



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015025422-9 A2



(22) Data do Depósito: 05/10/2015

(43) Data da Publicação Nacional: 22/10/2019

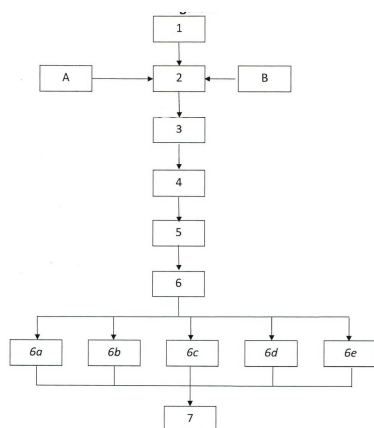
(54) Título: CONSÓRCIO DE MICRO-ORGANISMOS PARA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS E PETRODERIVADOS E SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO

(51) Int. Cl.: C12N 1/20; C12N 11/10; B09C 1/10; C12R 1/125; C12R 1/085; (...).

(71) Depositante(es): CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES POSITIVO LTDA.; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.

(72) Inventor(es): LEILA TERESINHA MARANHÃO; BRUNO BRIANI DE PAULA; ALINE SESTREN; SUELLYN HOMAN; VANETE THOMAZ SOCCOL.

(57) Resumo: CONSÓRCIO DE MICRO-ORGANISMOS PARA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS E PETRODERIVADOS E SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO Compreende a presente inovação o estabelecimento e a produção de consórcios de micro-organismos constatados como degradadores de hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados, a fim de otimizar e acelerar o processo de degradação de contaminantes por via biológica, com fins de descontaminação e tratamento de ambientes com grande carga orgânica por um método de tratamento eficaz e de baixo custo.



RELATÓRIO DESCRITIVO

CONSÓRCIO DE MICRO-ORGANISMOS PARA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

E PETRODERIVADOS E SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO

Campo da Invenção

[001] A presente inovação trata de um processo para a recuperação de ambientes contaminados, mais especificamente a degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, exatamente a degradação biológica de hidrocarbonetos e petroderivados utilizando um consórcio de micro-organismos isolados da rizosfera de plantas fitorremediadoras, das espécies *Sesbania punicea* (Cav.) Benth, *Mimosa scabrella* Benth e *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc.

Histórico da Invenção

[002] O petróleo, combustível originado de grandes deposições fósseis, é uma mistura heterogênea que levou milhões de anos para ser formado nas rochas sedimentares. Os combustíveis derivados deste material são responsáveis pela maior parte da matriz energética mundial. No Brasil, tem-se a perspectiva de aumento na produção de petróleo com a descoberta de jazidas do período pré-sal. Toda essa demanda, entretanto, exige grande estruturação na cadeia produtiva desse setor, como a construção e a ampliação de refinarias por todo o país.

[003] Diante dessa necessidade mundial, que envolve a produção e comercialização de petróleo e seus derivados, as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação ambiental vêm crescendo. As principais causas são derramamentos acidentais e vazamentos em tubulações e tanques de estocagem, além do despejo de resíduos, constituindo fontes de contaminação de solos e águas subterrâneas. Isso afeta diretamente a saúde pública, as comunidades vegetais e animais e, por fim, os ecossistemas como um todo. Por este motivo, a contaminação do solo por petróleo e seus derivados tem sido o foco de pesquisas

nos últimos anos, pois há a necessidade do desenvolvimento de técnicas eficientes, acessíveis e de baixo custo que possam ser aplicadas na remediação, seja por meio da degradação ou redução dos contaminantes presentes no ambiente.

[004] Dentre as tecnologias usualmente empregadas para o tratamento de ambientes contaminados com petróleo, destaca-se a remediação térmica, que consiste na utilização de altas temperaturas para evaporar contaminantes derivados de petróleo, em especial os compostos benzeno, tolueno e xileno (BTX). Este processo tem como princípio o aquecimento do material contaminado a temperaturas extremamente elevadas que reduzem os contaminantes, mas também danificam o solo, dificultando seu uso após a remediação.

[005] Outro processo utilizado é a lavagem do material contaminado, que prevê a sua remoção e lavagem com uma solução contendo solventes leves que tem como objetivo separar partículas maiores contaminadas do material não contaminado. São utilizados ainda, a altos custos, materiais absorventes, como almofadas, barreiras e esteiras recolhedoras, que flutuam e retiram o petróleo da superfície da água. Alguns processos, por deslocarem a matéria orgânica contaminada para locais distantes, geram riscos de contaminação secundária e elevam os custos com o tratamento.

