

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM A
MISTURA B10 EM CONCENTRAÇÃO DE INTERVENÇÃO**

Luisa Weber Mercado

Bióloga - UFRGS

Porto Alegre, Junho de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM A
MISTURA B10 EM CONCENTRAÇÃO DE INTERVENÇÃO**

Luisa Weber Mercado
Bióloga - UFRGS

Dissertação apresentada como
um dos requisitos para a obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, RS, Brasil
Junho de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Mercado, Luisa Weber

Biorremediação de solo contaminado com a mistura diesel/biodiesel em concentração de intervenção / Luisa Weber Mercado. -- 2013.

144 f.

Orientadora: Fátima Menezes Bento.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Biorremediação. 2. Biodegradação. 3. B10. 4. Micro-organismos. 5. Solo. I. Bento, Fátima Menezes, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Diversas pessoas participaram deste trabalho de alguma forma, seja incentivando com palavras, seja no apoio técnico ou na execução e análise dos experimentos. A essas pessoas o meu profundo e sincero agradecimento.

À minha orientadora Prof^a Dr^a **Fátima Menezes Bento** que teve a nobreza de compreender desde o princípio a minha rotina e pela fundamental parceria durante todo o período mostrando-se além de uma grande profissional, uma orientadora exemplar.

Aos **Professores do PPGMAA** pelos seus ensinamentos e disponibilidade em discutir dúvidas e questionamentos.

Às colegas do **LAB-BIO** (167) pela disponibilidade em ajudar, compreensão e auxílio nos mais variados momentos.

À **Francielle Bucker** pelo apoio técnico a todo grupo na execução dos ensaios de Biologia Molecular e por sua grande paciência e disponibilidade em ensinar e acompanhar os procedimentos.

A todos os colegas do **Laboratório de Biorremediação de Solos** por toda ajuda, parceria, coleguismo e compreensão.

À querida amiga e grande profissional do mundo fúngico, **Letícia Tramontini**, pela sua incomensurável ajuda em todos os momentos, pelo apoio técnico, companheirismo, sempre disponível para incentivar e executar o trabalho tornando tudo mais leve e agradável.

À **Patrícia Giovanella**, pela sua disponibilidade em organizar e coordenar as atividades no laboratório, por toda organização que realizou nas dinâmicas do laboratório que viabilizaram a execução deste trabalho e pelas suas incontáveis contribuições durante todo período de convivência

Aos bolsistas **Alexandre Pereira, Bruno Loss, Daniela Freitas, Naiana Schaffer** e **Vitor Pistóia** pelo grande apoio e presteza na execução deste trabalho.

Aos colegas **Daniel Meyer, Marcela Moreira** e **Tatiana Colla** por disponibilizarem seu tempo, compartilharem seu conhecimento e pelas diversas contribuições que prestaram sempre que foram solicitados.

Aos professores e colegas do **LABIM** que me receberam de braços abertos e compreenderam desde o princípio essa dupla jornada, pelo grande incentivo e por proporcionarem um ambiente muito rico em aprendizados e parceria.

À professora Dr.^a **Marisa Maltz** pelo apoio, flexibilidade e compreensão quanto aos horários dedicados ao mestrado.

À **Nailê Damé** pela parceria, amizade, apoio técnico nos sequenciamentos e por ter disponibilizado seu tempo para revisar este trabalho.

Aos Professores **Clarissa F. Parollo** e **David Beighton** por sua rica contribuição, disponibilidade e apoio técnico.

À querida amiga e exemplo profissional, **Roberta Bussamara**, pelos valiosos aprendizados proporcionados durante todo período em que me orientou na Iniciação Científica e pela confiança depositada.

Aos meus pais e queridos irmãos pelo apoio incondicional em todas minhas escolhas, pela compreensão, paciência e suporte em todos os momentos.

Ao **Augusto** que foi meu parceiro incondicional, por todas as horas de desequilíbrio que me fez voltar ao eixo, por todos os dias que esteve ao meu lado, compreendeu minha constante ausência e pelo grande apoio técnico, mesmo não sendo a sua área profissional. Não existem palavras que sejam suficientes para agradecer o quanto esse apoio foi fundamental.

À minha segunda família, **Edu, Ivone, Francielle e Adilson** pelo grande incentivo, suporte e compreensão constante.

A toda minha família que sempre se fez presente, mesmo estando distante, por meio de palavras de apoio e compreensão nos inúmeros momentos de ausência.

A todos os meus queridos amigos que foram capazes de compreender a minha ausência, especialmente **Adriana Damiani** e **Diego Kenne** pela paciência.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM A MISTURA DIESEL/BODIESEL EM CONCENTRAÇÃO DE INTERVENÇÃO ¹

Resumo

Autor(a): Luisa Weber Mercado

Orientador(a): Fátima Menezes Bento

Os derrames e vazamentos acidentais são problemas ambientais relacionados aos combustíveis que podem ocorrer durante o transporte e armazenamento contaminando solo, águas superficiais e subterrâneas. De acordo com a Portaria 016/2010 da FEPAM, áreas contaminadas com Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) acima de 5 g.Kg^{-1} de solo devem receber tratamento para a descontaminação, sendo a biorremediação um dos tratamentos indicados. O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a degradação da mistura B10 de um solo contaminado simulando um derrame superficial sob diferentes estratégias: atenuação natural, bioestimulação e bioaumentação. Foi realizado um ensaio preliminar de biorremediação em um solo propositalmente contaminado com a mistura B10, a partir do qual, foram isoladas bactérias do gênero *Bacillus*. Em outra etapa de prospecção do mesmo solo contaminado com a mistura B10, as bactérias isoladas formaram consórcios e foram submetidas às concentrações de 15 %, 30 %, 45 % e 60 % em meio mineral com indicador redox. Um novo experimento de biorremediação de solo contaminado com a mistura B10 na concentração de $36 \text{ g de HTP.kg}^{-1}$ de solo foi avaliado por 28 dias. Estimou-se as populações de heterotróficos totais e degradadores, mineralização do combustível (respirometria) e degradação de HTP (cromatografia gasosa). O tratamento de atenuação natural (correção do pH e umidade), reduziu 19 % dos HTPs, sugerindo que a microbiota autóctone, mesmo sem ter sido previamente exposta ao contaminante, foi capaz de expressar capacidade degradativa. A bioaumentação com consórcio nativo, apresentou percentual de degradação de HTP similar aos demais tratamentos.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (144 p.), junho, 2013.

BIOREMEDIATION OF SOIL AMENDED WITH DIESEL/BIODIESEL BLEND AT INTERVENTION CONCENTRATION²

Abstract

Author: Luisa Weber Mercado
Advisor: Fátima Menezes Bento

Spillages and leaks are accidental environmental problems related to fuels that may occur during transport and storage. They can contaminate the soil, the surface water and groundwater. According to FEPAM ordinance 016/2010, amended areas with Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) above 5 g.Kg⁻¹ soil should be submitted to treatment for decontamination, and bioremediation is one of the recommended treatments. The aim of this study was to evaluate and compare the degradation of a B10 blend amended soil simulating a surface spill under different strategies: natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Preliminary bioremediation assays were carried out in a purposely amended soil by B10 blend, from which bacteria of the *Bacillus* genus were isolated. From another step of prospecting the same soil amended with the B10 blend, the isolated bacteria formed a consortia and it was subjected to fuel concentrations at 15%, 30%, 45% and 60% in mineral medium plus redox indicator. A new bioremediation experiment of soil amended with B10 at a 36 g de TPH.kg⁻¹ of soil concentration was evaluated for 28 days. The total heterotrophic and degrading populations, fuel mineralization (respirometry) and degradation (gas chromatography) were estimated. The natural attenuation (pH and moisture correction) reduced 19% of TPHs suggesting that the autochthonous microbiota, even without have been previously exposed to the contaminant, was able to express degradative capability. The TPH degradation of bioaugmentation with native consortium was similar to the other treatments.

² Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (144p.), June, 2013.

SUMÁRIO

Agradecimentos	iii
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Figuras.....	xii
Listas de Abreviaturas e Símbolos.....	xiv
1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Óleo diesel: histórico, produção e características	4
2.2 Biodiesel: histórico, produção e características.	6
2.3 Diesel/Biodiesel: contaminação do solo e legislação vigente.....	10
2.4 Técnicas de remediação de ambientes impactados	17
2.4.1 Biorremediação de solos contaminados com diesel e biodiesel	20
2.4.2 Diesel/biodiesel – Aspectos metabólicos da degradação.....	31
2.5 Metodologias de monitoramento da degradação da mistura diesel/biodiesel.....	38
3. Material e métodos.....	41
3.1 Etapa 1- Ensaio preliminar de biorremediação	42
3.1.1 Coleta da amostra de solo	42
3.1.2 Combustível	43
3.1.3 Montagem dos microcosmos	43
3.1.4 Avaliação da degradação do contaminante	44
3.2 Etapa 2 – Prospecção e seleção de bactérias produtoras de endósporos.	
3.2.1 Isolamento das bactérias	46


3.2.2	Avaliação preliminar dos <i>Bacillus</i> spp.	46
3.2.3	Avaliação dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. quanto à degradação do combustível em placa	48
3.2.4	Enriquecimento e caracterização dos isolados recuperados	48
3.2.5	Ensaio de biodegradação de B10 por <i>Bacillus</i> spp. em meio líquido	49
3.3	Etapa 3 – Isolamento e seleção de um consórcio com potencial de degradação da mistura B10	52
3.3.1	Enriquecimento e bioprospecção de bactérias de solo contaminado artificialmente	53
3.3.2	Avaliação preliminar dos isolados quanto ao potencial degradador com indicador redox TTC.....	54
3.3.3	Ensaio de biodegradação de B10 em meio líquido por 11 diferentes consórcios microbianos.....	55
3.3.4	Avaliação da tolerância dos consórcios selecionados em meio líquido com concentrações crescentes de B10	57
3.4	Etapa 4 - Experimento de biorremediação	59
3.4.1	Coleta do solo não contaminado e montagem dos microcosmos	60
3.4.2	Monitoramento da população microbiana	62
3.4.3	Avaliação da biodegradação do contaminante.....	63
3.4.4	Identificação molecular dos micro-organismos utilizados no consórcio ..	59
3.5	Análise estatística	64
4.	Resultados e Discussão.....	65
4.1	Etapa 1- Ensaio preliminar de Biorremediação	65
4.1.1	Análise respirométrica e cromatografia.....	65
4.2	Etapa 2 – Prospecção e seleção de bactérias produtoras de endósporos	68
4.2.1	Avaliação preliminar da degradação de B10 pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp. utilizando indicadores redox.	69
4.2.2	Avaliação dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. quanto à degradação do combustível em placa	71

4.2.3 Enriquecimento e caracterização dos isolados recuperados	71
4.2.4 Ensaios de biodegradação de B10 por Bacillus spp. em meio líquido	71
4.3 Etapa 3 – Isolamento de bactérias totais e seleção de um consórcio com potencial de degradação da mistura B10	77
4.3.1 Avaliação preliminar dos isolados quanto ao potencial degradador com indicador redox TTC.....	77
4.3.2 Ensaio de biodegradação de B10 em meio líquido por 10 diferentes consórcios microbianos.....	79
4.3.3 Avaliação da tolerância dos consórcios selecionados em meio líquido com concentrações crescentes de B10	82
4.4 Etapa 4 - Experimento de Biorremediação.....	91
4.4.1 Monitoramento da população microbiana	91
4.4.2 Identificação molecular dos micro-organismos utilizados no consórcio ..	86
5.Conclusões	109
6. Perspectivas.....	110
7. Referências Bibliográficas	111
8. Anexos	127
8.1 Meio Mineral (Bushnell e Haas, 1941)	127
8.2 Meio Mineral (Richard & Vogel, 1999).	127
8.3 Solução Mineral com Indicador-Redox (TTC ou DCPIP)	128
8.4 Meio Ágar Nutriente	128
8.5 Caldo Nutriente	128
8.6 Curva padrão para quantificação de proteínas totais.....	129
8.7 Monitoramento de Temperaturas Mínimas e Máximas e a Média Ponderada (22,7°C).....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valores referenciais para solo, considerando-se um teor de argila de 25,0 % e de matéria orgânica de 10,0 % de acordo com a Lista Holandesa de Valores de Referência para Qualidade do Solo e da Água Subterrânea	15
Tabela 2 Análise físico-química do solo amostrado	43
Tabela 3 Identificação das bactérias isoladas de solo contaminando com combustível e selecionadas para formar consórcios (Colla,2012).	55
Tabela 4 Composição dos 10 consórcios integrantes do ensaio, a partir de diferentes combinações entre os isolados bacterianos.	56
Tabela 5 Valores de concentração de células e medidas de pH da fase aquosa dos tratamentos contendo BH acrescido de B10 durante 16 dias.	73
Tabela 6 Avaliação da capacidade de degradação do combustível em diferentes concentrações pelos isolados após 7 dias de incubação.	78
Tabela 7 Valores de UFC e mudança de coloração dos meios com consórcios bacterianos de A a K em contagens de UFC.mL ⁻¹ , nos tempos 0, 2 e 7 dias.	80
Tabela 8 Percentual de degradação das diferentes frações de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) nas diferentes estratégias de biorremediação após 28 dias.	103
Tabela 9 Identificação das bactérias utilizadas em consórcio no experimento de biorremediação.	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Desenho ilustrando a formação da pluma de contaminação no solo em decorrência de vazamentos nos tanques..... 12
- Figura 2 Rota metabólica de degradação de alcanos e de ácidos graxos. O envolvimento de enzimas mono-oxigenases está representado pelas setas cinza vazadas (Van Bogaert et al., 2011). 33
- Figura 3 Representação da rota de degradação aeróbia do benzoato por fungos e bactérias (Fuchs, Boll e Heider, 2011; Colla, 2012). 36
- Figura 4: Produção acumulada de C-CO₂ do solo contaminado por B10 durante o ensaio de biorremediação por 30 dias. Controle (sem a mistura B10); Atenuação natural (com a mistura B10)..... 66
- Figura 5 Aspectos morfológicos do isolado UFRGS10. A – colônias em ágar nutriente (Aumento de 4x) ; B – Aspecto celular obtido através de coloração de Gram (Aumento 1000x e Zoom óptico de 3x); C – Coloração de endósporo (Aumento 1000x e Zoom óptico de 3x). 69
- Figura 6 Produção de proteínas totais pelos isolados bacterianos UFRGS 12, UFRGS 14, UFRGS 21 e consórcio em meio mineral BH e a mistura B10 durante 14 dias. 75
- Figura 7 Estimativa do crescimento populacional dos isolados de bactérias UFRGS 12, UFRGS14, UFRGS 21 isoladas e em consórcio cultivados meio mineral BH e a mistura B10 durante 14 dias..... 76
- Figura 8 Crescimento no número de células dos consórcios bacterianos de A a K em contagens de UFC.mL⁻¹ durante 7 dias de incubação a 30 °C. 79
- Figura 9 Valores de Proteína Total na fase aquosa em meio mineral em diferentes concentrações da mistura B10 durante 5 dias de incubação. A - 30 %; B – 45%; C – 60 %.  83
- Figura 10 Estimativa do Número Mais Provável de micro-organismos heterotróficos totais em 28 dias de experimento de biorremediação de solo contaminado com B10. CN - Controle; AN - Atenuação natural; BN – Bioaugmentação com consórcio de bactérias nativas; BE- Bioaugmentação..... 92
- Figura 11 Estimativa do Número Mais Provável de micro-organismos degradadores em 28 dias de experimento de biorremediação de solo

contaminado por B10. CN - Controle; AN - Atenuação natural; BN – Bioaumentação com consórcio de bactérias nativas; BE- Bioaumentação..... 92

Figura 12 Proporção entre as populações microbianas de degradadores (DG) e heterotróficos (HT) estimadas pela contagem do Número Mais Provável durante 28 dias de ensaio de biorremediação de solo contaminado com B10. CN - Controle; AN - Atenuação natural; BN – Bioaumentação com consórcio de bactérias nativas; BE- Bioaumentação com consórcio de bactérias exógena. 98

Figura 13 Produção cumulativa de C-CO₂ do solo contaminado por B10 durante o ensaio de biorremediação por 28 dias. CN - Controle; AN - Atenuação natural; BN – Bioaumentação com consórcio de bactérias nativas; BE- Bioaumentação com consórcio de bactérias exógenas. 100

Figura 14 Curva padrão para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976) referente ao ensaio realizado no item 3.2.5.3. 129

Figura 15 Curva padrão para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976) referente ao ensaio realizado no item 3.3.4. 129

Figura 16 Monitoramento de temperaturas máximas e mínimas ao longo do ensaio de Biorremediação. 130

LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C Grau Celsius

ANP Agência Nacional do Petróleo

BSA Bovine Serum Albumin

CETESB Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente

DCPIP 2,6 Diclorofenol Indofenol

g Grama

h Horas

HPA Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

HTP Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

kg Quilograma

M Molar

m³ Metro Cúbico

mg Miligrama

mL Mililitro

mm Milímetro

MM1 Meio Mínimo Mineral

MME Ministério de Minas e Energia

nm Nanômetro

NMP Número Mais Provável

rpm Rotações Por Minuto

TPF Trifenilformazan

TTC 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio

µg Micrograma

µL Microlitro

RS Rio Grande do Sul

1. INTRODUÇÃO

A indústria petrolífera está entre as atividades que mais geram resíduos poluentes devido aos processos relacionados à exploração, refino, distribuição e armazenamento de derivados tais como o óleo diesel.

O óleo diesel é um dos produtos derivados de petróleo mais consumido no Brasil, principalmente pelo setor de transporte (cerca de 80%). É uma mistura complexa formada essencialmente por hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos obtidos da destilação fracionada durante o refino do petróleo. Em caso de derrames acidentais, por exemplo, a fração alifática pode ser mais facilmente degradada por micro-organismos. Por outro lado, a fração aromática tem uma característica mais recalcitrante, tornando-a de difícil assimilação pela microbiota, o que pode resultar em acumulação no ambiente e prejudicar a qualidade dos ecossistemas.

O biodiesel é um biocombustível produzido a partir de diversas fontes, tais como óleos vegetais e gorduras (mamona, dendê, palma, girassol, óleo de soja, gordura bovina, entre outros), sendo mais comumente obtido através do processo de transesterificação. Embora o biocombustível apresente a mesma função do diesel como combustível, é constituído basicamente por ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos. Devido a sua composição, o

biodiesel traz benefícios quando comparado ao derivado de petróleo, especialmente durante a queima no motor, devido à redução considerável de materiais particulados, emissão de CO₂, e de compostos voláteis.

Como um substituto natural do diesel, o biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira a partir de 2005, sendo sua utilização estabelecida através da adição do biocombustível ao óleo diesel em concentrações que tendem a aumentar com o passar dos anos, compondo o chamado BX. Atualmente, a concentração de biodiesel estabelecida pela legislação brasileira é de 5 % - resultando no combustível chamado B5.

