51 cm; Final – 8,32 e 15,96, respectivamente.).
- Para a atividade emulsificante podemos destacar o microrganismo INPA R547 que apresentou alta atividade nos óleos de soja (1,74U), milho (1,05U) e girassol (1,48U), bem como o microrganismo INPA 577 que apresentou atividade média no óleo de soja e atividade alta nos óleos de canola (1,05U) e de girassol (2,85U). Todas as rizobactérias testadas apresentaram ótimo potencial para serem utilizadas em processos de biorremediação, todavia, outros testes precisam ser realizados com esse grupo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais, 2018. Disponivel em: <http://abiove.org.br/>. Acesso em: Agosto 2018.

ADAMU, A. et al. Study on Biosurfactant Production by Two Bacillus Species. International Journal of Scientific Research in Knowledge, v. 3, n. 1, p. 013-020, 2015. Disponivel em: <http://dx.doi.org/10.12983/ijsrk-2015-p0013-0020>.

AFUWALE, ; MODI, H. A. STUDY OF BACTERIAL DIVERSITY OF CRUDE OIL DEGRADING BACTERIA ISOLATED FROM CRUDE OIL CONTAMINATED SITES. Life sciences Leaflets, v. 6, p. 13-23, June 2012.

ALBERICI, R. M.; PONTES, F. F. F. D. Reciclagem de óleo comestível usado através da fabricação de sabão. Eng.ambient, Espírito Santo do Pinhal, v. 1, p. 073-076, Dez 2004.

AL-WAHAIBI, Y. et al. Biosurfactant production by Bacillus subtilis B30 and its application in enhancing oil recovery. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, v. v. 114, p. 324 – 333, 2014.

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

ASSOCIATION), A. (. P. H. Standard Methods the Examination of Water and Wastewater–19th edition. [S.l.]. 1995.

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

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 53, p. 495-508, 2000.

BEAZLEY, M. J. et al. Microbial Community Analysis of a Coastal Salt Marsh Affected by the Deepwater Horizon Oil Spill. Plos one, v. 7, n. 7, p. 1-13, Julho 2012. Disponivel em: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0041305&type=printable>.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Essabelecimiento de índices para el estudio de la solubilizacion de fosfatos por bacterias del suelo. Ars Pharmaceutica, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.

BIDOIA, E. D.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. Appl Microbiol Biotechnol, v. 7, p. 1277-1288, 2021.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. Appl Environ Microbiol, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, 1997.

BRAGA, I. M. R. M. D. and OLIVEIRA R. P. "Azeite, manteiga ou margarina? As gorduras alimentares em Rosa Maria no Portugal de meados do século XX." n. 20, p. 177-196, 2015. DOI 10.1285/i20380313v20p17.

BRITO, L. L. et al. Avaliação da capacidade de produção de biossurfactantes e degradação de petróleo por isolados de rizobactérias. In: OLIVEIRA, L. A. et al. Diversidade Microbiana da Amazônia. Manaus: INPA, v. 2, p. 83-88, 2017

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

BUENO, S. M.; SILVA, A. N. D.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. Química Nova, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.

BUNDY, J. G.; PATON, G. I.; CAMPBELL, C. D. Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. Journal of Applied Microbiology, v. 92, p. 276 - 288, 2002.

CASTIGLIONI, L. G.; BERTOLIN, E. T.; COSTA, V. A. J. Produção de Biossurfactante por Aspergillus fumigatus Utilizando Resíduos Agroindustriais como Substrato. Quím. Nova, v. 32., n. 2, p. 292-295, 2009.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. Quim. Nova, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CÁUPER, F. R. M. et al. Potencial de produção de biossurfactantes por bactérias do gênero rhizobium utilizando óleo de cozinha como fonte de carbono. Scientia Amazonia, Manaus, v. 6, n. 1, p. 71-80, 2017. ISSN 2238.1910. Disponivel em: <http://www.scientia-amazonia.org>.

CÁUPER, L. L. D. B. Degradação de petróleo e derivados por isolados de rizobactérias e Trichodermas spp. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. Manaus, p. 170. 2018.