[006] Frente a esta situação, em que é necessário conciliar a demanda crescente de petróleo com a proteção ambiental, faz-se necessário a busca por alternativas sustentáveis para o tratamento de ambientes contaminados com petróleo e seus derivados. Dentro deste contexto, estudos de fitorremediação têm demonstrado o potencial de plantas para o tratamento de locais com a presença de petróleo, tais como solo e água subterrânea. As plantas, entretanto, atuam indiretamente nesse processo, ao estimularem, por meio de compostos liberados no solo, a intensa atividade metabólica das populações de micro-

organismos associados a sua rizosfera, cujo desenvolvimento é favorecido pela planta por meio do fornecimento de oxigênio. Os micro-organismos, por sua vez, degradam os hidrocarbonetos, utilizando-os como fonte de carbono e energia (rizodegradação), constituindo-se, dessa forma, o processo conhecido como biorremediação.

[007] A biorremediação é um processo de baixo custo e consumo de energia, além de ser ambientalmente adequada quando comparada a outros processos químicos e físicos. São inúmeras as vantagens de seu uso quando comparada a outras tecnologias, incluindo a possibilidade do tratamento *in situ*, o que reduz a perturbação das áreas contaminadas e adjacentes; a eliminação de custos com transporte; a auto-sustentabilidade do processo; a eliminação ou neutralização dos poluentes; e a possibilidade de ser empregada associada a outras tecnologias, o que aumenta o sucesso de sua aplicação. Além disso, quando utilizada no solo, propicia o desenvolvimento de espécies vegetais e inicia, de forma natural, a sucessão ecológica e, como consequência, a restauração ecológica do local afetado, maximizando o processo de remediação.

[008] O emprego de micro-organismos na biorremediação, principalmente nativos, se destaca como tecnologia exequível e promissora para o tratamento de resíduos tóxicos e para a descontaminação de áreas poluídas. No entanto, a introdução de micro-organismos exógenos ao ambiente afetado também é um processo usualmente utilizado, mas que pode causar perturbações ao ecossistema, além do risco da introdução de espécies patogênicas. Deste modo, a seleção de micro-organismos nativos com potencial biorremediador de sistemas contaminados por petróleo se reveste de grande importância, visto que vários micro-organismos têm sido estudados com a possibilidade de se estocar um com elevado potencial de degradação.

[009] O isolamento e seleção, com posterior inoculação de micro-organismos

melhor adaptados (bioaugmentação), representam uma excelente alternativa para a recuperação avançada de solo e água contaminados com petróleo. Esses micro-organismos, em sua maioria, constituem-se em espécies isoladas. Não é conhecida, porém, uma espécie microbiana capaz de degradar sozinha todos os componentes do petróleo. A complexidade dos processos metabólicos necessários para tal degradação leva à formação de consórcios, com micro-organismos de diferentes gêneros e espécies, cada um especializado em degradar uma ou várias frações do agente contaminante. Cabe ainda destacar que alguns subprodutos do metabolismo desses micro-organismos podem substituir agentes químicos sintéticos, como surfactantes, utilizados nos processos de emulsificação do petróleo e seus derivados, sendo biodegradáveis, em confronto com os sintéticos, que afetam outros ecossistemas e tendem a permanecer por longos períodos no ambiente.

[010] Portanto, considerados os aspectos supracitados, a produção e obtenção de um consórcio de micro-organismos nativos e versáteis, capazes de degradar de forma eficiente uma grande variedade de poluentes, torna-se uma alternativa interessante para a remediação de ambientes degradados por petróleo e seus derivados.

Estado da técnica

[011] As patentes já depositadas referentes ao campo de aplicação da presente invenção foram divididas em quatro grupos:

- a. Processos de degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, a partir de um consórcio de micro-organismos;
- b. Processos de degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, a partir de um micro-organismo específico;
- c. Processos de degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, a partir de micro-organismos nativos;

d. Outros.

[012] Na tabela 1 são citadas as patentes classificadas nos grupos anteriormente descritos.

Tabela 1: Grupos de patentes classificados de acordo com as suas principais novidades, sendo que o Grupo (a) refere-se a processos de degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, a partir de um consórcio de micro-organismos; o Grupo (b) trata de processos de degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, a partir de um micro-organismo específico; o Grupo (c) compreende patentes de invenções relativas a processos de degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, a partir de micro-organismos nativos; e o Grupo (d) trata de patentes que não se encaixam nos grupos anteriormente descritos.