Durante a distribuição e principalmente no armazenamento de combustíveis podem ocorrer problemas relacionados a vazamentos e derrames acidentais em diferentes compartimentos ambientais, sendo o solo o compartimento mais afetado.

Atualmente no RS, o procedimento recomendado para a remediação de áreas impactadas com combustíveis baseia-se na remoção do solo contaminado enviando-o para estações especializadas de tratamento. Segundo a portaria nº 016/2010 da FEPAM, resíduos com característica de inflamabilidade, dentro os quais, solos contaminados com hidrocarbonetos, devem ser remediados a fim de reduzir a concentração do contaminante a valores aceitáveis antes de ser enviado para aterro.

Na busca por alternativas às técnicas de remediação convencionais com relação custo/benefício favorável, a utilização do potencial biológico para

remoção do contaminante, como no caso da biorremediação, pode ocupar lugar de destaque.

A biorremediação é uma técnica que visa acelerar a degradação do combustível através de estratégias como, por exemplo, a Bioestimulação (estimulando a microbiota autóctone com nutrientes, biosurfactantes, oxigenação) e a Bioaugmentação (que pode ser realizada por meio da introdução de microbiota específica – aumentando a população autóctone ou alóctone - com conhecida capacidade degradativa. Essas abordagens são ambientalmente adequadas e sustentáveis, uma vez que são compatíveis com as rotas biogeoquímicas naturais de reciclagem de nutrientes e, portanto, constituem uma opção atrativa para tratamento de solos contaminados por diesel-biodiesel.

Diante deste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar e comparar a degradação da mistura B10 em um solo contaminado com derrame superficial simulado sob diferentes estratégias de biorremediação: bioaugmentação com bactérias exógenas; bioaugmentação com bactérias nativas; bioestimulação e atenuação natural.

Como objetivos específicos: 1) Seleção de bactérias de solo com potencial de degradação de altas concentrações da mistura B10; 2) Investigação da degradação do combustível pelos micro-organismos selecionados compondo consórcios em diferentes combinações; 3) Avaliação da biodegradação do B10 em solo por meio de estratégias de bioaugmentação, bioestimulação e atenuação natural.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Óleo diesel: histórico, produção e características

Durante o processo de industrialização, a partir do século XIX, a necessidade por novas fontes com maior densidade energética comparadas a combustão da madeira impulsionou a exploração de combustíveis fósseis. Desta forma, a eletricidade e a invenção de máquinas elétricas juntamente com veículos automotores lançaram base para sociedade moderna de consumo tendo o petróleo e seus derivados como principal fonte de energia (Péres Da Silva *et al.*, 2003).

O óleo diesel, dentre os derivados de petróleo, é o combustível mais consumido na atualidade. O motor de combustão interna, inventado pelo engenheiro alemão Rudolph Diesel no final do século XIX, foi alimentado inicialmente com óleo vegetal (óleo de amendoim). A abundância de petróleo nos anos que seguiram e o baixo custo para seu refino acabaram por substituir os óleos de origem vegetal e animal pelo derivado de petróleo denominado desde então de “óleo diesel” (Silva e Freitas, 2008).

O óleo diesel tem uma ampla utilização no Brasil: desde o motor a diesel nos mais diversos meios de transporte, como automóveis, caminhões, pequenas embarcações marítimas, como no setor agropecuário e na geração

de energia (geradores) (Chhibber, Joshi e Saxena, 2012; Mattiuzi *et al.*, 2012). Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo (ANP), no ano de 2012, 41% do petróleo processado foi convertido em óleo diesel, sendo consumido 79% desta proporção pelo setor de transportes (Mattiuzi *et al.*, 2012). O total do óleo consumido no país foi da ordem de 56 milhões de m³ (ANP, 2013) distribuídos entre o setor de transporte (79 %), setor agropecuário (14 %) e na geração de energia elétrica (4 %) (Mattiuzi *et al.*, 2012).

Este tipo de combustível é obtido através da destilação fracionada do petróleo e se constitui em uma a mistura complexa cuja composição depende da fonte de petróleo bruto da qual foi extraído (Agarwal, Chhibber e Bhatnagar, 2013). Essencialmente é composto de uma mistura de hidrocarbonetos de cadeias simples e ramificadas, compostos cíclicos e aromáticos na faixa de C₈-C₄₀ (Vieira *et al.*, 2007; Knothe, 2010; Bucker *et al.*, 2011; Agarwal, Chhibber e Bhatnagar, 2013). Ainda, estão presentes em menores proporções átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre, sendo este último encontrado nas concentrações que variam de 0,1 a 0,5 % (Agarwal, Chhibber e Bhatnagar, 2013).

A combustão do óleo diesel é responsável pela liberação de uma série de poluentes, dentre os quais destacam-se compostos orgânicos voláteis e particulados, gases causadores de efeito estufa e outros compostos tóxicos, como os óxidos de enxofre (Pinto *et al.*, 2005; Soares, Mariano e De Angelis, 2009; Meyer *et al.*, 2012). A presença de compostos de enxofre é extremamente indesejável para o ambiente devido a formação da chuva ácida,

bem como para o próprio motor, devido à produção de ácido sulfúrico durante a combustão, corroendo suas partes metálicas (Mattiuzi *et al.*, 2012). Em virtude dos grandes prejuízos que esses elementos podem causar (Mattiuzi *et al.*, 2012), a tendência mundial é reduzir a quantidade de enxofre presente no óleo. Assim, o processo de retirada de enxofre do combustível passou a ter maior importância nos últimos anos e, em 2012, tornou-se obrigatória no mercado brasileiro a comercialização de óleo diesel S50, contendo 50 ppm de enxofre em sua composição (ANP, 2013).

O processo de dessulfurização também elimina os compostos contendo oxigênio e nitrogênio, no entanto, ocasiona a diminuição da lubricidade do petrodiesel, o que pode gerar o desgaste prematuro de bombas e componentes dos sistemas de injeção de combustível. Neste sentido, a adição de biodiesel ao combustível fóssil passou a ser uma alternativa que, além de solucionar o problema devido a sua extrema lubricidade (Knothe, 2010; Mattiuzi *et al.*, 2012), diminui consideravelmente o nível de poluição atmosférica quando comparado ao óleo derivado de petróleo (Meyer *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012).

2.2 Biodiesel: histórico, produção e características.

A possibilidade de uso de óleos vegetais como combustível em motores a diesel é conhecida desde o final do século XIX. No entanto, somente após a crise do petróleo em 1970, óleos vegetais começaram a adquirir importância como alternativa para combustíveis fósseis (Schleicher *et al.*, 2009; Bucker *et al.*, 2011). Assim, a partir da década de 80, o Biodiesel passou a ser

considerado um substituto adequado para o petroderivado por ter propriedades semelhantes ao óleo diesel (Ferrés e Klein, 2009), já que sua utilização não requer modificações no motor e apresenta alto rendimento energético (Usta *et al.*, 2005).

Com o crescente aumento dos preços de óleo e gás natural e os novos incentivos gerados pela emergência do mercado de carbono, os biocombustíveis tornaram-se opções atrativas para o mercado em crise (Goldemberg, 2009). Assim, o Governo Federal Brasileiro lançou o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) a fim de implementar a produção e uso do biodiesel na matriz energética brasileira. Através da Lei nº 11.097/2005 a adição de 2 % de biodiesel ao petrodiesel passou a ser obrigatória e, desde 2010, essa fração passou a ser de 5 %.

Com a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, são distribuídos atualmente o **óleo diesel A** (sem adição de biodiesel) utilizado para embarcações e o **óleo diesel B** (com adição de biodiesel) utilizado no transporte de cargas e de passageiros, na indústria, na geração de energia, nas máquinas para construção civil, nas máquinas agrícolas e locomotivas. O combustível denominado diesel B recebe o nome da percentagem de participação do biodiesel, sendo a designação correta para a mistura vendida precedida pela letra B (do inglês *Blend*). Neste caso, a mistura de 5 % de biodiesel ao diesel de petróleo é chamada de B5, B10 quando possui 10 %, e o B100, que é o biodiesel puro (Souza, 2012)

O Brasil é o segundo maior parque industrial do mundo, estando entre os maiores produtores e consumidores do mundo (Mattiuzi *et al.*, 2012). Estima-se que em 2010 a produção foi de 2,4 milhões m³, ou 47% da capacidade instalada. Com isso, o setor de produção do biocombustível dispõe de capacidade instalada para cerca de 5,1 milhões de litros, produção superior à demanda de 5 % instituída por lei. Considera-se, portanto, que o setor continua em expansão e próximo da meta projetada para um possível B10 em 2014 (Mattiuzi *et al.*, 2012). A região do Brasil com maior capacidade instalada atualmente é o centro-oeste com 42% da cadeia produtiva (Ferrari, Oliveira e Scabio, 2005; Tramontini, 2013).

O biodiesel é definido como um biocombustível derivado das mais variadas fontes como óleos vegetais, gordura animal ou outros produtos existentes na biomassa (Demirbas, 2009b). O principal substrato para produção de biodiesel no Brasil é o óleo de soja (Damasceno *et al.*, 2013), contudo, diversas outras matérias-primas tem potencial para produção do biocombustível devido a sua composição lipídica (sebo bovino, óleo de fritura, gordura de frango, óleo de peixe, óleo de girassol, dendê, babaçu, entre outros) (Szczena-Antczak *et al.*, 2009; Souza, 2012; Rashid *et al.*, 2013).

O biodiesel denominado quimicamente de éster metílico de ácidos graxos (FAME da sigla em inglês *Fatty acid methyl esters*) é mais comumente obtido através da reação de transesterificação entre um triacilglicerol, um álcool (metanol ou etanol) e um catalisador (biológico ou químico), resultando em uma mistura de ésteres de ácidos graxos e glicerol (Geris *et al.*, 2007; Prince, 2010).

A produção do biocombustível ainda pode ocorrer a partir de reação química de lipídios pelo processo de esterificação (ácido reagindo com álcool, produzindo éster e água), ou craqueamento (quebra de moléculas complexas em moléculas simples pela ação de catalisador (*Knothe et al.*, 2006; Atadashi, Aroua e Aziz, 2010; Souza, 2012))

Os óleos e gorduras utilizados como substrato para produção de biodiesel são constituídos basicamente por triacilglicerídeos contendo três ácidos graxos de cadeia longa (como oleato, palmitado, estearato, miristato, laureato e linoleato) ligados na forma de ésteres a uma molécula de glicerol (Soares, Mariano e De Angelis, 2009). De acordo com a origem do biodiesel, a sua composição é diferenciada. Enquanto o biodiesel de soja, por exemplo, contém ácido linoleico (C18:2) (53 %), oleico (C18:1) (23 %), palmítico (C16:0) (11 %), linolenico (C18:3) (8 %) e esteárico (18:0) (4 %), o biodiesel de dendê apresenta o ácido palmítico (60 %) e o linoleico (19 %) como componentes majoritários (Domingos *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2008; Colla, 2012)

Um dos principais desafios da utilização do biodiesel como combustível em relação ao petroderivado ocorre durante a estocagem. Os hidrocarbonetos provenientes do óleo diesel são relativamente inertes e mantêm suas características físico-químicas praticamente inalteradas por longos períodos de estocagem. Em contrapartida, o biodiesel é mais suscetível à degradação durante a estocagem por longos períodos no clima tropical como do Brasil, devido a sua composição menos complexa comparada ao combustível de origem fóssil (Bucker *et al.*, 2011)

A degradação do biocombustível pode ocorrer devido à incorporação de água dissolvida estabelecendo processos de degradação hidrolítica na massa de biodiesel armazenada e ainda pela ação do oxigênio do ar que promove a oxidação do biocombustível. Isso pode gerar sérias consequências ao usuário final tais como incorporação de água dissolvida, turvamento, liberação de radicais livres, acidificação, liberação de polímeros, precipitados e depósitos, contaminações abióticas e microbianas, corrosão, envernizamento de superfícies, entupimentos e vazamentos (Cavalcanti, 2009)

2.3 Diesel/Biodiesel: contaminação do solo e legislação vigente

Em termos de contaminação, desde os primórdios da civilização, o solo tem sido o compartimento ambiental mais afetado. No entanto, nos últimos séculos, com a Revolução Industrial, o nível de contaminação dos solos por rejeitos aumentou consideravelmente (Seabra, 2008). O termo contaminante refere-se a qualquer substância indesejada que seja introduzida no ambiente. Os efeitos deletérios por ela causados levam à ‘poluição’, condição em que um recurso natural passa ao *status* de “não adequado” ao uso ou à ocupação, geralmente humana (Megharaj *et al.*, 2011).

Os hidrocarbonetos derivados de combustíveis fósseis são a principal forma de contaminação do ambiente (Das e Chandran, 2011; Chagas-Spinelli *et al.*, 2012), sendo o óleo diesel, dentre os derivados do petróleo, frequentemente reportado como contaminante de solos e água (Wolicka e Suszek, 2008; Taccari *et al.*, 2012). Diante disso, estudos referentes à toxicidade desses compostos no solo e sua influência sob a biota vem sendo

desenvolvidos (Leme *et al.*, 2011; Sueiro, Garrido e Araujo, 2011; Tang *et al.*, 2011; Leme *et al.*, 2012), já que os derramamentos de óleo constituem uma grande preocupação ambiental em nível global (Thapa, Kumar e Ghimire, 2012).

Segundo um histórico de acidentes relacionados ao transporte no estado do Rio Grande do Sul, foram registrados pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM) 567 acidentes envolvendo cargas perigosas durante o período de 1994 a 2013. Aproximadamente 25 % desse total estavam relacionados ao derramamento de combustíveis de origem fóssil ou de caráter renovável, em acidentes ocorridos prevalentemente em ferrovias e rodovias (90 %). Somente durante o ano de 2011, o mesmo órgão ambiental registrou a ocorrência de 30 acidentes envolvendo o transporte de diesel e biodiesel (FEPAM, 2013).

Outra fonte de contaminação de combustíveis no solo são os vazamentos de tanques de armazenamento de postos de combustíveis que liberam hidrocarbonetos de forma crônica e são responsáveis por mais da metade dos casos de contaminação neste ambiente (Coutinho e Gomes, 2006; Brito *et al.*, 2010). Segundo a Companhia Estadual de Saneamento Ambiental (Cetesb), no último relatório de áreas contaminadas de 2012, os vazamentos em postos de combustíveis foram responsáveis por 77 % dos casos de áreas contaminadas no Estado de São Paulo. O comprometimento do solo pela contaminação é causado devido à falta de monitoramento adequado e ao tempo de vida útil dos tanques (em torno de 20 anos). Tendo em vista que a

maioria foi instalada há aproximadamente 40 anos e que a preocupação com os riscos existentes nesse ambiente procedeu apenas a partir de 1990 (Cunha *et al.*, 2008)

Neste contexto, em 2000 foi lançada a resolução do CONAMA nº 273 que define toda instalação e sistemas de armazenamento de quaisquer combustíveis como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais. Com isso, quaisquer práticas relacionadas à instalação, modificação e operação de postos de combustíveis dependerão de licenciamento do órgão ambiental competente (Tramontini, 2013). Por conseguinte, os tanques de armazenamento de combustíveis devem seguir diversas exigências: conter paredes duplas, com monitoramento intersticial; válvula anti-transbordamento; tubulações subterrâneas flexíveis e não metálicas; pista de abastecimento coberta e em concreto armado e sistema de drenagem e de tratamento de efluentes (CETESB).

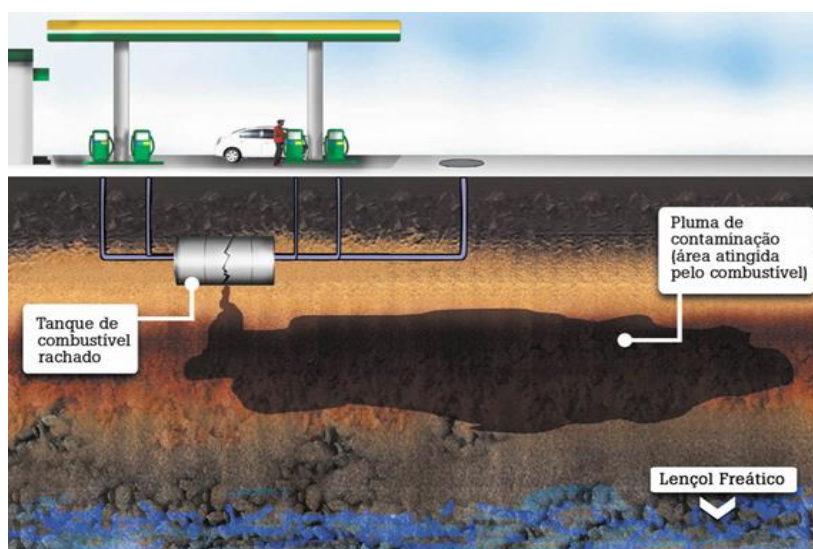


Figura 1 Desenho ilustrando a formação da pluma de contaminação no solo em decorrência de vazamentos nos tanques.

Em casos de contaminação do solo pelos combustíveis, a migração dos hidrocarbonetos pelos horizontes do solo até a zona saturada ocorre por influência de forças gravitacionais e capilares, sendo que essa última influencia também o escoamento do combustível horizontalmente. A área atingida pelo hidrocarboneto nesse ambiente definirá a pluma de contaminação que corresponde a sua distribuição nos horizontes do solo. Na zona saturada, representada na Figura 1 pelo lençol freático, a migração do contaminante ocorre de forma bifásica, já que esses compostos orgânicos tem baixa miscibilidade em água. Desta forma, compostos como o óleo diesel, a gasolina e o querosene que apresentam densidade menor que água, quando atingem o lençol freático, formam a fase líquida não aquosa leve (LNAPL - *light non-aqueous phase liquid*). Outros contaminantes que são mais pesados que a água, tais como hidrocarbonetos clorados, bifenilas poli-cloradas (PCBs), antraceno e pireno, formam a fase líquida não aquosa densa DNAPL - *dense non-aqueous phase liquid*) (Mariano, 2006).

Tendo em vista as características de mobilidade do óleo, este pode percolar no perfil do solo e contaminar os diferentes horizontes atingindo o lençol freático e comprometendo também águas superficiais e subterrâneas (Gallego et al., 2001). Além disso, as características físico-químicas e biológicas do solo são alteradas quando em contato com óleo, podendo afetar as populações microbianas e suas atividades, assim como o teor de matéria orgânica, densidade, porosidade, além da respiração e processos de transferência de massa, devido à hidrofobicidade dos hidrocarbonetos presentes no contaminante (Silva e Vieira, 2008; Lozano-Garcia, Parras-

Alcantara e De Albornoz, 2011). Portanto, além do dano ambiental, esses fatores também limitam o uso do solo, pois diminuem a capacidade agrícola do local contaminado ocasionando perdas econômicas (Thapa, Kumar e Ghimire, 2012).