CÁUPER, L. L. D. B.; CÁUPER, F. R. M.; DE OLIVEIRA, L. A. BIOSURFACTANT Production by rhizobacteria isolated from amazonian soils. International Journal Of Conservation Science, v. 12, n. 1, p. 311-322, January-March 2021. Disponivel em: <http://ijcs.ro/public/IJCS-21-24_Cauper.pdf>.

CERQUEIRA, V. S. et al. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. Bioresource Technology, v. 102, p. 11003–11010, 2011.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. D.; OLIVEIRA, A. N. D.; WILLERDING, A. L. Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia Central. Acta Amazonica, v. 39, p. 489-494, 2009. Disponivel em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672009000300002>.

CHANDRA, M. et al. Cellulase production by six Trichoderma spp fermented on medicinal plant process. J. Ind. J Ind Microbiol Biotechnol , v. 36, p. 605–609, Abril 2009.

CHOROM, M.; SHARIFI, H. S.; MOTAMEDI, H. Bioremediation of a crude oil-polluted soil by application of fertilizers. Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng., v. 7, n. 4, p. 319-326, 2010. Disponivel em: <http://ijehse.tums.ac.ir/index.php/jehse/article/view/262>.

COOPER, D. ; GOLDENBERG, B.. Surface-Active Agents from Two Bacilllus Species. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, v. 53, n. 2, p. 224-229, Feb 1987.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in brazil: effect of ethanol. Water Science and Technology, v. 34, n. 7, p. 311-318, 1996. Disponivel em: <https://doi.org/10.1016/S0273-1223(96)00759-7>.

COSTA NETO, P. R. et al. PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL ALTERNATIVO AO ÓLEO DIESEL ATRAVÉS DA TRANSESTERIFICAÇÃO. QUÍMICA NOVA, v. 23, p. 531-537, SET 2000.

DA SILVA, A. C. S. et al. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. Arquivos do Instituto Biológico, Recife, v. 85, 2018.

DASGUPTA, D.; GHOSH, R.; SENGUPTA, T. K. Biofilm-mediated enhanced crude oil degradation by newly isolated Pseudomonas species. ISRN Biotechnology, p. 1-13, 2013. Disponivel em: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/250749/>.

DE ALMEIDA, A. M. et al. Produção de biossurfactante por Lysinibacillus sp. e Bacillus sp. a partir de diferentes óleos como fonte de carbono. Revista Matéria, v. 25, n. 4, 2020.

DE OLIVEIRA, THAÍSSA CUNHA; MINELLI-OLIVEIRA, CASSIANE; MENEZES, NADIONARA COSTA; RODRIGUES, SUZIANE PINTO; SILVA, JOSÉ CARLOS IPUCHIMA DA; OLIVEIRA, LUIZ ANTONIO DE. Morfologia das colônias de algumas rizobactérias amazônicas em três meios de cultivo diferentes. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 11, p. 107297-107313, 2021.

DE SOUZA MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2ª. ed. [S.l.]: Editora Ufla, 2006. 729 p.

DEANGELIS, K. M. Phosphate Buffer, 2007. Disponivel em: <https://www.unl.edu/cahoonlab/phosphate%20buffer.pdf>.

DEANGELIS, K. M.; LINDOW, S. E.; FIRESTONE, M. K. Bacterial quorum sensing and nitrogen cycling in rhizosphere soil. FEMS Microbiol Ecol, v. 66, p. 197–207, 2008.

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

DOS ANJOS, N. et al. Bioremediation of diesel/biodiesel contaminated sandy soil in microcosm: evaluation of fungal bioaugmentation and natural attenuation. Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 40, n. 39468, 2018. Disponivel em: <http://periodicos.uem.br/ojs/acta>.

DOS SANTOS, C. A. et al. Um modelo de sistema de informação gerencial. Research, Society and Development, v. 4, p. 62-88, Jan 2017.

EZEONU, S.; SIMAN, A. Biosurfactant quality generated from fungi using agro-wastes (maize husk, rice husk, and augarcane bagasse). The Proceedings of the Nigerian Academy of Science, v. 13, n. 2, 2020. ISSN 46-57.

FARIA, E. A. D. et al. Estudo da Estabilidade Térmica de Óleos e Gorduras Vegetais por TG/DTG e DTA. Eclética Química, 2002. ISSN 1678-4618. Disponivel em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702002000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.