Grupo	Patentes
Grupo a	CN101195810, CN101560484, CN101735996, CN102876612, RU2295403, RU2315670, US20100051541, US20140144838, WO2007054691, WO2010145797, WO2011153364, WO2013149662
Grupo b	PI0500997, CN101186890, CN101514329, CN101531974, CN101560483, CN101607120, CN101838623, CN101974442, CN102021128, CN102174445, CN102533586, GB2482286, RU2344170, RU2484130, RU2513702, US20100276362, WO2007003779
Grupo c	TW200808664
Grupo d	US20060249451, PI0600638, CN101654656

[013] As patentes dos Grupos (a) e (b) utilizam micro-organismos de diversos gêneros e espécies, como pode ser observado nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Patentes de invenção que possuem como novidade principal a utilização de um consórcio de micro-organismos para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados. As espécies e/ou gêneros de micro-organismos utilizados estão relatados na segunda coluna da tabela.

Patente	Micro-organismo
CN101195810	<i>Pseudomonas sp., Pandoraea pnomenusa</i>

CN101560484	<i>Scenedesmus sp.</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Pandoraea ponmenusa</i>
CN101735996	<i>Bordetella sp.</i> , <i>Ochrobactrum sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Achromobacter sp.</i> , <i>Herbaspirillum sp.</i> , <i>Microbacterium sp.</i>
CN102876612	<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Achromobacter sp.</i>
RU2295403	<i>Rhodococcus ruber</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>
US20140144838	<i>Bacillus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> , formando esporos de bactérias Gram-positivas pertencentes ao gênero <i>Bacillus</i> .
WO2007054691	-X-
US20100051541 ¹	<i>Rhodococcus</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Oleispira</i> , <i>Marinomonas</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Jannaschia</i>
WO2010145797	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Cycloclasticus</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Neptunomonas</i> , <i>Oleiphilus</i> , <i>Oleispira</i> e/ou <i>Thalassolitus</i> , <i>Phanerochaete</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Amorphotheca</i> , <i>Neosartorya</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Talaromyces</i> e/ou <i>Graphium</i> , <i>Candidais</i> .

¹ A patente US20100051541 protege um processo para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados especificamente em ambientes com temperaturas consideravelmente baixas, sendo que os micro-organismos utilizados no consórcio devem ser crio resistentes.

WO2011153364	<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>A. dieselolei</i> , <i>A. jadensis</i> , <i>Azoarcus toluovorans</i> , <i>Desulfotomaculum</i> sp., <i>D. aliphaticivorans</i> , <i>Gordonia alkanivorans</i> , <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , <i>Neptunomonas naphthovorans</i> , <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Sphingobium yanoikuyae</i> , <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Tranquillimonas alkanivorans</i> , <i>Tropicimonas isoalkanivorans</i> , <i>Thauera aromatica</i> ou <i>Thalassolituus oleivorans</i>
WO2013149662	<i>Aeromonas</i> spp., <i>Agrobacterium</i> spp., <i>Alcaligenes</i> spp., <i>Aminobacter</i> spp., <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Brevumdimonas</i> spp., <i>Cytophagaflavobacterium</i> spp., <i>Escherichia</i> spp., <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Microbacterium</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Nocardioides</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>gamma-Proteobacterium</i> spp., <i>Rhodococcus</i> spp., <i>Sphingomonas</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp., <i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> e suas combinações. Uma ou mais estirpe(s) microbiana selecionada a partir de <i>Agrobacterium</i> sp. BPA, <i>Flavobacterium</i> sp. OC, <i>Pseudomonas</i> sp. ATZ e suas combinações.

Tabela 3: Patentes de invenção que possuem como novidade principal a utilização de um micro-organismo específico para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados. A espécie e/ou gênero de cada micro-organismo utilizado está relatada na segunda coluna da tabela.

Patente	Micro-organismo
PI0500997	<i>Paraconiothyrium</i>
CN101186890	<i>Burkholderia cepacia</i>
CN101514329	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
CN101531974	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.