Diante do cenário de comprometimento da qualidade dos solos e das águas devido a acidentes relacionados a vazamentos de combustíveis, uma série de novas leis, resoluções e decretos municipais foram promulgados a fim de mitigar os danos ao ambiente. Em 2009, o Ministério do Meio Ambiente e o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) lançaram a Resolução nº 420 que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. De acordo com a resolução, são utilizados como padrão os valores orientadores para solos e águas subterrâneas da CETESB que foi elaborada usando como base a Lista Holandesa de Valores de Referência de Qualidade do Solo e da Água Subterrânea (1994). Como exemplo, pode-se visualizar na Tabela 1 os valores orientadores denominados *R* (referência), *A* (alerta) e *I* (intervenção) para os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) para um solo contendo 25 % de argila e 10 % de matéria orgânica (Tramontini, 2013)

Tabela 1 Valores referenciais para solo, considerando-se um teor de argila de 25,0 % e de matéria orgânica de 10,0 % de acordo com a Lista Holandesa de Valores de Referência para Qualidade do Solo e da Água Subterrânea

Parâmetro	Concentração em peso seco (mg.kg ⁻¹)		
	R	A	I
Compostos remanescentes			
Ciclohexano	0,1	135,1	270
Ftalatos (soma)	0,1	30,1	60
Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP)	50	2525	5000
Piridina	0,1	0,55	1
Estireno	0,1	50,1	100
Tetrahidrofuram	0,1	0,25	0,4

R- Valor de referência; A- Valor de alerta; I- Valor de intervenção.

Fonte: Lista holandesa de valores de qualidade do solo e da água subterrânea, 1994.

No município de Porto Alegre, desde 1996, por ação do Decreto Municipal n° 11.423, é exigida licença ambiental para instalação e operação de quaisquer estabelecimentos que pratiquem o armazenamento de combustíveis em tanques subterrâneos em concordância com a resolução do CONAMA n° 273. No estado do Rio Grande do Sul, em abril de 2010, a FEPAM publicou a Portaria n° 016/2010, que propõe um destino final dos resíduos classe I - borras oleosas, borras de processos petroquímicos, borras de fundo de tanques de combustíveis, produtos inflamáveis e solo contaminado com combustíveis. A partir desta Portaria, esses resíduos devem ser encaminhados a estações especializadas de tratamentos, ao invés de ser encaminhado direto ao aterro de resíduos classe I, local onde os resíduos com as características citadas eram despejados sem receber tratamento prévio. Desta forma, solos impactados com combustíveis que apresentem concentração de HTPs acima de 5000 mg.kg⁻¹, são classificados na faixa de Intervenção de acordo com a tabela da CETESB e **devem receber tratamento para descontaminação.**

Considerando-se a crescente participação do biodiesel na matriz energética mundial e nacional, estudos referentes ao impacto do óleo e das misturas com o diesel de petróleo no ambiente, bem como estudos sobre sua degradação no ambiente são de extrema importância (Mariano *et al.*, 2008; Soares, Mariano e De Angelis, 2009; Knothe, 2010; Leme *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012), uma vez que pouco se sabe sobre a ecologia microbiana de degradação das misturas diesel/biodiesel (Osterreicher-Cunha *et al.*, 2009) e o entendimento do comportamento deste poluente no solo são ainda limitados (Leme *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012).

O biodiesel é considerado como um combustível mais vantajoso, especialmente do ponto de vista ecológico, devido a características de biodegradabilidade e de reduzir o nível de emissões atmosféricas quando comparadas aos derivados de petróleo (Demello *et al.*, 2007; Prince, Haitmanek e Lee, 2008; Demirbas, 2009a; Cyplik *et al.*, 2011; Leme *et al.*, 2012). No entanto, enquanto a fração do biocombustível parece ser mais prontamente degradada e menos tóxica, existe a preocupação sobre uma possível inibição da degradação microbiana dos hidrocarbonetos de petróleo na presença do biodiesel (Lapinskiene, Martinkus e Rebzdaite, 2006). A causa provável seria devido ao consumo de aceptores de elétrons com a degradação dos ácidos graxos, causando a acumulação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Elazhari-Ali *et al.*, 2013). Alguns estudos mostram que o grande aporte de carbono, representado pela presença do biodiesel no solo, pode provocar alterações na comunidade microbiana de uma forma generalizada,

podendo também ocasionar efeitos tóxicos para parte da microbiota autóctone (Lapinskiene, Martinkus e Rebzdaite, 2006; Silva *et al.*, 2012).

2.4 Técnicas de remediação de ambientes impactados

Segundo a CETESB, uma área contaminada é definida como um local onde há comprovadamente poluição ou contaminação causada pela introdução de quaisquer substâncias ou resíduos que nela tenham sido depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados de forma planejada, acidental ou até natural e que gera impactos negativos sobre os bens a proteger.

A existência de uma área contaminada pode gerar problemas como, danos à saúde, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e danos ao patrimônio público e privado, com a desvalorização das propriedades, além dos danos ao meio ambiente (CETESB, 2013).

A restauração de áreas contaminadas é uma tarefa complexa e demorada além de apresentar custos elevados de operação dependendo dos casos e com a possibilidade de não serem atingidos os limites permitidos pela legislação ou pelos órgãos ambientais (Mariano, 2006). Além disso, é importante considerar que o processo de remediação inevitavelmente resultará na mudança ou suspensão das funções naturais do meio, seja permanente ou temporariamente (Seabra, 2008; Zhu, Lu e Zhang, 2010). Em vista disso, solos que apresentem baixo grau de contaminação por compostos orgânicos poderiam passar apenas por métodos de estabilização e imobilização que

diminuam a disponibilidade ou restrinjam a mobilidade dos poluentes. Já em locais altamente impactados, apenas abordagens mitigadoras não seriam suficientes, havendo a necessidade de aplicação de técnicas de remediação para recuperar o solo (Zhu, Lu e Zhang, 2010).

Neste contexto, diversas estratégias vem sendo aplicadas para descontaminação de sítios impactados por petróleo e derivados. Segundo Seabra (2008), três estratégias básicas são usadas separado ou em conjunto para remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo: destruição ou alteração; extração ou separação dos contaminantes do local; e imobilização do contaminante. A seleção da técnica empregada irá depender do contaminante, das características de cada local, das exigências regulatórias, dos custos de operação e das restrições de tempo (Riser-Roberts, 1998; Reddy, Admas e Richardson, 1999).

Diferentes processos químicos, físicos e biológicos são conhecidos para a remoção de hidrocarbonetos no solo (Pietroletti *et al.*, 2010). As técnicas podem ser aplicadas *in situ*, cuja remediação ocorre na própria área impactada, ou *ex situ*, através da retirada do material contaminado para posterior tratamento (Reddy, Admas e Richardson, 1999; Zhu, Lu e Zhang, 2010). Geralmente, essa última abordagem é utilizada no caso de locais impactados com altas concentrações de contaminantes recalcitrantes, necessitando de estratégias mais eficientes de recuperação desses resíduos (Mohan *et al.*, 2006).

Dentre as estratégias de descontaminação, os processos físicos envolvem a separação do contaminante do local em que ele se localiza através da aplicação de altas temperaturas ou de campos elétricos. Compostos voláteis e semivoláteis como Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA), por exemplo, podem ser tratados via remediação térmica, promovendo a volatilização ou destruição dos compostos no solo (Zhu, Lu e Zhang, 2010). Os processos químicos baseiam-se na aplicação de agentes oxidantes ou solventes para extração do contaminante do solo (Pignatello, Oliveros e Mackay, 2006). A escolha de qual composto a ser utilizado para extração química varia de acordo com o tipo de contaminante (Zhu, Lu e Zhang, 2010).

Segundo a CETESB, técnicas convencionais como a escavação dos solos contaminados, seguida de tratamento ou disposição em aterros, tem sido utilizadas para efetuar a remediação de locais contaminados. Além das técnicas de remoção e redistribuição de solos, outras técnicas tem sido aprimoradas, testadas e avaliadas em relação a sua eficiência/eficácia e custo, incluindo a contenção, biorremediação, oxidação química, extração de vapores, bombeamento e tratamento de águas subterrâneas, entre outros. Desta forma, inúmeros processos químicos, físico e biológicos tem sido utilizados para descontaminação das 1275 áreas impactadas no estado de São Paulo, sendo a biorremediação uma estratégia ainda pouco frequente no Brasil (CETESB, 2011).

Comparando as técnicas biológicas aos processos químicos e físicos os últimos apresentam custo elevado de aplicação e o emprego desses

processos sempre promove distúrbios no ambiente em que forem utilizados (Sridevi *et al.*, 2011; V *et al.*, 2011). No caso da incineração, por exemplo, além de impactar o local, gera compostos tóxicos na atmosfera. Os processos químicos que empregam solventes geram um passivo ambiental que requer um tratamento secundário para sua extração (Zhu, Lu e Zhang, 2010).

Segundo a CETESB, de uma forma geral, a biorremediação para tratamento de solos contaminados com diesel/biodiesel é considerada apropriada devido a biodegradabilidade desses compostos. Ainda pode ser considerada como uma alternativa atrativa às técnicas convencionais, uma vez que é de simples manutenção e baixo risco, envolve baixos custos operacionais, podendo ser aplicada a vastas áreas (Pereira Junior, Gomes e Soriano, 2009). No entanto, o uso de uma única estratégia pode não remediar totalmente o sítio contaminado (Seabra, 2008), com isso, a combinação de técnicas químico-biológicas tem ganhado maior atenção (Zhu, Lu e Zhang, 2010).

2.4.1 Biorremediação de solos contaminados com diesel e biodiesel

A biorremediação passou a ter destaque mundial desde o caso do acidente envolvendo o cargueiro Exxon Valdez em 1989 (Peixoto, Vermelho e Rosado, 2011; Tramontini, 2013). Nesse caso, foi utilizada a estratégia de estimulação dos micro-organismos locais com introdução de fertilizante oleofílico juntamente com técnicas físicas para controlar um derramamento de 41 milhões de litros de petróleo na costa do Alasca (EUA) (Atlas e Hazen, 2011).

Recentemente, estudos com a utilização do potencial biológico para descontaminação de solos contaminados com hidrocarbonetos tem sido motivados devido ao grande número de acidentes envolvendo derramamentos de combustíveis no ambiente (Trindade *et al.*, 2005; Seabra, 2008) e a possibilidade de transformação dos contaminantes em substâncias inócuas através da biorremediação (Cunha e Leite, 2000; Scragg, 2005; Aluyor, Obahiagbon e Ori-Jesu, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Thapa, Kumar e Ghimire, 2012). Desta forma, diversos compostos orgânicos alifáticos e aromáticos presentes no combustível podem ser utilizados pelos organismos como fonte de carbono e energia (Bouwer e Zehnder, 1993; Megharaj *et al.*, 2011), convertendo-os em compostos menos complexos seja pela degradação parcial ou pela mineralização completa (produzindo moléculas como CO₂, H₂O e NH₃) (Gaylarde, Bellinaso e Manfio, 2005; Moreira, 2006; Moreira e Siqueira, 2006; Jacques *et al.*, 2010; Das e Chandran, 2011; Megharaj *et al.*, 2011).

Os micro-organismos destacam-se na degradação de compostos orgânicos uma vez que apresentam uma grande diversidade genética e catalítica aliada a grande capacidade de adaptar-se a condições ambientais adversas (Megharaj *et al.*, 2011). Com essa versatilidade, espera-se que a presença de micro-organismos potencialmente degradadores de óleo seja ubíqua, apenas estando em menor proporção em comunidades que não foram expostas previamente ao contaminante (Atlas e Hazen, 2011; Megharaj *et al.*, 2011). Existem centenas de espécies de bactérias, fungos e arqueas capazes de degradar hidrocarbonetos (Atlas e Hazen, 2011) e, por isso, são considerados reservatórios catalíticos que, quando expostos a um cenário de

derrame de óleo, exibem enriquecimento seletivo de forma a possibilitar a conversão dos poluentes em energia e, por conseguinte, a redução destes do ambiente (Alexander, 2000).

Diante dos compostos tóxicos, os micro-organismos podem desenvolver mecanismos que corroboram para sua permanência no ambiente contaminado e até mesmo facilitam a degradação dos xenobióticos (Colla, 2012). Desta forma, a presença de hidrocarbonetos pode induzir a produção de biosurfactantes (Chrzanowski, Lawniczak e Czaczyk, 2012) que permite maior disponibilidade do composto orgânico ao ataque dos micro-organismos. Ainda, pode ocorrer alteração na permeabilidade celular (De Carvalho, Wick e Heipieper, 2009) e ativação de bombas de efluxo para reduzir a concentração intracelular de compostos tóxicos (Van Hamme, Singh e Ward, 2003).

Pode-se considerar que a utilização da estratégia de biorremediação envolve a exposição de uma intrincada rede metabólica multiespécie a uma mistura complexa de estruturas químicas presente num cenário poluído (De Lorenzo, 2008). Por conta disso, a variedade de compostos poluentes que um sítio pode apresentar implica a presença de uma comunidade degradadora de ampla diversidade catabólica. Ainda, o potencial de degradação de poluentes orgânicos varia entre as comunidades microbianas e é dose dependente. Isso significa que doses mais elevadas de componentes dos combustíveis, como HPA, por exemplo, exercem efeitos inibitórios ou tóxicos que podem atenuar o potencial de degradação, sendo estressores importantes aos micro-organismos (Megharaj *et al.*, 2011).

Neste sentido, a busca pelo entendimento pleno das rotas bioquímicas de degradação, caracterização genética e o desenvolvimento de metodologias se fazem necessários para eficiência da aplicação dessa técnica (Megharaj *et al.*, 2011). Ainda, quando uma situação de contaminação é simulada em laboratório, a utilização de consórcios microbianos em detrimento de culturas puras, assim como a escolha por altas concentrações do combustível parecem ser mais adequadas, pois proveem uma situação mais próxima da condição a ser encontrada a campo (Tyagi, Da Fonseca e De Carvalho, 2011)

A completa remoção do contaminante e a conseguinte efetividade de um processo de remediação pode ser o resultado de interações sinérgicas entre os membros de um consórcio de forma que determinado grupo de microorganismos pode remover metabólitos que são tóxicos a outro grupo ou ainda utilizar produtos de degradação como seu substrato (Mukred *et al.*, 2008). Diversos estudos tem demonstrado o efeito positivo da utilização de consórcios microbianos (Bento *et al.*, 2005; Jacques *et al.*, 2008; Shabir *et al.*, 2008; Cerqueira *et al.*, 2012; Taccari *et al.*, 2012).

Conforme comentado para as técnicas convencionais, a biorremediação também pode ser realizada *in situ* ou *ex situ*, e a escolha de cada uma das abordagens deve ser feita levando-se em conta as peculiaridades do local, o nível de contaminação e a análise de riscos. É importante ressaltar que a realização do tratamento biológico *in situ* parece ser mais vantajoso no que se refere à possibilidade de restauração das funções

ecológicas do ambiente em maior grau por causar um distúrbio menos expressivo durante a fase de tratamento (Jorgensen *et al.*, 2007; Colla, 2012). Ainda, do ponto de vista econômico, na abordagem de remediação *ex situ*, os custos são mais elevados, implicando na necessidade de um local licenciado e adequado para a disposição e tratamento do solo escavado (CETESB).

A biorremediação pode ser classificada em três estratégias: Atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação. A escolha por uma ou a combinação entre elas é determinada por diversos fatores, como as condições do local, população de micro-organismos nativos e o tipo, quantidade e toxicidade dos compostos poluentes (Megharaj *et al.*, 2011). O emprego de plantas no processo (fitorremediação) também é utilizado (Lin e Mendelssohn, 2009; Tang *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2011).

Atenuação natural: Nessa estratégia, os contaminantes são transformados em formas menos tóxicas em grande parte pela comunidade microbiana e, até certo ponto, pelas reações químicas e físicas que ocorrem naturalmente (Megharaj *et al.*, 2011), considerando que os processos que envolvem a transformação de compostos alvo através do metabolismo microbiano são auto-sustentáveis (Serrano *et al.*, 2008).

A eficiência da técnica depende da presença de microbiota residente metabolicamente capacitada, bem como da disponibilidade do combustível para ação dos micro-organismos. Ainda, dependendo das condições do local e do nível de contaminação, o tempo requerido para efetividade dessa estratégia varia consideravelmente (Silva *et al.*, 2009). Em

alguns casos, a aplicação da estratégia de forma isolada pode ser ineficiente e prolongada, pois grande parte dos solos são originalmente oligotróficos e desprovidos de uma população microbiana degradadora em magnitude satisfatória (Megharaj *et al.*, 2011).

Bioestimulação: Essa estratégia envolve o ajuste de parâmetros físico químicos, como adição de nutrientes ou aceptores de elétrons, a fim de estimular o crescimento da microbiota intrínseca. Com um derramamento de combustível, por exemplo, a relação C:N:P (Carbono:Nitrogênio:Fósforo) fica desequilibrada, visto que aumenta muito a proporção de carbono em relação aos demais nutrientes que se tornam limitantes. Desta forma, a proporção entre esses elementos deve ser reconduzida ao equilíbrio de forma que haja um suprimento adequado dos elementos relacionados a formação de constituintes celulares básicos como proteínas, ácidos nucleicos e ATP (Paliwal, Puranik e Purohit, 2012).

Os ajustes nesses parâmetros não obedecem a uma fórmula geral, devendo ser conduzidos de acordo com a combinação sítio/poluinte existente (Das e Chandran, 2011). Geralmente, a adição de macronutrientes é feita a partir de fertilizantes solúveis, como NH_3NO_3 , K_2HPO_4 de modo a estabelecer relações C:N:P adequadas para o aumento das populações microbianas e, conseqüentemente, o aumento nas taxas de degradação (Trindade *et al.*, 2005; Megharaj *et al.*, 2011; Thapa, Kumar e Ghimire, 2012). As proporções utilizadas variam na literatura, sendo mais comum a relação 100:10:1 (Atlas e Bartha, 1972; Jacques *et al.*, 2010; Thapa, Kumar e Ghimire, 2012).