FERNANDES, M. F. et al. Características físico-químicas e perfil lipídico do leite de cabras mestiças Moxotó alimentadas com dietas suplementadas com óleo de semente de algodão ou de girassol. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 37, n. 4, p. 703-710, 2008. ISSN 1806-9290. Disponivel em: <http://sbz.org.br/new/pt/>.

FLORENTINO, L. A., REZENDE, A. V., MESQUITA, A. C., LIMA, A. R., MARQUES, D. J., & MIRANDA, J. M. Diversidade e potencial de utilização dos rizóbios isolados de nódulos de Gliricidia sepium. Revista de Ciências Agrárias, v. 37, n. 3, p. 320-328, 2014. ISSN 0871-018X.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. D. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação - Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, p. 36 - 43, Janeiro/ Junho 2005.

GONÇALVES, C. B.; BATISTA, E.; MEIRELLES, A. J. A. Liquid-Liquid Equilibrium Data for the System Corn Oil + Oleic Acid + Ethanol + Water at 298.15 K. Journal of Chemical and Engineering Data, v. 47, n. 3, p. 416-420, 2002.

HABIB, S. et al. Screening of Hydrocarbon-degrading Bacterial Isolates Using the Redox Application of 2,6-DCPIP. BIOREMEDIATION SCIENCE AND TECHNOLOGY RESEARCH, Selangor, Malaysia, v. 5, n. 2, p. 13-16, 2017. Disponivel em: <http://journal.hibiscuspublisher.com/index.php/BSTR>.

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

HANSON, K. G.; JITENDRA D,; ANJANA J., D. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. Biotechnology techniques, v. 7, n. 10, p. 745-748, 1993.

HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. recent advances and future perspectives. Trends in Food Science & Technology, v. 14, p. 499–506, 2003.

HUTCHINS, S. R. et al. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. Environmental Science & Technology, v. 21, p. 68-76, 1991. ISSN 1.

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Ciência Rural, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, Jul-Ago 2007. ISSN 0103-8478.

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. Ciência Rural, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 310-317, 2010. Disponivel em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/mNrCVF8HdGkyhcgMhbW5rmP/?format=pdf&lang=pt>.

JAEGER, K. E.; KOUKER, G. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Applied and Environmental Microbiology , p. 211-213., 1987.

JARAMILLO, P. M. D. et al. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populationstrapped from soils underagroforestry systems in the Western Amazon.. Scientia Agricola, v. 70, n. 6, p. 397-404, Dez 2013.

JORGE, N. Química e Tecnologia de Óleos Vegetais. São Paulo: Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação, v. I, 2009. 165 p. ISBN 978-85-98605-72-2.

JORGE, N. et al. ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS DE GIRASSOL, MILHO E SOJA EM FRITURAS. Quim. Nova, v. 28, n. 6, p. 947/951, 2005.

JOY, S.; PATTANATHU , K. S. M.; SHARMAA, S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. Chemical Engineering Journal, v. 317, p. 232-241, 2017.

KOBLITZ, M. G.; PASTORE, G. M. Purification parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por Rhizopus sp. Ciênc. Tecnol., Aliment, v. 24, n. 2, p. 287-292, 2004.

KOSTKA, J. E. et al. Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, v. 77, n. 22, p. 7962–7974, Nov 2011.

LAN, G. et al. Rhamnolipid production from waste cooking oil using Pseudomonas SWP-4. Biochemical Engineering Journal, v. 101, p. 44–54, January 2015. Disponivel em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.001>.

LARIK, I. A. et al. Stenotrophomonas maltophilia strain 5DMD: an efcient biosurfactant producing bacterium for biodegradation of diesel oil and used engine oil. International Journal of Environmental Science and Technology, v. 16, p. 259–268, 2019.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological reviews, v. 54, p. 305-315, 1990. ISSN 3.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. Microbiological reviews, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; GOMES, C. B. Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. Tropical Plant

Pathology, Brasília, v. 38, n. 8, p. 1 - 5, Maio 2003. Disponivel em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762013005000007 >.