CN101560483	<i>Bacillus pumilus</i>
CN101607120	<i>Bacillus</i>
CN101838623	<i>Pseudomonas veronii</i>
CN101974442	<i>Achronobacter sp.</i>
CN102021128	<i>Paraccocus sp.</i>
CN102174445	<i>Acinetobacter sp.</i>
CN102533586	<i>Pandoraea pnomenusa</i>
GB2482286	<i>Alcanivorax borkumensis</i>
RU2344170	<i>Pseudomonas putida</i>
RU2484130	<i>Pseudomonas panipatensis</i>
RU2513702	<i>Bacillus vallismortis</i>
US20100276362	<i>Corynebacterium urealyticum</i>
WO2007003779	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>

[014] As patentes compreendidas pelos Grupos (c) e (d) não se encaixam no Estado da Arte para presente invenção, pois não utilizam micro-organismos específicos. Porém, as patentes compreendidas pelos Grupos (a) e (b) apresentam soluções semelhantes para os mesmos problemas que a presente invenção intenta resolver, mas com abordagens distintas. Além disso, nessas patentes é observada a utilização de grupos de micro-organismos, incluindo diversas espécies dentro de um mesmo gênero, ou seja, não há especificidade relacionada aos micro-organismos utilizados. E os micro-organismos que possuem as espécies detalhadas são diferentes daqueles sugeridos na presente invenção.

[015] Portanto, o presente pedido apresenta, como novidade, a utilização de espécies bacterianas de forma associada para o estabelecimento de consórcios de micro-organismos nativos e comprovadamente degradadores de hidrocarbonetos e petroderivados, imobilizados em microcápsulas. Estes consórcios imobilizados em microcápsulas são de fundamental importância, visto que vi-

sam a otimização no processo de limpeza e no tratamento de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.

Descrição das figuras

[016] A Figura 1 ilustra um fluxograma detalhado da obtenção de microcápsulas dos consórcios bacterianos, em que cada número representa uma etapa deste processo, sendo que: 1 representa o processo para degradação de hidrocarbonetos e derivados de petróleo; 2 representa a fermentação em biorreator, onde (A) representando a biomassa inicial e (B) o controle dos parâmetros da cinética de crescimento; 3 representa a obtenção de biomassa bacteriana; 4 representa a análise de células viáveis; 5 representa a liofilização das células bacterianas; 6 representa o estabelecimento dos consórcios bacterianos, sendo 6a um consórcio compreendendo qualquer combinação das bactérias da espécies *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* strain AB8, *B. pumilus*, *B. cereus*; 6b um consórcio compreendendo qualquer combinação das bactérias da espécies *B. subtilis*, *S. acidaminiphila*, *B. pumilus*, *B. subtilis* strain AB8; 6c um consórcio compreendendo qualquer combinação das bactérias da espécies *B. subtilis*, *M. aerolatum*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*; 6d um consórcio compreendendo qualquer combinação das bactérias da espécies *S. acidaminiphila*, *M. aerolatum*, *B. subtilis*, *B. pumilus*; 6e um consórcio compreendendo qualquer combinação das bactérias da espécies *B. cereus*, *M. aerolatum*, *S. acidaminiphilam*, *B. subtilis*; e 7 representa o processo de produção de microcápsulas de cada consórcio bacteriano.

Descrição detalhada da inovação

[017] Trata a presente inovação de um consórcio de micro-organismos selecionados a partir de plantas fitorremediadoras de ambientes contaminados com petróleo, para utilização em processos de degradação de hidrocarbonetos e petroderivados para recuperação ambiental, mais especificamente para a de-

gradação de hidrocarbonetos e petroderivados em áreas contaminadas. Esses micro-organismos foram isolados das rizosferas de plantas comprovadamente fitorremediadoras e cultivados em placas contendo meio ágar nutriente (AN).

[018] Após a identificação molecular e caracterização morfofisiológica, foram estabelecidos consórcios a partir da combinação desses micro-organismos, com base nas características das bactérias, como tamanho, morfologia, metabolismo, tempo de crescimento, potencial de degradação de petróleo, capacidade de produção de biossurfactante, além de características genéticas e bioquímicas, obtidas por meio de consulta em literatura específica. Estes consórcios podem ser estabelecidos com quaisquer combinações de cepas de micro-organismos das espécies *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* strain AB8, *Bacillus thuringiensis* e *Microbacterium aerolatum*.

[019] Para possibilitar a degradação dos hidrocarbonetos e petroderivados, as microcápsulas dos consórcios dos micro-organismos supracitados foram produzidas conforme descrito no fluxograma apresentado na figura 1.