Bioaugmentação: a bioaugmentação envolve o incremento da capacidade degradadora de um ambiente impactado através da inoculação de micro-organismos pré-selecionados, de natureza autóctone ou alóctone, com comprovada capacidade de degradação capazes de metabolizar compostos específicos (Bento *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2009; Lin, Pan e Cheng, 2010; Zanaroli *et al.*, 2010). A bioaugmentação também pode estar associada à utilização de micro-organismos geneticamente modificados; utilização de enzimas livres (Scott *et al.*, 2010); ou adição de vetores gênicos (El Fantroussi e Agathos, 2005). Em geral, essa estratégia é indicada para eliminar contaminantes em locais onde a microbiota nativa degradadora é inexistente ou inexpressiva. O inóculo microbiano previamente adaptado ao contaminante pode conter uma cultura pura ou uma combinação de micro-organismos em consórcio. A utilização de consórcios com micro-organismos de diferentes grupos fisiológicos e de diferentes divisões com características genéticas diversas podem proporcionar vantagens seletivas em um determinado ambiente (Megharaj *et al.*, 2011).

O sucesso da estratégia depende da utilização de micro-organismos com potencial metabólico para degradar o contaminante em questão e da manutenção dos mesmos no local contaminado (Cerqueira, 2011). Por esse motivo, alternativas como a utilização de carreadores para imobilização do consórcio microbiano têm sido testadas (Xu e Lu, 2010; Lawniczak, Kaczorek e Olszanowski, 2011).

Na escolha da estratégia de biorremediação a ser utilizada, é preciso ponderar sobre os fatores que podem afetar o processo de biorremediação como um todo, a fim de subsidiar a seleção uma estratégia ou a combinação entre elas. A bioestimulação seria a técnica adequada para biodegradação de combustíveis, considerando que a disponibilidade de nutrientes é o fator limitante mais comum (Atlas e Bartha, 1972; Kim *et al.*, 2005). Alguns autores defendem a aplicabilidade da bioaugmentação (Alisi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Aleer *et al.*, 2011; Cerqueira, 2011), já que a inoculação de bactérias com habilidade em biodegradar hidrocarbonetos pode reduzir o tempo de tratamento. Em outros estudos, são relatadas dificuldades que podem surgir em decorrência do emprego da estratégia (Mckew *et al.*, 2007; Ueno *et al.*, 2007; Hosokawa *et al.*, 2009). O principal desafio é manter a viabilidade dos micro-organismos introduzidos ao longo de todo o tratamento (Ruberto *et al.*, 2009), já que a maioria das cepas isoladas em laboratório que são capazes de degradar poluentes orgânicos constituem a fração de micro-organismos cultiváveis, fazendo apenas pequenas contribuições para bioaumento (Watanabe, 2001). Com isso, a remoção do contaminante nem sempre é completa, pois a cinética de biodegradação compreende um período inicial de intensa atividade, seguido de uma fase de redução nas taxas de degradação (Lin *et al.*, 2011; Tahhan *et al.*, 2011). Uma forma de reduzir esses efeitos pode ser a re-introdução de um consórcio nativo ao ambiente impactado, previamente enriquecido em laboratório para degradação do composto poluente e o ajuste dos nutrientes limitantes. Essa combinação de estratégias se mostra vantajosa (Alisi *et al.*, 2009), pois a microbiota adicionada que já está

adaptada às condições naturais da área e ao contaminante, sendo favorecida também pelas condições ambientais (Bento *et al.*, 2005).

2.4.1.1 Fatores que afetam a biorremediação

A taxa de biodegradação do diesel e do biodiesel pode ser influenciada por diversos fatores intrínsecos do solo e dos combustíveis, sendo limitantes à biorremediação (Singh e Lin, 2009; Jacques *et al.*, 2010; Zhu, Lu e Zhang, 2010). Restrições oferecidas pelo substrato e por fatores geológicos, climatológicos e ecológicos afetam a eficiência do processo (Van Hamme, Singh e Ward, 2003). Desta forma, diversos fatores químicos, físicos e biológicos influenciam na taxa de biodegradação desses contaminantes no solo, tais como:

Concentração do contaminante: A concentração afeta diretamente a atividade microbiana, pois quando o contaminante está em altas concentrações pode ter efeitos tóxicos à microbiota (Megharaj *et al.*, 2011). Altas concentrações (acima de 5 g.Kg⁻¹ de solo) de combustíveis no solo podem causar inibição da biodegradação, devido à limitação de nutrientes como o Nitrogênio, o Fósforo e o Oxigênio e/ou aos efeitos tóxicos exercidos à célula microbiana pelos hidrocarbonetos voláteis principalmente (Atlas, 1981; Leahy e Colwell, 1990; Van Hamme, Singh e Ward, 2003). Em contrapartida, quando o contaminante está em baixa concentração, pode não induzir as enzimas catalíticas e, com isso, não ocorrer a degradação (EPA, 2013).

Composição e disponibilidade do contaminante: A natureza química no contaminante exerce influencia na degradação dos compostos orgânicos. Desta forma, a sequência geral de degradação dos hidrocarbonetos é n-alcanos > alcanos ramificados > n-alquil-aromáticos de baixo peso molecular > monoaromáticos > cicloalcanos > aromáticos policíclicos > asfaltenos (Van Hamme, Singh e Ward, 2003). A biodisponibilidade do contaminante para as reações catalíticas pode afetar o tempo de permanência do contaminante no solo. As interações intermoleculares entre as partículas do solo e o óleo afetam o grau de sorção do contaminante às partículas. O fenômeno da sorção depende fundamentalmente dos processos químicos específicos do contaminante, como solubilidade em água e polaridade das moléculas, assim como o pH do solo, o conteúdo de matéria orgânica e de argila e a capacidade de troca catiônica (Von Oepen, Kordel e Klein, 1991; Kuhnt, 1993). Enquanto níveis altos de matéria orgânica podem sustentar uma comunidade microbiana potencialmente degradadora (Scherr *et al.*, 2007), o conteúdo de argila e matéria orgânica contribuem na redução da biodisponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos à célula (Franco *et al.*, 2004; Cookson *et al.*, 2005). Ainda, a difusão do óleo através dos poros e se o contaminante de fase líquida não aquosa são fatores que afetam a disponibilidade (Alexander, 2000; Trindade *et al.*, 2005).

pH: O pH afeta a solubilidade e disponibilidade de nutrientes, metais e outros constituintes, além de influenciar diretamente na permeabilidade celular e atividade enzimática (Jacques *et al.*, 2010). O pH ótimo de crescimento depende do tipo de micro-organismo, sendo indicado a faixa de 6-

8 para os processos de biorremediação (EPA, 2013). No Rio Grande do Sul, a presença de solos ácidos demanda a correção do pH através da adição de CaCO_3 , deixando o pH numa faixa neutra e favorável à biodegradação (Bissani *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2012).

Umidade e disponibilidade de oxigênio: A água no solo é necessária para as funções fisiológicas dos organismos, portanto, o nível de umidade deve estimular a microbiota degradadora sem, no entanto, levar à redução da permeabilidade do solo e ao teor de oxigênio (Tramontini, 2013). O excesso do teor de água, a atividade microbiana e o tipo de solo podem afetar a disponibilidade de oxigênio (Bossert e Bartha, 1984) que atua como o acceptor final de elétrons para degradação aeróbia dos combustíveis nos horizontes superficiais do solo (Aspray, Gluszek e Carvalho, 2008). Uma forma de ajustar o teor de água no solo está baseado na capacidade de campo que, por definição, é a quantidade de água em que todos os microporos do solo estão saturados (Bissani *et al.*, 2008). O teor de água adequado para atividade microbiana varia de 25 a 85% da capacidade de campo (Paul e Clark, 1989; Seabra, 2008).

Temperatura: Alterações na temperatura podem influenciar na degradação, devido ao efeito na natureza física e composição química do combustível, além de estar diretamente relacionada com a taxa metabólica e a composição microbiana (Atlas, 1981). Temperaturas baixas diminuem a fluidez e a permeabilidade da membrana celular, a qual controla o transporte de nutrientes (e contaminantes) entre o meio exterior e o interior da célula (Mariano, 2006). Além disso, variações na temperatura provocam alterações

fisiológicas que podem tanto favorecer a degradação em casos de temperaturas ótimas para atuação da maquinaria enzimática, como provocar efeitos inibitórios e tóxicos (Atlas, 1981; Seabra, 2008; Das e Chandran, 2011).

Concentração de nutrientes: Considerando que em um cenário de derramamento de óleo combustível a presença do contaminante aumenta consideravelmente o aporte de carbono, os níveis de nitrogênio e fósforo passam a ser limitantes ao processo de degradação (Das e Chandran, 2011; Liang *et al.*, 2012). Os microrganismos necessitam dos macronutrientes para sintetizar componentes celulares, como o nitrogênio para aminoácidos e enzimas, o fósforo para o ATP e o DNA, enxofre para algumas proteínas e coenzimas, cálcio para estabilizar a parede celular e magnésio para estabilizar os ribossomos (Mariano, 2006). Tanto a escassez de nutrientes pode comprometer a biodegradação do contaminante, quanto o excesso pode acarretar em toxicidade à célula (Atlas, 1981). A adequação da relação C: N: P a fim de otimizar a taxa de degradação de contaminantes é bastante utilizada, pois expressa a razão desses elementos químicos encontrados na constituição celular de micro-organismos (Morgan e Watkinson, 1989; Margesin e Schinner, 2001).

2.4.2 Diesel/biodiesel – Aspectos metabólicos da degradação

Os compostos presentes nos combustíveis, como hidrocarbonetos e ésteres de ácidos graxos, podem ser utilizados para suprir a demanda energética dos micro-organismos do solo, permitindo a redução gradual na concentração dos constituintes no ambiente impactado por eles. Desta forma, o

sistema metabólico microbiano tem sido considerado o mais eficiente na biodegradação de moléculas xenobióticas recalcitrantes (Gaylarde, Bellinaso e Manfio, 2005; Mnif *et al.*, 2011). Constituem-se exemplos taxonômicos de micro-organismos degradadores de combustíveis (cultiváveis e já classificados) os gêneros *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Sphingobacterium*, *Achromobacter*, *Klebsiella*, *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Paecilomyces* (Colla, 2012).

Quando ocorre um derramamento acidental de combustível, esse composto entrará na camada superficial do solo, local onde há maior disponibilidade de oxigênio em relação a camadas mais profundas. A rota metabólica aeróbia de degradação de poluentes orgânicos é mais rápida e completa, e envolve a ação de oxigenases, enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons entre moléculas (Pazmino *et al.*, 2010; Das e Chandran, 2011). Os micro-organismos degradativos necessitam de átomos de oxigênio em dois estágios metabólicos, no ataque inicial da molécula de hidrocarboneto e no final da cadeia respiratória (Fritsche e Hofrichter, 2008).

As oxigenases catalisam a reação de oxido redução (Pazmino *et al.*, 2010) incorporando um átomo de O_2 ao seu substrato (monoxigenases) , ou dois átomos de O_2 (dioxigenases). Diversos micro-organismos presentes no solo produzem essas enzimas e são capazes de degradar tanto os constituintes principais do diesel (n-alcenos), como os ácidos graxos (Figura 2). Esses últimos são transformados pela ação as alcenos hidroxilases, uma

classe específica de mono-oxigenases. O mecanismo de ação consiste na introdução de um grupo hidroxila nas regiões terminais, subterminais ou biterminais da cadeia hidrocarbônica (Van Beilen *et al.*, 2003; Van Beilen e Funhoff, 2005; Funhoff e Van Beilen, 2007; Hamamura *et al.*, 2008).

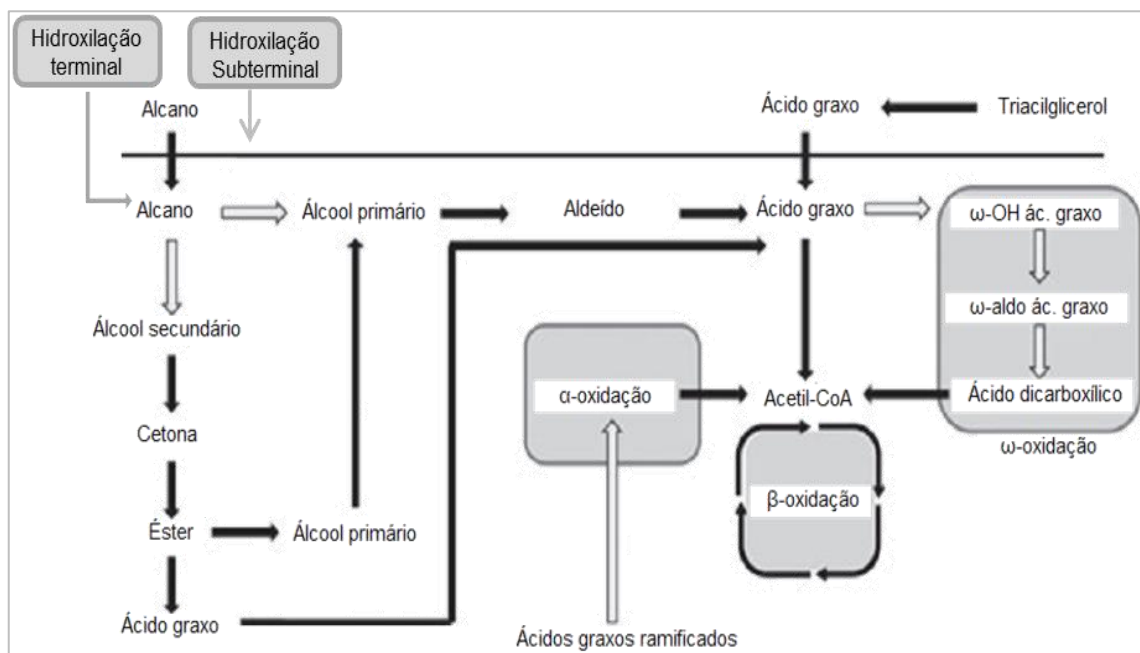


Figura 2 Rota metabólica de degradação de alcanos e de ácidos graxos. O envolvimento de enzimas mono-oxigenases está representado pelas setas cinza vazadas (Van Bogaert *et al.*, 2011).

Conforme demonstrado na Figura 2, a oxidação terminal e subterminal conduz à formação de ácidos graxos que entram na via de β -oxidação. A rota comum de degradação aeróbica de alcanos inicia com a hidroxilação terminal da cadeia carbônica gerando um álcool que é convertido a aldeído e, na sequência, a ácido graxo que entra na β -oxidação. A oxidação subterminal gera um álcool secundário, sendo este oxidado a cetonas que, por sua vez, produzem um álcool primário com auxílio de esterases e ácidos graxos que acabam sendo metabolizadas por β -oxidação (Berthe-Corti e

Fetzner, 2002; Van Beilen *et al.*, 2003; Meyer, 2011; Van Bogaert *et al.*, 2011). Alternativamente, uma alcano hidroxilase pode atuar por processo de ω -oxidação, transformando ácidos graxos comuns a ácidos dicarboxílicos que entram na via da β -oxidação (Van Bogaert *et al.*, 2011). Desta forma, as rotas de oxidação das moléculas presentes na mistura diesel/biodiesel podem se sobrepor através da ação das alcanos hidroxilases em compostos intermediários em comum como os ácidos graxos. Estes compostos, por sua vez, podem servir como fontes de carbono para bactérias de uma comunidade entrando nas rotas metabólicas típicas de degradação de ácidos carboxílicos, em que a molécula é quebrada em ácidos menores (Vasconcellos, 2006).

As alcano mono-oxigenases compõem uma vasta classe de enzimas relacionadas à degradação de xenobióticos (Van Bogaert *et al.*, 2011). A maioria dessas enzimas parece estar associada ao complexo de enzimas do citocromo P450 (Van Beilen e Funhoff, 2007) e podem ser divididas em dois grandes grupos: as AH1, que oxidam as cadeias relativamente curtas a médias de alcanos, enquanto que a maioria das enzimas *alkB*, pertencentes ao grupo AH2, oxida cadeias longas (Van Beilen e Funhoff, 2007; Amouric *et al.*, 2010).

Os compostos aromáticos podem ser degradados principalmente pela ação das dioxigenases que são classificadas como periféricas ou de fissão (Mishra *et al.*, 2001). As enzimas periféricas atuam na inserção dos átomos de oxigênio à molécula na hidroxilação do anel de ressonância e na rearomatização geral desses compostos gerando como compostos intermediários centrais como o catecol (em bactérias) e o protocatecol (na

maioria dos fungos e em algumas bactérias), conforme mostrado na Figura 3 (Fuchs, Boll e Heider, 2011). Esses compostos, por sua vez, são substrato para as enzimas de fissão classificadas de acordo com a posição em que clivam o anel aromático. As enzimas intradiol dioxigenases 1,2-Catecol Dioxigenases (C1,2O), 3,4-Protocatecol Dioxigenases (P3,4O) atuam na clivagem dos anéis aromáticos na posição *orto* (entre dois grupos hidroxil), já a Catecol Dioxigenases (C2,3O) cliva o anel na posição *meta* (adjacente a grupos hidroxil) sendo classificada como extradiol dioxigenase. (Direito, 2005). Na sequência, são gerados produtos finais da rota de degradação central como acetil-CoA, succinato ou piruvato, que poderão ser utilizados para o crescimento microbiano (Bamforth e Singleton, 2005). Em ambientes anaeróbios, alguns compostos aromáticos podem ser degradados através da redução dos compostos via três possíveis rotas: adição de fumarato (tolueno), hidroxilação O₂-independente (etilbenzeno, propilbenzeno) e carboxilação (benzeno, naftaleno) (Fuchs, Boll e Heider, 2011).