MARCHUT MIKOLAJCZYK, O. et al. Biosurfactant production and hydrocarbon degradation activity of endophytic bacteria isolated from Chelidonium majus L. Microbial Cell Factories, v. 17, n. 171, 2018. Disponivel em: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1017-5>.

MARIANO, A. P. P.; DE ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. MONITORAMENTO DE INDICADORES GEOQUÍMICOS E AVALIAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO EM ÁREA CONTAMINADA COM ÓLEO DIESEL. Eng. sanit. ambient., v. 12, n. 3, p. 296-304, JUL/SET 2007.

MARQUÉS, A. M. et al. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by Rhodococcus erythropolis 51T7. Chemistry and physics of lipids, v. 158, n. 2, p. 110-117, 2009.

MEDEIROS, E. V. D. et al. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. Acta Scientiarum. Agronomy , Maringá, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009. ISSN 1807-8621. Disponivel em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86212009000300024>.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. atual. e amp. ed. [S.l.]: Lavras Editora UFLA, 2006. 729 p. ISBN 85-87692-12-7.

MORETTO, E. et al. Introdução à ciência de alimentos. Florianópolis: Editora da UFSC, 2002. 2002. 255p p.

MORETTO, E.; FETT, R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos. São Paulo: Varela, 1998. 150 p. ISBN 85-85519-41-X.

MOURA, D. C. G.; OLIVEIRA, L. A. Capacidade de microrganismos autóctones de solos amazônicos em usar o petróleo como fonte de carbono com meios nutricionais distintos. In: OLIVEIRA, L. A. et al. Diversidade Microbiana da Amazônia. Manaus: INPA, v. 2, 2017. p. 218-224.

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

OBUOTOR, T. M.; SAKARIYAU, A. O.; BADA, B. S. Enhanced Biodegradation of Spent Engine Oil Contaminated Soil Using Organic Wastes. Applied Environmental Research, v. 3, n. 38, p. 27-38, 2016. Disponivel em: <http://www.tci-thaijo.org/index.php/aer>.

OLIVEIRA, A. C. C. D.; ARAÚJO, F. F. D. BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR ÓLEO VEGETAL UTILIZANDO A BIOAUMENTAÇÃO COM Bacillus subtilis. Colloquium Exactarum, Colloquium Exactarum, Presidente Prudente, v. 3, p. 22-27, 2011.

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

OUANA, M. A. Controlo de qualidade de manteiga (Tulip) e margarinas (Rama e Flora) comercializadas e consumidas em Maputo. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Eduardo Mondlane. [S.l.], p. 66. 2016.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Ministério da Agriculrura, Pecuária e Abastecimento. Sete Lagoas, MG, p. 1-6. 2006. (1679-1150).

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. Bioresource Technology, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DłUGON´SKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus Curvularia lunata. Growth and product characterization. Journal of Biotechnology, p. 287–294, 2002.

PATEKOSKI, K. D.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. Efeito de trichoderma SPP no controle de podridão de raiz causada por pythium aphanidermatum e na promoção de crescimento da alface hidropônioca. Acta Scientiae Biological Research, v. 1, n. 1, p. 59-74, 2016.

PEIXOTO F.B.S; PEIXOTO J.C.C; MOTA D.C.L; PEIXOTO A.T.M; PEREIRA J.O.; SPARTACO A.F. Assessment of petroleum biodegradation for *Bacillus toyonensis* by the using redox indicator 2,6 dichlorophenol indophenol. Acta Scientiarum. Biological Sciences V. 40, 2018. Doi: 10.4025/actascibiolsci.v40i1.35640.

PINHO, D. M. M.; SUAREZ, P. A. Z. A Hidrogenação de Óleos e Gorduras e suas Aplicações Industriais. Rev. Virtual Quim., v. 5, n. 1, p. 47-62, 2013. ISSN 1984-6835.

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

POTES, M. E.; MARINHO, A. A. Utilização de diferentes meios de cultura na identificação e recuperação de bactérias lácticas. REVISTA PORTUGUESA DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, v. 102, p. (561-562, 2007.

RAMALHO, H. ; SUAREZ, P. A. Z. A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. Revista Virtual de Química, Brasília, v. 5, n. 1, p. 2-15, Janeiro-Fevereito 2013. ISSN 1984-6835.