[020] Para a produção de biomassa a primeira etapa deste processo consiste na fermentação das cepas em biorreatores. Para tanto, deve ser produzido, para cada bactéria, uma quantidade de inóculo, de 10^6 UFC/mL a 10^8 UFC/mL, para ser adicionada a um biorreator, contendo um meio de cultura, composto de 1% a 6% de uma fonte de nitrogênio, que pode ser extrato de levedura, e de 10% a 25% de uma fonte de carbono, que pode ser glicerol ou um carboidrato fermentescível, como glicose. Este biorreator deve permanecer em agitação, de 60rpm a 300rpm, a uma temperatura de 25°C a 36°C, por não menos que 16 horas e não mais que 72 horas. Após a fermentação, dependendo do tipo de micro-organismo utilizado, o produto fermentado pode passar por um processo de gravitação forçada, como centrifugação, filtração ou decantação, sendo o

material precipitado lavado e posteriormente seco, por qualquer processo de secagem, tal como liofilização. Com as células já livres de água, os consórcios são estabelecidos a partir de quaisquer combinações de cepas de micro-organismos das espécies *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* strain AB8, *Bacillus thuringiensis* e *Microbacterium aerolatum*, com o uso de esferas de quitosana para o encapsulamento destes. Para isso, deve-se misturar à biomassa bacteriana seca uma quantidade de quitosana que não seja 2 vezes menor ou 2 vezes maior que a quantidade de biomassa em uma relação massa/massa (m/m), sendo esta mistura dissolvida em um solvente com pH de 3 a 6, tais como ácido acético ou ácido cítrico. Esta solução deve ser incubada por 15 minutos a 90 minutos a uma temperatura de pelo menos 20°C, sob agitação constante, de 60rpm a 300rpm, para então ser microencapsulado por um processo de gotejamento, de forma que as gotas devam ter um tamanho entre 0,01mm e 0,4mm. Este processo deve ser feito gotejando a solução, após a incubação, com o auxílio de uma seringa de vidro em ângulo de 90°, sobre uma solução com pH básico, de 8 a 14, e mantendo estas soluções em contato por 8 horas a 20 horas. Por fim, as microcápsulas devem ser lavadas até que estejam em pH neutro, de 6 a 8.

[021] Estas microcápsulas são, então, incorporadas em solos contaminados com petróleo e seus derivados, como alternativa para o tratamento de áreas contaminadas com hidrocarbonetos. Além disso, vale ressaltar que a associação destes micro-organismos degradadores de petróleo reduz o tempo de degradação, otimizando, desta forma, o processo de limpeza de ambientes contaminados.

[022] Para a obtenção das cepas e preparo do inóculo visando à geração dos consórcios de micro-organismos, prepararam-se lâminas semipermanentes por meio da coloração de Gram contendo os micro-organismos isolados. Com o au-

xílio de microscópio óptico, foram realizadas análises para a caracterização da morfologia dos micro-organismos, bem como de suas colônias, conforme literatura especializada em microbiologia. Posteriormente, através da análise das placas de Petri mantidas na estufa a 36°C, verificou-se o tempo ótimo, bem como os padrões de crescimento dos micro-organismos.

[023] Para a verificação do potencial de degradação de petróleo dos micro-organismos isolados, foram preparados reatores em frascos de Erlenmeyer para os tempos 0h, 24h, 48h e 72h para cada micro-organismo e em triplicata. Foram ainda preparados reatores sem a inoculação de micro-organismos nos diferentes tempos (controle). Em cada reator foram adicionados 25mL de meio mineral, 1,0mL de petróleo e o inóculo do micro-organismo com uma concentração de 10^8 UFC/mL. Todos estes frascos foram mantidos sob agitação em incubadora com temperatura de 36°C a 180rpm.

[024] Das amostras retiradas da incubadora foi extraída uma alíquota de 10mL da suspensão, que foi armazenada em tubos de Falcon e centrifugada por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o líquido resultante foi analisado quanto à temperatura e pH com o auxílio de pHmetro, oxigênio dissolvido com um oxímetro, condutividade elétrica através de um condutivímetro e densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 610nm.

[025] Posteriormente, realizou-se a análise gravimétrica para quantificação da biomassa para cada tempo e repetição. Os tubos de Falcon foram identificados e deixados em estufa a 105°C por duas horas. Após, foram transferidos para um dessecador, onde permaneceram por 15 minutos, e então foram pesados. Foram adicionados 5mL de amostra nos tubos, e estes foram centrifugados a 3500rpm por 20min. O sobrenadante foi descartado e os tubos transferidos para estufa a 105°C, onde permaneceram até peso constante.