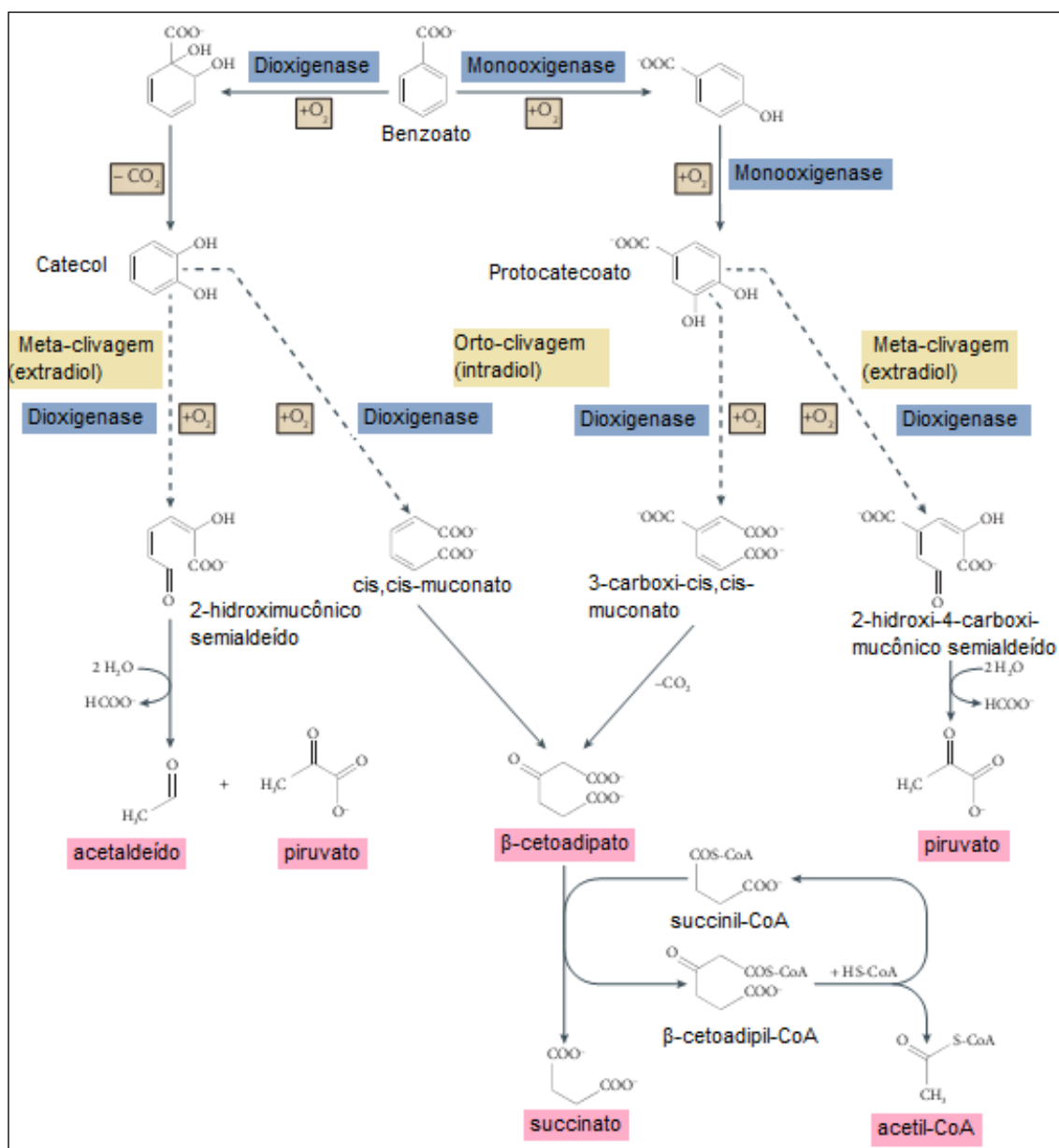


Figura 3 Representação da rota de degradação aeróbia do benzoato por fungos e bactérias (Fuchs, Boll e Heider, 2011; Colla, 2012).

Considerando a fração do biodiesel presente numa mistura diesel/biodiesel, a provável rota de degradação deste composto ocorre principalmente pela ação de enzimas extracelulares (lipases e esterases). Essas enzimas catalisam reações de hidrólise das ligações éster presentes nos compostos lipídicos do biodiesel (Boczar *et al.*, 2001). As esterases hidrolisam ésteres de

cadeias simples e cadeias de no máximo 6 carbonos atuando somente em substratos solúveis em água. As lipases, por sua vez, atuam na interface óleo-água em triglicerídeos de cadeia curta e longa. O mecanismo de ação destas enzimas inicia na hidrólise do etil ou metil éster produzindo ácido graxo e álcool. Os ácidos graxos entram na via de β -oxidação com encurtamento da molécula pela liberação sucessiva de acetil-CoA, até a completa degradação do ácido (Zhang *et al.*, 1998; Bucker, 2009).

A biodegradabilidade do biodiesel é favorecida por apresentar majoritariamente ácidos graxos em sua constituição o que torna esse combustível um substrato facilmente reconhecido pelas as enzimas microbianas (Owsianiak *et al.*, 2009; Balat, 2011; Yusuf, Kamarudin e Yaakub, 2011). A ausência de moléculas aromáticas, propriedades higroscópicas e disponibilidade de ligações éster de alta energia são características que aumentam o potencial para biodegradação do biodiesel (Passman e Dobranick, 2005; Leung, Koo e Guo, 2006; Demirbas, 2009a; Knothe, 2010).

A literatura traz diversos estudos que relatam alterações na cinética de degradação dos combustíveis convencionais quando o biodiesel é adicionado. O aumento na biodegradabilidade da fração do diesel da mistura estaria relacionado aos efeitos sinérgicos promovidos pelo biodiesel via co-metabolismo microbiano (Zhang *et al.*, 1998; Mudge e Pereira, 1999; Fernandez-Alvarez *et al.*, 2007). No entanto, o grau de biodegradabilidade pode variar, uma vez que a presença do biodiesel pode não acelerar a degradação do diesel (Demello *et al.*, 2007; Owsianiak *et al.*, 2009) ou

apresentar meia vida de degradação dos metil-ésteres de ácidos graxos, no mesmo intervalo que os alcanos do diesel (Prince, Haitmanek e Lee, 2008).

2.5 Metodologias de monitoramento da degradação da mistura diesel/biodiesel

A avaliação do nível de contaminação de uma área impactada com combustíveis pode ser feita através da quantificação dos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) que estão divididos em três grupos, de acordo com o tamanho de suas cadeias de carbono, decorrentes das frações destiladas do petróleo, são eles: C₅-C₁₀ correspondente à faixa da Gasolina (HTP-GRO - Gasoline Range Organics), C₁₁-C₂₈ faixa do diesel (HTP-DRO - Diesel Range Organics) e C₂₀-C₄₀ faixa de óleo lubrificante (HTP -ORO - Oil Range Organics (EPA, 2013)

As técnicas cromatográficas têm sido amplamente utilizadas para a determinação das frações de hidrocarbonetos dos combustíveis que são consumidas pelos micro-organismos durante o seu crescimento. Destacam-se pela sua eficiência em efetuar a separação, a identificação e a quantificação das espécies químicas (Molina-Barahona *et al.*, 2004; Demello *et al.*, 2007; Owsianiak *et al.*, 2009).

A cromatografia consiste na separação físico-química dos constituintes do combustível por partição em duas fases, uma móvel e outra estacionária. Na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás quimicamente inerte à fase estacionária e aos componentes da mistura a ser analisada (Gonçalo, 2004). Adicionalmente, as colunas cromatográficas podem ser

acopladas a outras técnicas instrumentais de análise como, por exemplo, detectores de ultravioleta, infravermelho e à espectrofotometria de massa (Souza, 2012).

DeMello *et al.* (2007) utilizaram a cromatografia uni e bidimensional para análise de hidrocarbonetos presentes no diesel e de ésteres graxos metil-estereificados do biodiesel. Estudos mais recentes como Mariano *et al.* (2008), Owsianiak *et al.* (2009), Bücken *et al.* (2011), Liu *et al.* (2011), Wang *et al.* (2011), Cyplik *et al.* (2011), Taccari *et al.* (2012), Meyer (2011), Cerqueira, 2011, Colla (2012) entre outros, utilizam a cromatografia à gás como técnica padrão para análise de óleos submetidos a biodegradação.

Outra forma de se avaliar a degradação de um determinado contaminante é a respirometria. Esta técnica está baseada na quantificação do gás carbônico liberado via respiração aeróbia a partir da descarboxilação dos compostos orgânicos. Com isso, é uma técnica utilizada para estimar a mineralização dos contaminantes (Margesin e Schinner, 2001). Trata-se de uma técnica empregada em diversos trabalhos que avaliam a biodegradação de diesel e misturas diesel/ biodiesel no solo (Soares, Mariano e De Angelis, 2009; Meyer, 2011; Colla, 2012; Silva *et al.*, 2012; Tramontini, 2013). Alguns estudos demonstram a relação entre o CO₂ liberado e a degradação de poluentes orgânicos (Jacques *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012). No entanto, durante a degradação pode ocorrer a formação de compostos intermediários ainda mais recalcitrantes. Desta forma, técnicas cromatográficas podem ser utilizadas como complementares à respirometria nos ensaios de

biorremediação para análise mais acurada da degradação e da composição dos compostos formados durante a degradação primária do combustível (Sendzikiene *et al.*, 2007; Mariano *et al.*, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em quatro etapas:

1) Na primeira etapa, foi realizado um **ensaio preliminar de biorremediação** através de um derrame simulado da mistura B10 em microcosmo utilizando um solo sem histórico de contaminação. Neste ensaio, foi comparada a eficiência de biorremediação da estratégia de atenuação natural e um controle sem adição de contaminante;

2) Na segunda etapa, foi realizada **prospecção de bactérias do gênero *Bacillus*** presentes no solo do tratamento de atenuação natural, selecionando-se as cepas que apresentavam potencial de degradação do combustível B10 em diferentes concentrações;

3) Como os isolados do gênero *Bacillus* não demonstraram potencial degradação da mistura B10 em altas concentrações (acima de 5%) em meio líquido, foi realizada uma **nova etapa de isolamento de bactérias** do mesmo solo em atenuação natural através da técnica de enriquecimento;

4) Nesta última etapa, foi realizada a **seleção de um consórcio** a partir do isolamento das bactérias para execução de um segundo **experimento de biorremediação**. Foram montados microcosmos com as seguintes

estratégias: bioaugmentação com microbiota nativa em comparação com exógena, bioestimulação e atenuação natural.

3.1 Etapa 1- Ensaio preliminar de biorremediação

3.1.1 Coleta da amostra de solo

Amostras compostas de solo com profundidade de 0-20 cm totalizando aproximadamente 5 Kg foram coletadas em uma área cultivada de plantas forrageiras na Faculdade de Agronomia da UFRGS, município de Porto Alegre, RS (30°06'91"S 51°14'27"O). As amostras foram transportadas até o Laboratório de Biorremediação de Solos do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia (UFRGS) para a realização dos experimentos. O solo foi seco a temperatura ambiente e peneirado em malha de 2 mm. Uma porção (1 Kg) do solo coletado foi enviada para análise físico-química no Laboratório de Análise de Solos da UFRGS, de acordo com a metodologia descrita por (Tedesco *et al.*, 1995) e os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 Análise físico-química do solo amostrado

Parâmetros	Resultados
Argila (%)	21
Areia Grossa (%)	42
Areia Fina (%)	24
Silte (%)	13
pH	5
Índice de SMP	6,1
P (mg. dm ⁻³)	60
K (mg. dm ⁻³)	81
Matéria Orgânica (%)	1,6
Nitrogênio (%)	0,07
Carbono Orgânico (%)	0,93
S (mg. dm ⁻³)	7,3
Zn (mg. dm ⁻³)	77
Cu (mg. dm ⁻³)	2,7
B (mg. dm ⁻³)	0,3
Mn (mg. dm ⁻³)	89

3.1.2 Combustível

Para o preparo da mistura B10 foram utilizadas amostras de diesel metropolitano S50 (com 50 ppm de enxofre) e biodiesel metílico (70 % soja e 30 % gordura animal) fornecidos pela Ipiranga Produtos de Petróleo S.A.

A esterilização dos combustíveis (diesel e biodiesel) foi realizada por filtração em membrana de 0,22 µm. Após esse procedimento, os combustíveis foram armazenados à temperatura ambiente em frascos estéreis e protegidos da luz para evitar a foto-oxidação.

3.1.3 Montagem dos microcosmos

O ensaio de biorremediação foi preparado em frascos de vidro hermeticamente fechado com capacidade de 1L contendo 200 g de solo cada.

O solo foi contaminado com a mistura B10 simulando um derrame superficial de 20 g HTP.Kg⁻¹ de solo (HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo). Este valor é considerado como um “valor de intervenção”, segundo os valores orientadores para qualidade do solo da CETESB. Foram montados os tratamentos de atenuação natural e controle (sem adição de combustível) a fim de se verificar a atividade microbiana após uma contaminação com combustível. Os experimentos foram realizados em triplicata e incubados por um período de 30 dias à temperatura ambiente. Para se estimar a atividade de biodegradação por atenuação natural, foram considerados apenas os microorganismos presentes no solo, sem que houvesse a adição de nutrientes. A umidade do solo foi padronizada para a capacidade de campo (em torno de 80 %) para todos os tratamentos, e o solo foi revolvido a cada amostragem para promover aeração.

3.1.4 Avaliação da degradação do contaminante

3.1.4.1 Respirometria e cromatografia

A atividade respiratória do solo pode ser analisada através da determinação do gás carbônico gerado pela comunidade microbiana ao longo de um período determinado (Moreira e Siqueira, 2006), sendo com isto possível também estimar a taxa de mineralização do combustível. Desta forma, cada microcosmo foi equipado com um aparato contendo NaOH 0,5 M para captação de CO₂. A liberação do gás foi monitorada periodicamente. Os frascos foram mantidos hermeticamente fechados e foram abertos somente para determinação da respiração basal. No momento da análise, foram adicionados

2 mL de BaCl 30% ao NaOH e 6 gotas de fenolftaleína 1%. A quantidade de NaOH residual na solução foi titulada com HCl 1M e a produção de C-CO₂ (mg.Kg⁻¹ de solo) foi determinada segundo cálculo descrito por (Stotzki, 1965).

$$C-CO_2 \text{ (mg.kg}^{-1}\text{)} = \frac{[(B - T) \times eq \times M_{HCl} \times FC]}{Mc}$$

B = volume (mL) da solução de HCl gasto para titular o branco (sem solo);

T = volume (mL) da solução de HCl gasto para titular o tratamento;

eq = equivalente-grama, igual a 6;

M = molaridade da solução padronizada do HCl;

FC = Fator de Correção da normalidade ácido/base (M_{HCl}/M_{NaOH});

Mc = massa de solo seco (Kg)

Para determinação da degradação da fração diesel da mistura, os e Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) foram avaliados por cromatografia. Foram retiradas amostras compostas dos três frascos nos tempos de 0, 15 e 30 dias. As amostras foram mantidas em geladeira até o envio para análises cromatográficas na empresa INNOLAB pelo método ISO / DIN 16703:2004. O percentual de degradação foi calculado pela diferença entre as concentrações de HTP presente no tempo inicial em relação à concentração de HTP no tempo 30 dias.

3.2 Etapa 2 – Prospecção e seleção de bactérias produtoras de endósporos

3.2.1 Isolamento das bactérias

Após um período de 30 dias de incubação do solo contaminado com a mistura B10, foi realizada a prospecção do solo do tratamento de atenuação natural. Foi retirada uma amostra de 5 g do solo, o qual foi adicionado a um tubo de centrífuga contendo um volume suficiente para completar 15 mL de solução salina 0,85 %. Os tubos foram incubados por 1 h a 80 °C em banho-maria (Barreto, 2011). Após esse período, foram feitas diluições seriadas até 10^{-6} e uma alíquota de 100 μ L foi inoculada pela técnica de *spread plate* em placa contendo meio ágar nutriente. As placas foram incubadas a 30 °C por 72 h e, posteriormente, realizou-se a purificação das colônias morfologicamente diferentes. As colônias purificadas foram armazenadas em freezer a -20 °C em microtubos com meio contendo 15 % de glicerol. Nessa etapa, os isolados bacterianos foram avaliados pela morfologia celular e coloração de Gram e coloração de endósporo.

3.2.2 Avaliação do potencial de degradação dos *Bacillus* spp.

Para avaliar o potencial degradador dos isolados de *Bacillus*, foi realizado teste utilizando meio mineral (Bushnell e Haas, 1941) com indicador redox 2,3,5 –trifeniltetrazólio (TTC) (Braddock e Catteral, 1999; Meyer et al., 2012) ou 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) (Hanson, Desai e Desai, 1993; Meyer et al., 2012) com a mistura B10. Este método é baseado na redução do indicador redox devido ao fluxo de elétrons oriundos da oxidação do B10. Com

a redução, os indicadores DCPIP ou TTC mudam sua coloração de azul para incolor ou de incolor para rosa, respectivamente.

3.2.2.1 Pré - inóculo

Para preparação do pré-inóculo, os isolados foram inoculados com auxílio de uma alça microbiológica em 20 mL de caldo nutriente em um tubo de centrífuga e incubados por 24 h a 30 °C e 100 rpm. Após esse período, cada tubo foi centrifugado a 9000 rpm, por 10 min e o sedimento de células suspenso em solução salina 0,85%, sendo realizadas mais duas centrifugações e lavagens sequenciais para remoção do caldo nutriente. A suspensão foi incubada em solução salina por 24 h a 30 °C e 100 rpm a fim de esgotar as reservas energéticas das bactérias.

3.2.2.2 Inóculo

Foi realizada a leitura da turbidez de cada suspensão bacteriana em espectrofotômetro (marca Spectrumlab) a 600 nm e ajustada para densidade óptica (DO) inicial de 0,1.

3.2.2.3 Montagem do ensaio

O experimento foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços estéril, contendo 225 µL de meio BH acrescido dos indicadores redox TTC ou DCPIP, 25 µL da suspensão bacteriana com DO ajustada e as concentrações de 1, 10 e 50 % de B10. As placas foram protegidas da ação da luz por papel laminado e incubadas pelo período de 14 dias em temperatura de 30 °C. A

avaliação foi feita através da visualização da mudança de coloração do meio como indicativo da utilização da mistura.

3.2.3 Avaliação dos isolados de *Bacillus* spp. quanto à degradação do combustível em meio sólido

Após o teste realizado em meio líquido, os isolados foram submetidos a um teste em placa de Petri contendo meio mineral (Bushnell e Haas, 1941) e 1 % de B10 como fonte de carbono. As placas foram incubadas por 7 dias a 30 °C. A avaliação do crescimento foi realizada pela visualização no aumento no número de colônias na placa após o tempo de incubação.

3.2.4 Enriquecimento e caracterização dos isolados recuperados

O ensaio com indicadores redox não demonstrou a possível utilização do B10 como fonte de carbono pelos isolados de *Bacillus*. Desta forma, foi realizada a técnica de enriquecimento para adaptação dos isolados ao combustível conforme França *et al.* (2011). Esse procedimento consiste numa forma de pressionar seletivamente apenas as populações capazes de crescer utilizando a mistura B10 como única fonte de carbono. Com isso, os isolados selecionados a partir do teste qualitativo em meio sólido (item 3.2.3) foram inoculados separadamente a partir de uma cultura estoque em frascos contendo 10 mL de meio mineral (Bushnell e Haas, 1941) acrescido de 1 % da mistura B10 e incubados a 30 °C e 100 rpm. A cada 5 dias foi transferida uma alíquota de 1 mL para um frasco contendo o mesmo meio mineral e B10, totalizando 4 transferências e 20 dias de incubação.

Transcorridos os 20 dias, cada cultura passou por diluições seriadas até 10^{-3} em solução salina estéril e 100 μ L da maior diluição foi inoculado em placas contendo ágar nutriente. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h e, após esse período, cada isolado foi novamente caracterizado quanto à morfologia colonial e celular através da coloração de Gram. A morfologia colonial (crescimento em ágar nutriente) e celular (lâminas com coloração de Gram) foi observada em microscópio estereoscópico e microscópio óptico, ambos da marca OLYMPUS. As colônias e células foram fotografadas com câmera fotográfica Samsung ES15 acoplada a ocular de ambos microscópios. Para registro das colônias, foi utilizado aumento de 1x e, para as células, foi utilizado zoom óptico de 4x da câmera e aumento de 1000x no microscópio.