RIVERA, Á. ; URBINA, M. Á. M.; LÓPEZ Y LÓPEZ,. Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 35, n. 155, p. 1 - 18, 2019. Disponivel em: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2729-3>.

RUDORFF, B. et al. Análise geoespacial da dinâmica da soja no bioma Cerrado: 2014 a 2017. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais - ABIOVE. Florianópolis, p. 20. 2018. (978-85-54011-00-0).

SANTOS, C. E. R S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G. BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Recife, v. 2, n. 4, p. 249-256, Dez 2007.

SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. Journal of Microbiological Methods 52, p. 1-18, 2003.

SCHÄFFER, A. A. et al. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. Nucleic acids research, v. 29, p. 2994-3005, 2001.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. Biotechnology Advandes, v. 19, p. 627-662, 2001.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. R. Bras. Ci. Solo, v. 24, p. 311-319, 2000.

SILVA, L. T. A. et al. Potencial biotecnológico de uma nova linhagem de Pseudomonas fluorescens na produção de biossurfactante utilizando petróleo como substrato. Exacta, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 31 - 37, 2009.

SNELLMAN, E. A.; SULLIVAN, E. R.; COLWELL, R. R. Purification and properties of extracellular lipase, LipA, of Aacinetobacter sp RAG-1. Eur. J. Biochem, v. 269, p. 5771-5779, 2002.

SOARES DA SILVA, R. D. C. F. et al. Production, formulation and cost estimation of a commercial biosurfactant. Biodegradation, v. 30, p. 191–201, 2019. Disponivel em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10532-018-9830-4>.

SOBRINHO, H. et al. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by Candida sphaerica UCP0995. Process Biochemistry, v. 43, n. 9, p. 912-

917, 2008. Disponivel em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511308001268>.

SOMASEGARAN, P.; HEINZ, J. H. Methods in legume-Rhizobium technology. Niftal Project and MIRCEN, 510p. Hawaii,: [s.n.], 1985.

SPAIN, J. C.; PRITCHARD, P. H.; BOURQUIN, A. W. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freschwater environments. Applied and Environmental Microbiology, v. 40, p. 726-734, 1980. ISSN 4.

SPERB, G. C. et al. Análise qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. ENGEVISTA, v. 17, p. 385-397, Setembro 2015. ISSN 3.

STAMFORD, T. M.; ARAUJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (Pachyrhizus erosus L. Urbam). Ciênc. Tecnol. Aliment, v. 18, n. 4, p. 1-10, oct./dec. 1998.

SUAREZ, P. A. Z. et al. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. Quim. Nova, v. 30, n. 3, p. 667-676, 2007.

UENOJO, ; MARÓSTICA JUNIOR, M. ; PASTORE, G. M. CAROTENÓIDES: PROPRIEDADES, APLICAÇÕES E BIOTRANSFORMAÇÃO PARA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA. Quim. Nova, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil, v. 255, p. 571-586, Março 2003.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemistry, v. 73, n. 7, p. 1163-1172., 2001. Disponivel em: <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>.

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria." A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological Programme [by] Blackwell Scientific, v. 15, p. 164, 1970.

WEBER, B. D.; SANTOS, A. A. "Utilização da biorremediação como ferramenta para o controle da degradação ambiental causada pelo petróleo e seus derivados. Engenharia Ambiental, Espír i to Santo do Pinhal, v. 10, n. 1, p. 114-133, jan / fev 2013.

WILDNER, L. B. A.; HILLIG,. Reciclagem de óleo comestível e fabricação de sabão como instrumentos de educação ambiental. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental REGET/UFSM, v. 5, p. 813-824, 2012. ISSN 2236-1170.

ZUCATTO, L. C.; WELLE, I.; DA SILVA, T. N. Cadeia reversa do óleo de cozinha: coordenação estrutura e aspectos relacionais. RAE-Revista de Administração de Empresas, São Paulo, v. 53, p. 442-447, set-out 2013.

ANEXO

Artigo aceito para publicação em: 07/05/2024 na *Revista Contribuciones a las ciencias Sociales*. DOI: 10.55905/revconv.17n.7-293

https://ojs.revistacontribuciones.com/ojs/index.php/clcs/article/view/8569/5345