[026] Além disso, com a finalidade de avaliar a capacidade de produção de bi-

ossurfactante pelas bactérias, 100µL de cada suspensão bacteriana foram inoculados separadamente em uma placa multipoços, antecipadamente preenchidos com 50µL de óleo mineral. Após um minuto de reação, o resultado foi determinado visualmente com o auxílio de um microscópio estereoscópio, considerando-se positiva a produção de biossurfactante quando houver colapso da gota de petróleo.

[027] Após a realização dos testes de degradação de petróleo, bem como o teste de produção de biossurfactante dos micro-organismos individualmente, estes foram identificados em nível molecular como *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* strain AB8, *Bacillus thuringiensis*, *Microbacterium aerolatum*, que formam o conjunto de micro-organismos capazes de proceder à biodegradação de hidrocarbonetos, objeto desta proteção.

[028] Esta inovação não se limita às representações aqui comentadas ou ilustradas, devendo ser compreendida em seu amplo escopo. Muitas modificações e outras representações do invento virão à mente daquele versado na técnica à qual essa inovação pertence, tendo o benefício do ensinamento apresentado nas descrições anteriores e desenhos anexos. Além disso, é para ser entendido que o invento não está limitado à forma específica revelada, e que modificações e outras formas são entendidas como inclusas dentro do escopo das reivindicações anexas. Embora termos específicos sejam empregados aqui, eles são usados somente de forma genérica e descritiva e não como propósito de limitação.

REIVINDICAÇÕES

1. Consórcio de micro-organismos para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados **caracterizado por** compreender quaisquer combinações das cepas de micro-organismos dentre as seguintes espécies: *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis strain AB8*, *Bacillus thuringiensis* e *Microbacterium aerolatum*.
2. Processo de obtenção de consórcio de micro-organismos para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:
 - a. Fermentação de pelo menos duas das cepas de micro-organismos dentre as espécies *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis strain AB8*, *Bacillus thuringiensis* e *Microbacterium aerolatum*, utilizados em consórcio em biorreator;
 - b. Obtenção de biomassa bacteriana, por um processo de gravitação forçada;
 - c. Secagem das células;
 - d. Estabelecimento dos consórcios de micro-organismos;
 - e. Microencapsulamento dos consórcios.
3. Processo de obtenção de consórcio de micro-organismos para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que a fermentação em biorreator deve ser feita a uma temperatura de 25°C a 36°C.
4. Processo de obtenção de consórcio de micro-organismos para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que a fermentação em biorreator deve ser feita sob agitação de 60rpm a 300rpm.
5. Processo de obtenção de consórcio de micro-organismos para degradação