3.2.5 Ensaio de biodegradação de B10 por *Bacillus* spp. em meio líquido

Após a realização da técnica de enriquecimento, os isolados recuperados foram caracterizados morfologicamente e, posteriormente, cada morfotipo foi submetido a ensaios de biodegradação em meio líquido.

3.2.5.1 Ensaio de biodegradação preliminar

O pré-inóculo de cada isolado foi obtido inoculando-se uma cultura estoque em tubos de centrífuga contendo 20 mL de caldo nutriente estéril e incubado por 48 h a 30 °C a 100 rpm. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o

sedimento de células foi suspenso com solução salina estéril 0,85%. Posteriormente, foi ajustada a DO para 0,1 a 600nm.

Para o preparo do inóculo, adicionou-se separadamente 1 mL de cada isolado com DO ajustada em frascos contendo 9 mL de meio (Bushnell e Haas, 1941), pH 7,0 e 1 % de B10. Os isolados foram incubados por 16 dias a 30 °C e 100 rpm. Também foram incubados, concomitantemente, frascos controle do experimento: um controle para cada isolado sob as mesmas condições, sem adição de combustível e outro contendo meio mineral (Bushnell e Haas, 1941) e o combustível sem a adição de bactérias.

Os parâmetros analisados foram o crescimento populacional pela contagem no número de colônias (UFC.mL⁻¹) e medidas de pH. Para o crescimento no número de células, foi retirada uma alíquota de 100 µL de cada frasco e realizada diluição seriada até 10⁻⁴ em microtubos contendo 900 µL de solução salina estéril. Após isso, duas gotas de 25 µL de cada diluição foram inoculadas em placas contendo meio ágar nutriente e incubadas por 24 h em estufa a 30 °C. Para a contagem, foram escolhidas as diluições que continham entre 10 e 100 colônias.

As medidas de pH da fase aquosa foram realizadas para identificação da natureza dos metabólitos oriundos da degradação do combustível no tempo 0, 7 e 16 dias, com auxílio de um potenciômetro (marca Digimed DM-22).

3.2.5.2 Seleção dos isolados em diferentes concentrações da mistura B10

Como forma complementar de selecionar os isolados, foi realizado concomitantemente um teste para avaliar a utilização da mistura B10 em concentrações crescentes. Os isolados foram submetidos a um teste com 3 concentrações da mistura 1, 5 e 10 %. O ensaio consistiu no inóculo de cada isolado separadamente com uma concentração entre 10^4 e 10^5 UFC.mL⁻¹ em 4,5 mL de meio BH acrescido de TTC e 1, 5 ou 10% da mistura B10. O resultado foi avaliado a partir da mudança de coloração do meio de incolor para rosa. Essa coloração indica a redução do indicador trifeniltetrazólio a trifenil formazan (TPF) a partir dos elétrons liberados pela degradação do combustível via respiração.

3.2.5.3 Ensaio de biodegradação com os isolados selecionados

A etapa de pré-inóculo e inóculo foi realizada conforme demonstrado no item 3.2.5.1. A montagem do ensaio foi feita através do inóculo das bactérias isoladamente ou em consórcio (3 bactérias em conjunto) com a adição de uma alíquota de 7 mL da suspensão bacteriana em frascos contendo 63 mL do meio BH (Bushnell e Haas, 1941) e uma concentração de 7 % de B10 (concentração escolhida como intermediária entre as concentrações testadas no item 3.2.5.2).

O crescimento da população microbiana foi acompanhado durante 14 dias através da estimativa da concentração de proteínas totais ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) pelo método de Bradford (1976). Para a preparação do reagente de proteína,

dissolveu-se 100 mg de Coomassie Blue BG250 (Merck, Alemanha) em 50mL de etanol 95%. A essa solução, adicionou-se 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução final foi diluída com água destilada em volume de 1L e, posteriormente, filtrada. A absorbância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro. A curva padrão foi montada tendo como base as seguintes concentrações de Albumina de Soro Bovino (BSA): 10, 20,50,80,120 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O crescimento dos isolados bacterianos foi avaliado também pela contagem das colônias nos tempos 1, 3, 7, 10 e 14 dias de incubação. Foi retirada uma alíquota de 100 μL de cada frasco e, após a amostra passar por diluições seriadas, 25 μL de cada diluição foi inoculado em placas de ágar nutriente. A contagem das colônias ocorreu após 24 h de incubação a 30 °C. Para obtenção dos valores de proteína total dos cultivos com a mistura B10, foram subtraídos os valores de absorbância observados para os controles sem inóculo e o controle inoculado sem a mistura B10. Esse procedimento foi realizado a fim de reduzir variações do método colorimétrico, uma vez que a absorbância pode ser influenciada por proteínas provenientes das células inativas (valor do controle com bactérias sem B10), bem como pela reação do reagente com o combustível.

3.3 Etapa 3 – Isolamento e seleção de um consórcio com potencial de degradação da mistura B10

O foco deste trabalho foi a avaliação da biodegradação da mistura B10 em solo contaminado com concentração de intervenção (acima de 5 g .Kg⁻¹ de solo) implicando, portanto, na necessidade de se selecionar uma

microbiota com capacidade de degradação nessas condições. Tendo em vista que os isolados anteriores não foram eficientes na degradação da mistura B10 em altas concentrações, foi realizada outra etapa de prospecção a fim de isolar novas bactérias com potencial de degradação da mistura B10. A etapa de seleção com altas concentrações deve-se ao fato de que no experimento de biorremediação em solo (item 3.3.5) a concentração da mistura utilizada ter sido de 36 g.Kg de solo⁻¹. Assim, essa nova fase foi realizada a fim de selecionar microbiota nativa potencialmente degradadora e sua re-introdução no solo, através da estratégia de Bioaumentação.

Nesta etapa, também os isolados selecionados por Colla (2012) foram reativados e submetidos à avaliação preliminar (conforme item 3.3.2) para se verificar a capacidade degradativa dessas bactérias e possibilitar a sua aplicação no solo, compondo o consórcio para Bioaumentação de exógenos.

3.3.1 Enriquecimento e bioprospecção de bactérias de solo contaminado artificialmente

Para realizar a bioprospecção, foi coletado um solo contaminado com 50 g.kg de solo⁻¹ da mistura B10 que estava em processo de biorremediação sob estratégia de atenuação natural. O experimento foi montado no Laboratório de Biorremediação de Solos do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia (UFRGS). O solo amostrado foi proveniente do mesmo local originalmente coletado para o ensaio preliminar de biorremediação (item 3.1.1). Primeiramente, foi retirada amostra de 10 g do solo e adicionado a um frasco contendo meio mineral mínimo (MM1) (Richard e

Vogel, 1999) acrescido de 1 % de B10 em um volume final de 100 mL. A cada 7 dias, uma alíquota de 10 mL foi transferida para um meio nas mesmas condições, conforme Bento *et al* (2005). Transcorridos 21 dias, a cultura crescida (10^{-3}) passou por diluições seriadas em solução salina (0,85%), com inoculação de 100 μ L das maiores diluições em meio enriquecido (*Plate Count Agar* - PCA). As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h (Colla, 2012). As colônias morfológicamente diferentes foram purificadas e armazenadas congeladas (-20°C) em microtubos com meio contendo 15 % de glicerol. Nesta etapa, os isolados foram também caracterizados pela morfologia celular e coloração de Gram.

3.3.2 Avaliação preliminar dos isolados quanto ao potencial degradador com indicador redox TTC

3.3.2.1 Teste com isolados nativos

Como os micro-organismos prospectados já haviam sido submetidos a concentração de 1 % da mistura na fase de enriquecimento, optou-se por submetê-los a maiores concentrações do combustível nessa etapa. A preparação do pré-inóculo e inóculo foi feita conforme item 3.2.2.1 e 3.2.2.2, respectivamente. O ensaio preliminar foi realizado através da inoculação individual, em triplicata, de cada um dos isolados em 4,5 mL de meio MM1 contendo o indicador redox TTC, 0,5 mL do micro-organismo com DO ajustada e a concentração de 5, 10 e 25 % do combustível como única fonte de carbono disponível. O sistema foi montado em frascos de 25 mL protegidos da ação oxidante da luz e incubados pelo período de 14 dias em temperatura de 30 °C.

O critério de seleção foi a mudança de coloração do meio indicando que houve a redução do indicador TTC em todas as concentrações testadas em até 7 dias.

3.3.2.2 Teste com isolados exógenos

Para realizar o teste com os micro-organismos exógenos (Tabela 3), foram utilizados os isolados selecionados e identificados a nível molecular por Colla (2012). No estudo de Colla (2012), os isolados foram submetidos a 5 % da mistura B10 apenas em consórcio. No presente trabalho, optou-se por submetê-los às mesmas condições do ensaio descritas no item 3.3.2.1. Desta forma, foi avaliado se os isolados exógenos ainda mantinham a capacidade de degradação em meio mineral contendo a mistura B10 como única fonte de carbono.

Tabela 3 Identificação das bactérias isoladas de solo contaminando com combustível e selecionadas para formar consórcios (Colla, 2012).

Isolado	Identificação
UFRGS 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2
UFRGS 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3
UFRGS 4	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
UFRGS 8	<i>Enterococcus</i> sp
UFRGS 9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9
UFRGS 14	<i>Ochrobactrum intermedium</i>

3.3.3 Ensaio de biodegradação de B10 em meio líquido por 11 diferentes consórcios microbianos

Os isolados bacterianos selecionados no ensaio descrito no item anterior (3.3.2.1), formaram 10 diferentes consórcios com três bactérias cada,

cujas combinações foram estabelecidas em cálculo de análise combinatória de acordo com a fórmula sugerida por Colla (2012):

$$C_{n,s} = \frac{n!}{s! \cdot (n-s)!}$$

Neste caso, $n = 5$ (isolados) e $s = 3$ (número de micro-organismos desejado para compor cada um dos consórcios), gerando 10 combinações diferentes.

As combinações foram denominadas de A a J (Tabela 4), tendo sido testada também o desempenho dos cinco isolados em conjunto (K), totalizando 11 consórcios testados.

Tabela 4 Composição dos 10 consórcios integrantes do ensaio, a partir de diferentes combinações entre os isolados bacterianos.

Consórcio	Isolados		
A	UFRGS S2	UFRGS S3	UFRGS S4
B	UFRGS S2	UFRGS S3	UFRGS S6
C	UFRGS S2	UFRGS S3	UFRGS S12
D	UFRGS S2	UFRGS S4	UFRGS S6
E	UFRGS S2	UFRGS S4	UFRGS S12
F	UFRGS S2	UFRGS S6	UFRGS S12
G	UFRGS S3	UFRGS S4	UFRGS S6
H	UFRGS S3	UFRGS S4	UFRGS S12
I	UFRGS S3	UFRGS S6	UFRGS S12
J	UFRGS S4	UFRGS S6	UFRGS S12

Os microcosmos foram montados em triplicatas em frascos contendo 4,5 mL de meio mineral (Richard e Vogel, 1999) com TTC, 500 μ L de suspensão bacteriana e 15 % de B10. Os mesmos consórcios foram submetidos às mesmas condições na presença dos combustíveis B100 (Biodiesel) e B0 (Diesel), nas concentrações de 1,5 e 13,5 %, respectivamente.

Estas concentrações de biodiesel e diesel correspondem a 10 e 90 %, respectivamente, dos 15 % de B10 adicionados. Este teste foi realizado para verificar a tolerância dos consórcios à presença do diesel e biodiesel na concentração correspondente a contaminação que foi adicionada de B10. A incubação foi conduzida à temperatura de 30 °C, sob agitação de 100 rpm e proteção da ação oxidante da luz. Dois ensaios de controle negativo foram realizados: não inoculado, composto por meio MM1 com o indicador TTC e pela fonte de carbono; e inoculado, contendo o meio MM1 com o indicador TTC.

Para acompanhar o crescimento no número de células dos consórcios durante o período de 7 dias, foram retiradas alíquotas de 100 µL no tempo de incubação de 0, 2 e 7 dias. As amostras passaram por diluições decimais seriadas e a contagem de unidades formadoras de colônias foi realizada a partir da semeadura de 25 µL das diluições realizadas em meio ágar nutriente. Os resultados foram avaliados após 48 h de incubação a 30 °C. Os microcosmos também foram analisados quanto ao mudança de coloração (indicando a redução do indicador TTC via respiração) e, com isso, a possível utilização do combustível, a fim de identificar as combinações mais eficientes na utilização da mistura de diesel/biodiesel fornecida.

3.3.4 Avaliação da tolerância dos consórcios selecionados em meio líquido com concentrações crescentes de B10

A partir dos resultados obtidos no teste descrito no item 3.3.3, foram selecionadas combinações de isolados segundo o critério de aumento no

número de células em menor espaço de tempo e mudança de coloração do meio conforme item 3.2.5.2. Assim, os 6 consórcios mais eficientes foram submetidos ao teste de biodegradação de B10 em meio líquido. Esse teste foi realizado a fim de avaliar a tolerância dos consórcios a concentrações crescentes da mistura de forma a verificar a capacidade degradadora e o crescimento da população.

Os microcosmos foram montados em duplicatas em frascos de vidro com capacidade para 25 mL. Os inóculos foram adicionados à concentração inicial de 10^7 UFC.mL⁻¹ em meio MM1 estéril com indicador redox (TTC), contendo 30, 45 e 60 % de B10 em um volume 5 mL. A incubação foi à temperatura de 30 °C, a 100 rpm e proteção da ação oxidante da luz.

O crescimento da população microbiana foi acompanhado durante 5 dias, através da estimativa da concentração de proteínas totais ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), realizada em 0, 3 e 5 dias, de acordo com o método de (Bradford, 1976). A preparação do reagente foi feita conforme o item 3.2.5.3.

A viabilidade celular também foi monitorada pela inoculação de 25 μL da cultura em crescimento em meio enriquecido. Os resultados, classificados como positivos ou negativos, foram verificados após 24 h de incubação das placas a 30 °C.

3.3.5 Identificação molecular dos micro-organismos utilizados no consórcio

A identificação dos micro-organismos utilizados no consórcio empregado no experimento de Biorremediação (Bioaugmentação Nativos - item 3.3.5), foi realizada através da amplificação e sequenciamento de um fragmento de DNA que codifica o gene 16S rDNA. O DNA genômico foi submetido à amplificação do gene 16S rDNA por PCR, utilizando os *primers* F 5' TCCTACGGGAGGCAG-CAGT3' e R 5'GGACTAC-CAGGGTATCTAATCCTGTT3' (Nadkarni *et al.*, 2002).

As reações foram otimizadas em 25 µL de volume total incluindo 1µL de extrato de DNA, 0.5 µL of Taq DNA polymerase (5U/µl) (Invitrogen), 2,5 µL buffer (Invitrogen, SG, Milanese, Italy), 1,5 µL de MgCl₂ 50mM, 1 µL de desoxinucleotídeos (25 mM) e 1 µL de cada *primer* (10 µM). As reações de amplificação foram realizadas no Termociclador Techne TC 312, nas seguintes condições: 40 ciclos (30s a 94°C, 30s a 37°C e 1min. a 72°C) e um ciclo adicional de 72°C por 5min. O produto de PCR esperado de 466 pares de base foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1 % com 1 µL de SybrGreen. Após a eletroforese, o produto da PCR foi purificado utilizando Kit de purificação de DNA (PureLink® Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen). A reação de sequenciamento ocorreu com 2 µL do produto da PCR e 4 µL de cada primer. Ambas as fitas do fragmento amplificado foram sequenciadas utilizando *DNA Analyser* ABI 3730xl (Applied Biosystems) pela empresa ACTGene Análises Moleculares . Os dados da sequência do gene foram manualmente alinhados,

corrigidos e editados utilizando o *software* BioEdit 7.1.3 (Hall, 1999). Para classificação taxonômica das sequências, foram utilizados dois bancos de dados a fim de se obter maior acurácia na identificação a nível de espécie. Desta forma, foi considerada similaridade igual ou maior que 99%, comparando as sequências homologas no BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e score acima de 0,95 no RDP (Ribossomal Database Project - <http://rdp.cme.msu.edu/>).

3.4 Etapa 4 - Experimento de biorremediação

3.4.1 Coleta do solo não contaminado e montagem dos microcosmos

A amostra de solo foi coletada conforme apresentado no item 3.1.1 no período de janeiro de 2013.

Os microcosmos foram montados em triplicatas em frascos de vidro hermeticamente fechados e capacidade de 1L. Primeiramente, a quantidade total de solo utilizada no experimento foi incubada por dois dias à temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 7\text{ }^{\circ}\text{C}$) após incorporação de CaCO_3 ($2,1\text{ g.kg}^{-1}$ de solo) na quantidade recomendada por (Tedesco *et al.*, 1995) visando a correção do pH para 7,0. Através desse procedimento de incubação prévio, buscou-se evitar a superestimava na quantificação de CO_2 liberado que poderia ser observada nos primeiros dias do experimento, devido à adição do corretivo calcário. Após o período de preparo, foram distribuídos 200 g de solo em cada frasco, a fim de

garantir que o oxigênio não fosse fator limitante para ocorrência do processo de degradação.

A contaminação consistiu na simulação de um derrame superficial de 45000 m³ da mistura B10 em uma área de ½ ha. Essa proporção de contaminação corresponde a cerca de 36 g de HTP.kg de solo⁻¹. Segundo a tabela de Valores de Referência da CETESB, este valor corresponde a uma concentração de intervenção, ou seja, um solo contaminado com essa característica obrigatoriamente deve receber alguma remediação para ocorrer descontaminação. Assim, quatro estratégias de biorremediação foram analisadas quanto a biodegradação da mistura B10, além do controle sem combustível:

Controle negativo (C) – solo sem contaminação, com correção da umidade e do pH;

Atenuação natural (AN) – solo contaminado com a mistura B10, com correção da umidade e do pH;

Bioestimulação (B) – solo contaminado com a mistura B10, com correção da umidade, do pH e ajuste da proporção C:N:P para 100:10:1 pela adição de uma solução de NH₄NO₃ e KH₂PO₄;

Bioaugmentação com Exógenos (BE)– solo contaminado com a mistura B10, com correção da umidade e do pH, ajuste da proporção C:N:P e inoculação de consórcio previamente selecionado por Colla, 2012.

Bioaugmentação com Nativos (BN)– solo contaminado com a mistura B10, com correção da umidade e do pH, ajuste da proporção C:N:P e inoculação do consórcio de bactérias nativas selecionado no item 3.3.

O preparo do inóculo para os tratamentos de bioaugmentação foi realizado conforme descrito no item 3.3.2. Os volumes de inóculo e de solução de nutrientes adicionados aos tratamentos foram ajustados para que se mantivesse a capacidade de campo do solo em torno de 70 %. A correção da umidade para o controle negativo e atenuação natural deu-se pela incorporação de água estéril.

O ensaio foi realizado à temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 7\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a umidade gravimétrica foi monitorada ao longo do período de incubação do solo a partir de pesagens dos microcosmos. O ajuste de água foi feito sempre que necessário, através da adição de água destilada estéril (Tedesco *et al.*, 1995).

3.4.2 Monitoramento da população microbiana

3.4.2.1 Estimativa da população total de micro-organismos heterotróficos e degradadores

O acompanhamento da estimativa da população microbiana foi realizado conforme metodologia proposta por (Braddock e Catteral, 1999) nos dias 0, 8, 15 e 28 dias. Primeiramente, foi coletada uma amostra de 1 g de solo de cada frasco e realizada diluição seriada até 10^{-10} . Após agitação, 20 μL de cada diluição foi inoculado em placas de poliestireno de 96 poços contendo 250 μL de Caldo Nutriente. A avaliação do crescimento foi feita após 72 h de

incubação a 30°C. Foram considerados positivos os poços em que o meio apresentava turbidez e o NMP das amostras foi determinado a partir do da consulta dos resultados obtidos em relação a uma tabela padronizada (Apha, 1995).

Para determinação dos degradadores, 20 µL de cada diluição foi inoculado em placas de 96 poços contendo 240 µL de meio MM1 acrescido de TTC e 20 µL de B10 (Braddock e Catteral, 1999). As placas foram incubadas sob proteção da luz durante 14 dias a 30 °C. Foram considerados positivos os poços que apresentaram mudança de coloração de incolor para rosa indicando a redução do indicador trifeniltetrazólio (TTC) ao final do período de incubação. A estimativa do NMP das amostras foi determinada conforme descrito para heterotróficos.

3.4.3 Avaliação da biodegradação do contaminante

3.4.3.1 Respirimetria

Para avaliação da atividade microbiana e mineralização do combustível, os frascos contendo 200 g de solo foram equipados com um aparato de captação de CO₂, composto por copos plásticos com 20 mL de solução de NaOH 0,5 M, suspensos por um tripé de metal. Os sistemas foram mantidos incubados durante 28 dias a temperatura ambiente, com aberturas periódicas para amostragens e para substituição da solução de NaOH. A cada amostragem, foi adicionado 1 mL de solução de BaCl₂ 30 % ao NaOH para precipitação do CO₂. Em seguida, quatro gotas do indicador fenolftaleína 1 %

foram adicionados e a solução titulada com HCl 0,5 M. A fim de promover a aeração, antes de fechar novamente os frascos, estes foram manualmente revirados. A produção de C-CO₂ (mg.Kg⁻¹ de solo) foi determinada segundo cálculo descrito no item 3.1.4.1.

3.4.3.2 Cromatografia Gasosa (CG)

Para avaliação da degradação do contaminante (fração diesel), foram coletadas amostras do tempo inicial e tempo final (28 dias) do experimento e as análises foram conduzidas segundo o método EPA 8015. O cálculo do percentual de degradação foi realizado de acordo com a fórmula a seguir:

$$\% = \frac{DTi - DTf}{DTi}$$

DTf = valor de HTP no tempo final

DTi = valor de HTP no tempo inicial

3.5 Análise estatística

Os dados de liberação de CO₂, percentual de degradação e NMP foram interpretados a partir da análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tuckey com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) para comparar as médias entre os tratamentos. O programa estatístico utilizado foi o *Statistica*, versão 7.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Etapa 1- Ensaio preliminar de Biorremediação

4.1.1 Análise respirométrica e cromatografia

A produção acumulada de CO₂ durante 30 dias do solo contaminado e não contaminado pode ser observada na Figura 4. Nesse período, pode-se verificar que o microcosmos onde não foi adicionada a mistura B10 (controle negativo) produziu em torno de 500 mg de C-CO₂ acumulado ao longo do tempo. Estes valores sugerem a mineralização de compostos orgânicos presentes na matéria orgânica do solo.

Os valores de C-CO₂ liberados do microcosmos da estratégia de atenuação natural passaram a diferir de forma significativa do controle a partir do 2º dia de incubação, o que sugere a utilização da mistura B10 pela microbiota nativa. Além disso, a produção de C-CO₂ foi significativamente maior no tratamento com combustível indicando também que a concentração da mistura diesel/biodiesel não foi tóxica a microbiota.

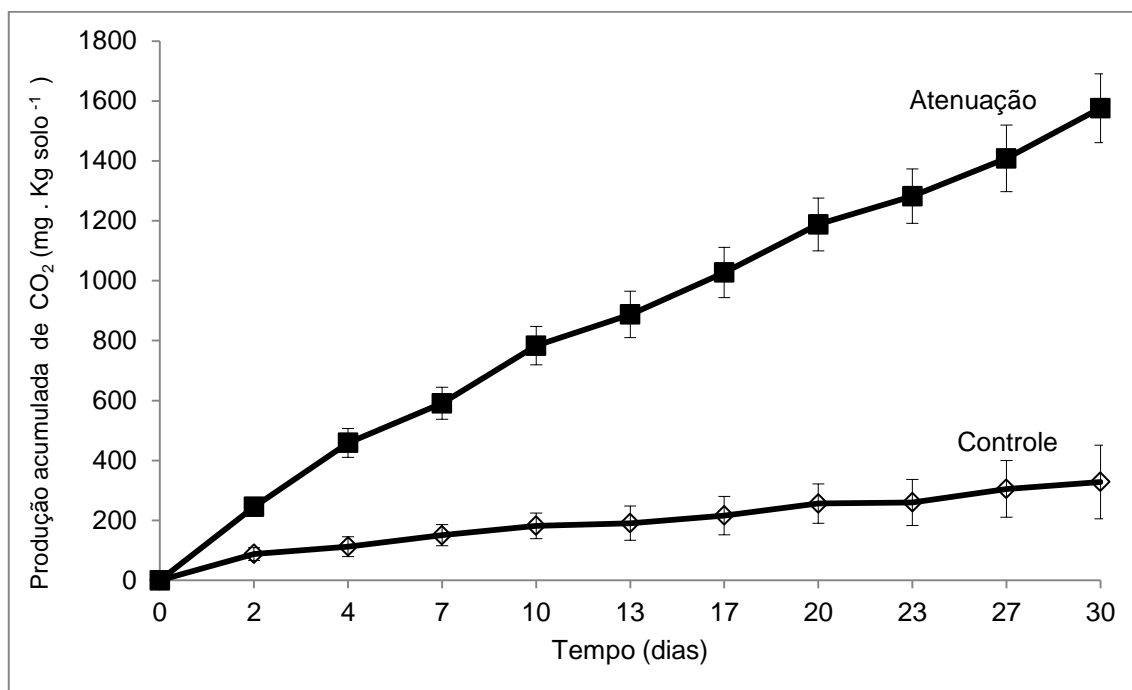


Figura 4: Produção acumulada de C-CO₂ do solo contaminado por B10 durante o ensaio de biorremediação por 30 dias. Controle (sem a mistura B10); Atenuação natural (com a mistura B10).

Os resultados de degradação por cromatografia mostraram que a estratégia de atenuação natural apresentou a maior redução na concentração (16%) no período final da biorremediação, comparado aos primeiros dias (3,5%). Embora os resultados de C-CO₂ tenham sido significativamente maiores para atenuação natural em relação ao controle em todo período de biorremediação ($p < 0,05$), a redução do contaminante foi de 18,9 % após 30 dias. Considerando que a produção de C-CO₂ foi de aproximadamente 900 mg . Kg⁻¹ de solo nos primeiros dias de ensaio e o percentual de degradação baixo nesse mesmo período, sugere-se que a microbiota possa ter utilizado a fração de biodiesel da mistura em detrimento da fração do diesel. Alguns estudos mostram que o biodiesel é mais facilmente degradado que o diesel (Zhang *et al.*, 1998; Lapinskiene, Martinkus e Rebzdaite, 2006; Pasqualino, Montane e Salvado, 2006), com isso, o uso das frações mais lábeis, como os ácidos

graxos presentes no biodiesel, podem ter estimulado a atividade respiratória inicial da microbiota. Com isso, o incremento no percentual de degradação nos 13 dias finais de tratamento pode ter sido resultado do efeito sinérgico do biodiesel na degradação dos hidrocarbonetos do diesel (Zhang *et al.*, 1998; Mudge e Pereira, 1999).

Meyer (2011), em estudo sobre biorremediação com a mistura B20, e Colla (2012) utilizando a mistura B10, observaram que as estratégias de atenuação natural também apresentaram liberação de CO₂ superior aos controles, dando indícios da capacidade microbiana autóctone de metabolizar o combustível. No entanto, Colla (2012) ao avaliar a degradação por cromatografia gasosa no tratamento de atenuação natural em solo com concentração semelhante de matéria orgânica (1,5 %), verificou taxas reduzidas de degradação dos hidrocarbonetos (0,16 %) sendo essas inferiores às observadas neste estudo. (Silva *et al.*, 2012) ao testarem a biodegradabilidade de misturas diesel/biodiesel em solo contendo aproximadamente 7 % de matéria orgânica sob atenuação natural observaram taxa respiratória menor para a mistura B20, quando comparada as misturas com 5 e 50 % do biodiesel na amostra. Ainda, obtiveram uma degradação para B20 de 39 % somente após o período de 60 dias. Portanto, as taxas de liberação de C-CO₂ observadas e a redução de 18,9 % dos hidrocarbonetos após 30 dias, demonstraram a presença de micro-organismos com capacidade para a degradação de hidrocarbonetos, considerando que a comunidade microbiana nativa não havia sido exposta ao contaminante anteriormente.

4.2 Etapa 2 – Prospecção e seleção de bactérias produtoras de endósporos

A partir da metodologia de tratamento térmico empregada para isolamento de bactérias esporuladas, foram recuperados 41 isolados bacterianos. Cada isolado foi caracterizado quanto à morfologia colonial e celular através da coloração de Gram, bem como coloração de endósporo, conforme mostrado na Figura 5.

O isolamento de bactérias produtoras de endósporos teve como objetivo de selecionar micro-organismos potencialmente degradadores e tolerantes a altas concentrações (acima de 5 g.Kg de solo⁻¹) de contaminantes (Barreto, 2011). O gênero *Bacillus* é citado frequentemente como degradador de petróleo e derivados. Barreto (2011), em seu estudo com *Bacillus*, prospectou 100 isolados de manguezal, destacando-se 15 bactérias com potencial de degradação de petróleo através da utilização de biosurfactantes presentes no sobrenadante das culturas. Baseado no estudo de Barreto (2011), foi utilizada a técnica de isolamento de bactérias do gênero *Bacillus* considerando também que os resultados observados no ensaio preliminar de biorremediação evidenciaram a presença de microbiota com capacidade para degradar a mistura B10.

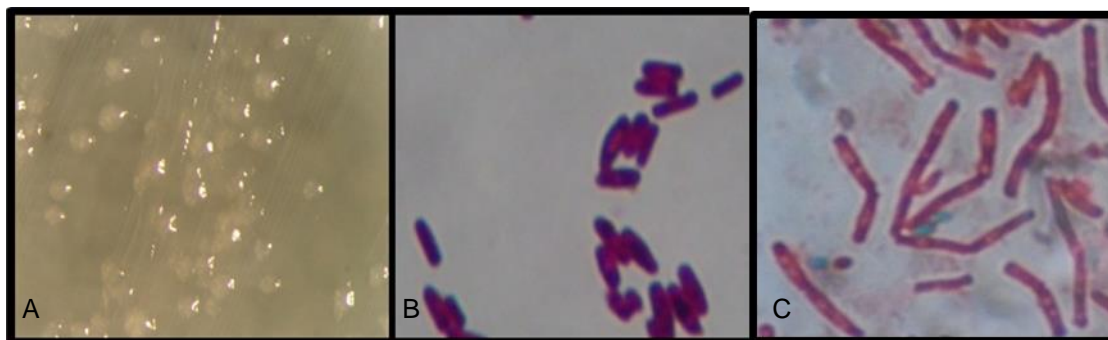


Figura 5 Aspectos morfológicos do isolado UFRGS10. A – colônias em ágar nutriente (Aumento de 4x) ; B – Aspecto celular obtido através de coloração de Gram (Aumento 1000x e Zoom óptico de 3x); C – Coloração de endósporo (Aumento 1000x e Zoom óptico de 3x).

4.2.1 Avaliação preliminar da degradação de B10 pelos isolados de *Bacillus* spp. utilizando indicadores redox.

A avaliação preliminar do crescimento dos isolados de *Bacillus* spp. foi conduzida em meio mineral com indicadores redox (TTC e DCPIP) e B10 em concentrações crescentes (1, 10 e 50 %) do combustível para avaliar a tolerância às altas concentrações da mistura. Não foi observada mudança de coloração do meio, o que seria caso houvesse a utilização do combustível como fonte de carbono. Isso pode ter ocorrido por diversos motivos, tais como: pouco tempo de exposição da microbiota ao contaminante; forma de prospecção e meio de cultivo para o teste da degradação.

Em relação ao tempo de exposição, sugere-se que a microbiota, mesmo tendo sido isolada de um solo contaminado com esse mesmo combustível, poderia não ter potencial de degradá-lo. Em geral, diversos microorganismos presentes no solo podem realizar o processo de biodegradação do combustível, mesmo não estando expostos a contaminação, no caso de solo sem histórico coletado. No entanto, é pequena a fração da microbiota capaz de

utilizar esses compostos como fonte de carbono e energia (Lebkowska et al., 1995; Atlas e Hazen, 2011; Megharaj *et al.*, 2011). A exposição a contaminantes de forma crônica pode gerar uma pressão seletiva que permite a seleção e manutenção de populações capazes de sobreviver no ambiente impactado (Colla, 2012). Logo, o tempo de exposição da microbiota a contaminação pelo período de 30 dias pode não ter sido suficiente para selecionar bactérias potencialmente degradadoras e aumentar sua população de forma que viabilizasse a recuperação em laboratório.

A forma de prospecção pode ter sido outro ponto limitante para esse resultado. A condição utilizada de prospecção das bactérias do solo permitiu o isolamento apenas da microbiota produtora de endósporos. Desta forma, tais bactérias poderiam estar inativas no solo, não fazendo parte da microbiota degradadora que foi evidenciada pelo experimento de biorremediação preliminar. Em diversos estudos com prospecção de micro-organismos degradadores, o gênero *Bacillus* é uma das espécies citadas (Bento *et al.*, 2005; Kebria *et al.*, 2009; Cerqueira *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2012).

O gênero *Bacillus* é conhecido pela sua tolerância aos mais variados ambientes e sobrevivência durante milhares de anos na forma de esporo. Essa tolerância pode estar associada à formação da estrutura de resistência que é ativada em condições ambientais adversas (Nicholson *et al.*, 2000).

4.2.2 Avaliação dos isolados de *Bacillus* spp. quanto à degradação do combustível em meio sólido

Na tentativa de detectar os possíveis isolados degradadores foi utilizado outro meio de cultura sólido com a mistura B10 obtendo-se possível obter 24 isolados que apresentaram crescimento significativo após 7 dias de incubação. Estes isolados foram utilizados para a próxima etapa.

4.2.3 Enriquecimento e caracterização dos isolados recuperados

A técnica de enriquecimento promove uma pressão seletiva, selecionando micro-organismos com a capacidade de degradação. (França, Vieira e Cavalcanti, 2011) sugerem o uso dessa metodologia em etapa anterior a experimentos de biorremediação a fim de adaptar a microbiota ao meio mineral líquido e ao combustível como a única fonte de carbono disponível.

Dos 24 isolados do gênero *Bacillus* provenientes da seleção em placa submetidos à técnica de enriquecimento, foram recuperados 11 morfotipos que foram confirmados quanto à morfologia colonial e celular.

4.2.4 Ensaios de biodegradação de B10 por *Bacillus* spp. em meio líquido

4.2.4.1 Ensaio de biodegradação 1

A partir dos parâmetros avaliados através do ensaio em meio líquido (estimativa por UFC) e medidas de pH, não foi evidenciada a possível

utilização da mistura B10 pelos isolados, uma vez que não houve aumento na população de bactérias (Tabela 5).

Ao comparar a concentração de células no controle sem adição do combustível com os valores do ensaio, foi possível verificar que os isolados mantiveram a sua população na concentração que haviam sido inoculadas, sem apresentar aumento na densidade. Com isso, pode-se inferir que os isolados bacterianos não utilizaram o combustível como fonte de carbono e energia para formação de biomassa.

Tabela 5 Valores de concentração de células e medidas de pH da fase aquosa dos tratamentos contendo BH acrescido de B10 durante 16 dias.

Isolados	Número de células UFC.mL ⁻¹				pH final
	0 dias	4 dias	7 dias	16 dias	
4	4,80E+04	4,80E+04	7,33E+04	9,00E+05	7,03
10	6,40E+05	6,40E+05	6,40E+05	6,40E+05	6,92
12	9,00E+05	9,00E+05	9,00E+05	1,00E+05	6,77
14	2,56E+05	2,56E+05	3,80E+05	4,33E+05	6,97
19	3,40E+05	3,40E+05	3,40E+05	5,67E+05	6,79
21	7,60E+05	7,60E+05	2,96E+05	1,53E+06	6,72
22	6,40E+05	6,40E+05	6,40E+05	8,67E+04	6,99
25	5,80E+04	5,80E+04	1,29E+05	1,93E+05	6,85
27	8,60E+04	8,60E+04	1,93E+05	5,93E+05	7,02
28	1,44E+05	1,44E+05	1,63E+05	1,63E+05	6,90
34	2,00E+05	2,00E+05	1,07E+04	2,93E+05	7,02

* Os valores de UFC dos isolados são o resultado da subtração dos valores de UFC encontrados para o controle sem adição do combustível.

O valores de pH final dos cultivos variaram de 6,77 (isolado UFRGS 12) a 7,03 (isolado UFRGS 34). Considerando o pH inicial 7,0 dos cultivos, houve apenas uma leve redução nos valores de pH para maioria das bactérias. Alguns estudos indicam que durante o crescimento microbiano às expensas de óleo diesel e biodiesel, são produzidos ácidos orgânicos que podem acidificar o meio aquoso (Bento *et al.*, 2004; Bacosa, Suto e Inoue, 2010; Bucker *et al.*, 2011). No entanto, relacionando os dados observados de diminuição do pH com a estabilidade no número de células ao longo do período de incubação, sugere-se que essa acidificação possa ser proveniente da lise celular e/ou da degradação abiótica da mistura B10 utilizada (Bucker *et al.*, 2011).