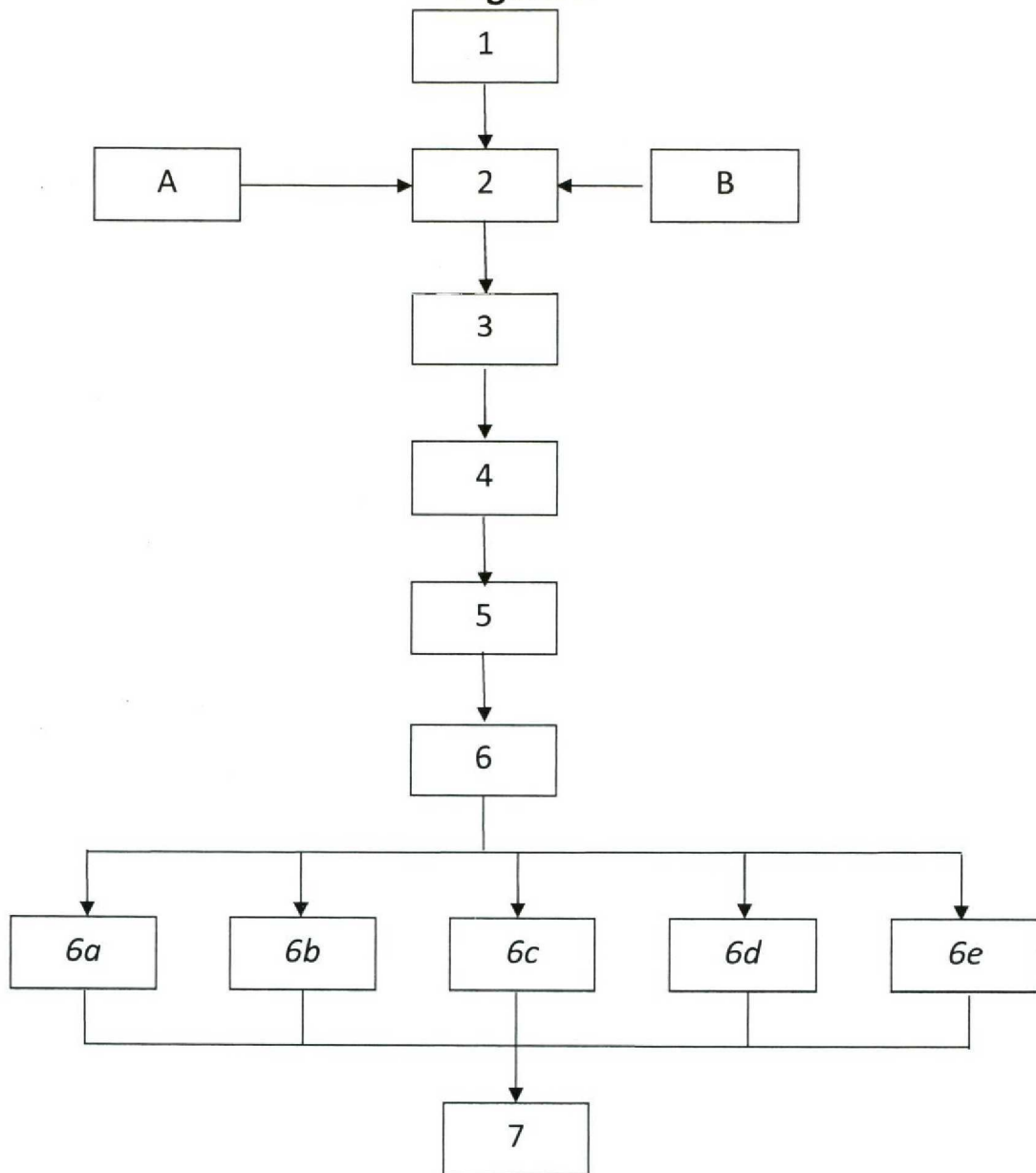
de hidrocarbonetos e petroderivados, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que a fermentação em biorreator deve ser feita em um período não inferior a 16 horas e não superior a 72 horas.

6. Processo de obtenção de consórcio de micro-organismos para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que o meio de cultura para a fermentação deve conter de 1% a 6% em relação massa/massa de uma fonte de nitrogênio e de 10% a 25% em relação massa/massa de uma fonte de carbono.
7. Processo de obtenção de consórcio de micro-organismos para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que a secagem das células se dá por liofilização.
8. Processo de obtenção de consórcio de micro-organismos para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que deve ser adicionado ao consórcio de micro-organismos uma solução de quitosana, em uma proporção que pode variar de 1:2 até 2:1 em uma relação massa/massa.
9. Processo de obtenção de consórcio de micro-organismos para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato de que a mistura dos consórcios com quitosana deve ser dissolvida em um solvente com pH ácido.
10. Processo de obtenção de consórcio de micro-organismos para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado pelo** fato de que a solução resultante deve ser incubada por 15min a 90min a uma temperatura de pelo menos 20°C, sob uma agitação de 60rpm a 300rpm.
11. Processo de obtenção de consórcio de micro-organismos para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, de acordo com a reivindicação 9, **ca-**

racterizado pelo fato de que a solução deve ser gotejada sobre uma outra solução com pH básico, de 8 a 14, e mantida nesta situação por um período não inferior a 8 horas e não superior a 20 horas.

12. Processo de obtenção de consórcio de micro-organismos para degradação de hidrocarbonetos e petroderivados, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o produto final obtido deve ser lavado até que esteja em pH neutro, de 6 a 8.

Figura 1



RESUMO

CONSÓRCIO DE MICRO-ORGANISMOS PARA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

E PETRODERIVADOS E SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO

Compreende a presente inovação o estabelecimento e a produção de consórcios de micro-organismos constatados como degradadores de hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados, a fim de otimizar e acelerar o processo de degradação de contaminantes por via biológica, com fins de descontaminação e tratamento de ambientes com grande carga orgânica por um método de tratamento eficaz e de baixo custo.