4.2.4.2 Seleção dos isolados em diferentes concentrações da mistura B10

A partir do teste com meio MM1 e TTC, 3 bactérias apresentaram mudança de coloração em pelo menos duas das três concentrações após 7 dias de incubação. Os isolados de bactérias foram testados em novo ensaio de biodegradação em meio líquido a fim de confirmar a efetividade dessa degradação, como critério para continuar ou não com esses isolados.

4.2.4.3 Ensaio de biodegradação dos isolados selecionados

A estimativa indireta de crescimento com o método de Bradford foi utilizada como uma alternativa para avaliar o crescimento microbiano, já que pela contagem no número de colônias (item 4.2.4.1) não houve evidência de crescimento populacional.

A partir da análise dos dados apresentados na Figura 6, observou-se um aumento na quantidade de proteínas para todos os isolados ao final de 14 dias. Os valores de proteína variaram em torno de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no primeiro dia de amostragem para $14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ao final de 14 dias. O perfil de produção de proteínas foi semelhante para todos os isolados cultivados separadamente, bem como para os isolados em consórcio, obtendo a produção máxima em 14 dias de ensaio para o isolado UFRGS14 ($14 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Beker (2011) realizou estudo utilizando 1 % de B7 durante 14 dias em meio líquido com quatro bactérias, incluindo duas do gênero *Bacillus*. Nesse trabalho, foram observados valores de proteína total para essas bactérias variando entre 10 e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os micro-organismos utilizados no referido estudo, *Bacillus megaterium* e

Bacillus pumilus, foram prospectados de ambiente com exposição crônica a hidrocarbonetos e haviam demonstrado potencial de degradação da mistura diesel/biodiesel no trabalho de Meyer (2011). No entanto, com a mistura B7, foi observado comportamento semelhante ao verificado para os isolados de *Bacillus* do presente trabalho com a mistura B10. Desta forma, pode-se inferir que a mistura B10 não foi utilizada como fonte de carbono pelos isolados de *Bacillus* a ponto de aumentar a sua taxa metabólica em níveis significativos.

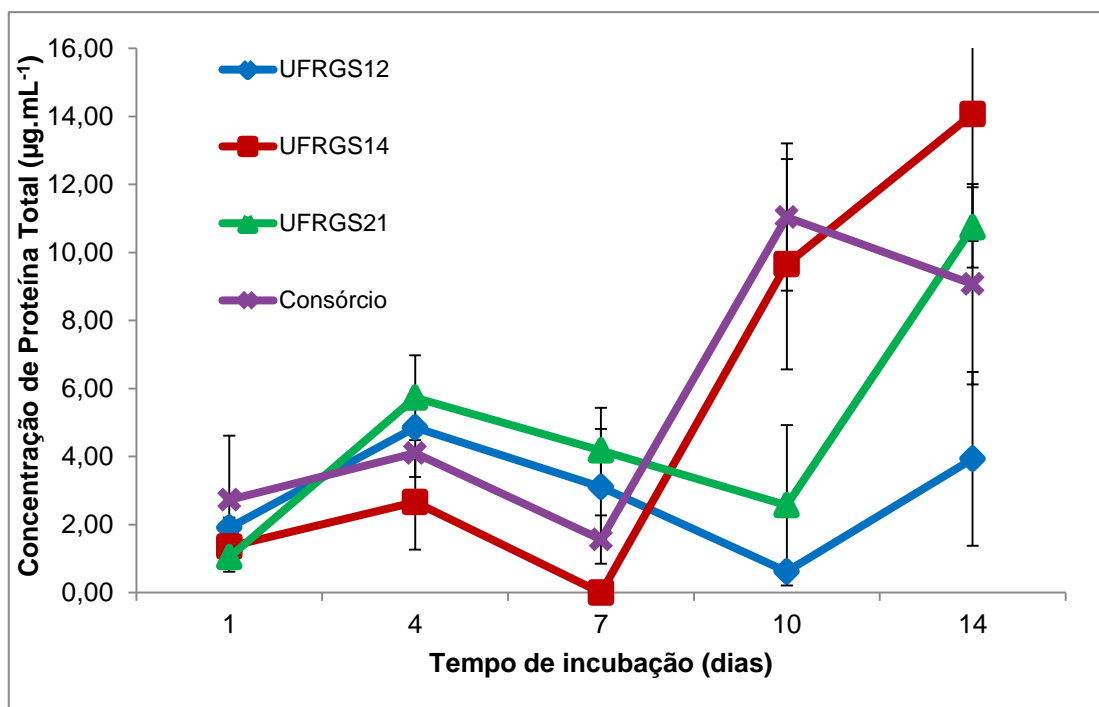


Figura 6 Produção de proteínas totais pelos isolados bacterianos UFRGS 12, UFRGS 14, UFRGS 21 e consórcio em meio mineral BH e a mistura B10 durante 14 dias.

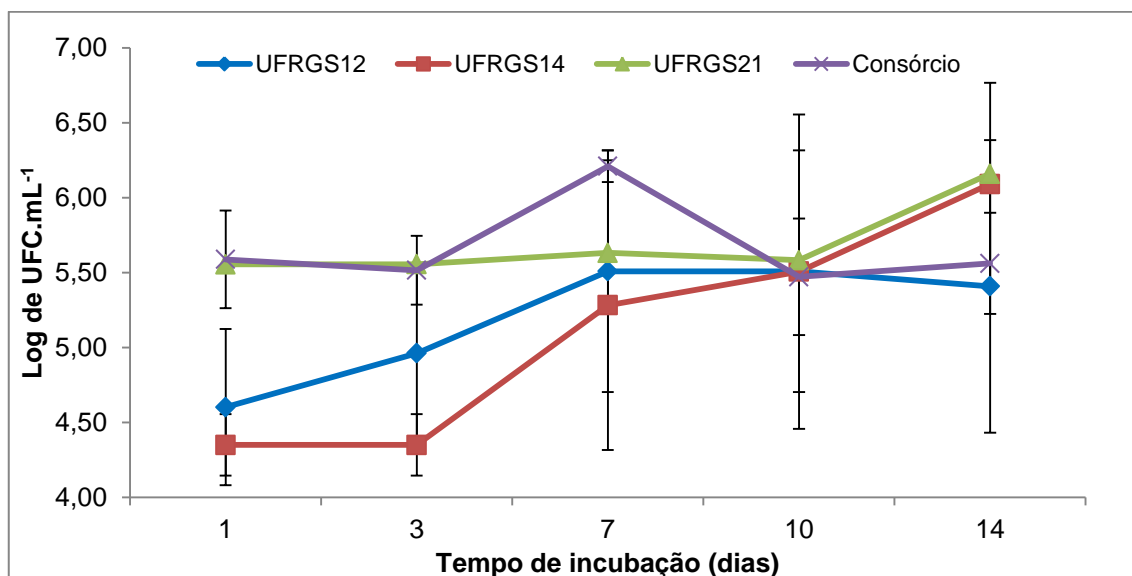


Figura 7 Estimativa do crescimento populacional dos isolados de bactérias UFRGS 12, UFRGS14, UFRGS 21 isoladas e em consórcio cultivados meio mineral BH e a mistura B10 durante 14 dias.

O perfil de crescimento demonstrado na Figura 7 foi diferente para o isolado bacteriano UFRGS14 comparado aos demais isolados. Enquanto as populações dos isolados UFRGS12, UFRGS21 e consórcio mantiveram-se em torno de 10^5 , o número de colônias do isolado UFRGS14 aumentou em aproximadamente 100x após 14 dias de ensaio.

O isolado bacteriano UFRGS14 destacou-se comparado aos outros isolados testados nas mesmas condições. Contudo, o tempo que esta bactéria levou para aumentar em 10x o número de células foi de 7 dias. No estudo de Cerqueira (2011), no qual foi avaliada a capacidade de crescimento de diversos isolados de *Bacillus* em meio líquido, porém com uma fonte de carbono diferente e mais tóxica (1 % de borra oleosa), foram observados valores de proteína total que variaram de aproximadamente 100 μg a 300 μg ao final de 14 dias de incubação. Meyer (2012) em estudo com isolados de *Bacillus* em meio líquido com 1 % da mistura B20, observou valores de proteína em torno

de 400 µg em 7 dias de incubação. No estudo de Barreto (2011) com isolados de *Bacillus* em meio líquido contendo uma fonte de carbono prontamente metabolizável (glicose), houve considerável aumento (1000x) no número de células nas primeiras horas de incubação. Esse comportamento observado para os isolados de *Bacillus* no estudo citado, diferente do observado no presente trabalho, pode indicar que a presença do B10 como uma única fonte de carbono gerou uma condição desfavorável ao desenvolvimento das cepas de *Bacillus*, intensificando a formação de endósporos que possibilitassem a sobrevivência neste ambiente e, por conseguinte, a inativação do metabolismo microbiano.

Tendo em vista os resultados observados para *Bacillus* até essa etapa e considerando que em nenhum dos testes essas bactérias tiveram efetivo desempenho, optou-se por realizar nova prospecção com método diferente de isolamento. Além disso, escolheu-se trabalhar com bactérias totais, aproveitando o potencial metabólico da microbiota de forma mais abrangente, sem restringir apenas a um grupo.

4.3 Etapa 3 – Isolamento de bactérias totais e seleção de um consórcio com potencial de degradação da mistura B10

4.3.1 Avaliação preliminar dos isolados quanto ao potencial degradador com indicador redox TTC

Os resultados obtidos a partir do teste preliminar de biodegradabilidade (Tabela 6) sugerem a existência de uma comunidade

microbiana nativa competente em degradar a mistura B10 nas concentrações de 5, 10 e 25 %.

Tabela 6 Avaliação da capacidade de degradação do combustível em diferentes concentrações pelos isolados após 7 dias de incubação.

Isolados	Concentração do combustível		
	5 %	10 %	25 %
UFRGSS1	***	**	-
UFRGSS2	***	***	***
UFRGSS3	***	***	***
UFRGSS4	***	***	***
UFRGSS5	***	-	-
UFRGSS6	***	***	***
UFRGSS7	***	-	-
UFRGSS8	***	**	-
UFRGSS9	***	***	-
UFRGSS10	***	***	-
UFRGSS11	***	***	-
UFRGSS12	***	***	***
UFRGSS13	***	***	-
UFRGSS14	-	-	-
UFRGSS15	***	***	-

Simbologia indica intensidade de crescimento: (-) resultado negativo; asteriscos representam resultados positivos (*) menor intensidade e (***) maior intensidade. Os números marcados em negrito correspondem ao isolados selecionados

Foi possível selecionar 5 das 15 bactérias previamente isoladas conforme descrito no item 3.3.2.1, pois foram capazes de reduzir o indicador redox TTC a TPF constatado pela mudança na coloração do meio mineral de incolor para rosa no período de até 7 dias de incubação. Apenas um dos isolados (UFRGS S14) não apresentou mudança de coloração em nenhuma das concentrações testadas, o que pode ter ocorrido devido à incapacidade de tolerar as concentrações gerando efeitos tóxicos às células. As demais bactérias testadas demonstraram capacidade de crescimento às expensas de pelo menos duas das concentrações fornecidas. Desta forma, os cinco isolados de melhor desempenho destacados em negrito na Tabela 6 de acordo

com os critérios determinados, foram utilizados nas etapas seguintes para composição e seleção de consórcio microbiano.

4.3.2 Ensaio de biodegradação de B10 em meio líquido por 10 diferentes consórcios microbianos

O critério utilizado para avaliação da degradação da mistura B10 pelos isolados durante sete dias foi o aumento populacional em menor tempo e mudança na coloração do meio de cultura nos três combustíveis testados. A partir desse critério, seis consórcios que apresentaram maior aumento na densidade populacional (Figura 8 e Tabela 7) em menos tempo e modificaram a cor do meio nos três combustíveis testados (B0, B10 e B100) foram selecionados. A composição microbiana dos consórcios de A a K encontra-se na Tabela 4.

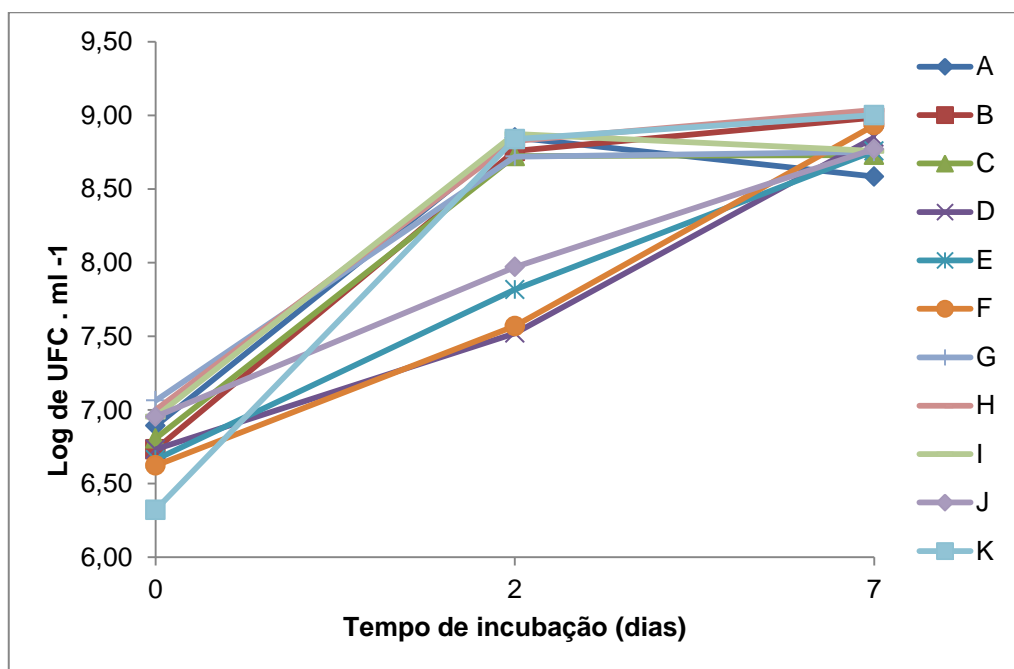


Figura 8 Crescimento no número de células dos consórcios bacterianos de A a K em contagens de UFC.mL⁻¹ durante 7 dias de incubação a 30 °C.

O perfil de crescimento de 6 consórcios demonstrou um maior aumento no número de células em 48 h quando comparado aos demais, conforme observado na Figura 8. As combinações (A, B, C, G, H, I e K) tiveram um aumento no número de células de aproximadamente duas ordens de grandeza nas primeiras 48 h de incubação e estabilizaram a população até o final do ensaio. Os demais consórcios apresentaram crescimento mais lento apenas apresentando o mesmo aumento populacional ao final de 7 dias de incubação. Colla (2012) em estudo com isolados bacterianos em consórcio realizado sob as mesmas condições do presente trabalho, também observou o máximo crescimento populacional atingido nas 48 h de incubação.

Tabela 7 Valores de UFC e mudança de coloração dos meios com consórcios bacterianos de A a K em contagens de UFC.mL⁻¹, nos tempos 0, 2 e 7 dias.

Consórcios	(UFC.mL ⁻¹)			Crescimento após 7 dias		
	0	2	7	B0	B10	B100
A	7,80E+06	4,84E+08	3,93E+08	**	***	***
B	5,40E+06	4,22E+08	1,90E+09	**	***	***
C	6,40E+06	4,41E+08	5,73E+08	**	***	***
D	5,40E+06	3,37E+07	7,10E+08	-	*	**
E	4,60E+06	5,23E+07	6,40E+08	-	**	***
F	4,20E+06	3,51E+07	8,80E+08	-	*	***
G	1,16E+07	4,61E+08	5,80E+08	**	***	***
H	1,00E+07	4,97E+08	1,10E+09	**	***	***
I	9,00E+06	6,11E+08	7,40E+08	**	***	***
J	9,00E+06	5,86E+07	6,20E+08	-	***	***
K	2,10E+06	5,30E+08	1,03E+09	**	***	***

Simbologia indica intensidade de crescimento : (-) resultado negativo; asteriscos representam resultados positivos (*) menor intensidade e (***) maior intensidade. O números marcados em negrito correspondem ao consórcios selecionados.

Todos os consórcios apresentaram mudança de coloração do meio contendo B100 na concentração de 1,5 % (10 % da concentração de B10 utilizada) nas primeiras 48 h de incubação. No meio com diesel puro (B0), destacaram-se 7 consórcios (A, B, C, G, H, I, K). No teste contendo a mistura

B10, combustível de interesse nesse trabalho, todos consórcios mudaram a coloração do meio, porém essa coloração ocorreu em diferentes intensidades, conforme mostrado na Tabela 7.

Os resultados combinados nas análises de contagem de colônias (aumento populacional) e de utilização dos combustíveis (redução do indicador redox), indicaram que 6 das 10 combinações testadas tiveram melhor eficiência, sendo um deles (k), o consórcio com a combinação de todos os 5 isolados.

Para a etapa seguinte de tolerância, foram selecionadas as 5 melhores combinações (em negrito na Tabela 7), excluindo o consórcio K por apresentar o mesmo desempenho com 5 bactérias comparado aos demais que tinham apenas 3. Esse resultado pode indicar que apenas alguns micro-organismos do referido consórcio estavam ativos em detrimento de outros. Dessa forma, os consórcios A, B, C, G, H e I foram submetidos ao teste com concentrações superiores a 15 % de B10. O desempenho de cada consórcio foi avaliado durante 5 dias nas concentrações de 30, 45 e 60 % através do determinação da concentração de proteínas totais e pela avaliação visual do aumento na turbidez dos cultivos. Também foi verificada a viabilidade celular nos tempos 72 e 120 h. A melhor combinação dos resultados do ensaio descrito no presente item juntamente com os resultados de tolerância foi o critério de seleção do consórcio para posterior aplicação no solo.

4.3.3 Avaliação da tolerância dos consórcios selecionados em meio líquido com concentrações crescentes de B10

Conforme visualizado na

Figura 9, o crescimento dos consórcios em relação à concentração de proteína total demonstra que todas as combinações foram capazes de adaptar-se às altas concentrações da mistura. Mesmo os consórcios com menores taxas de produção de proteínas tiveram um aumento da concentração ao longo do período de incubação. Dessa forma, as concentrações de 30, 45 e 60 % da mistura B10 as quais os consórcios foram submetidos não se mostraram inibitórias, uma vez que os ensaios também apresentaram resultado positivo para o teste de viabilidade celular em todos os tempos amostrados e para todas as concentrações de B10 a que foram submetidos.

Destaca-se o comportamento dos consórcios B e H em relação aos demais, pois mantiveram-se com concentrações de proteínas totais elevadas para todas as concentrações testadas no tempo de 72h, indicando que as bactérias estavam ativas metabolicamente, mesmo com as concentrações elevadas do combustível. Para os demais consórcios (A, C, G, I) houve um comportamento variado em relação às concentrações de B10.

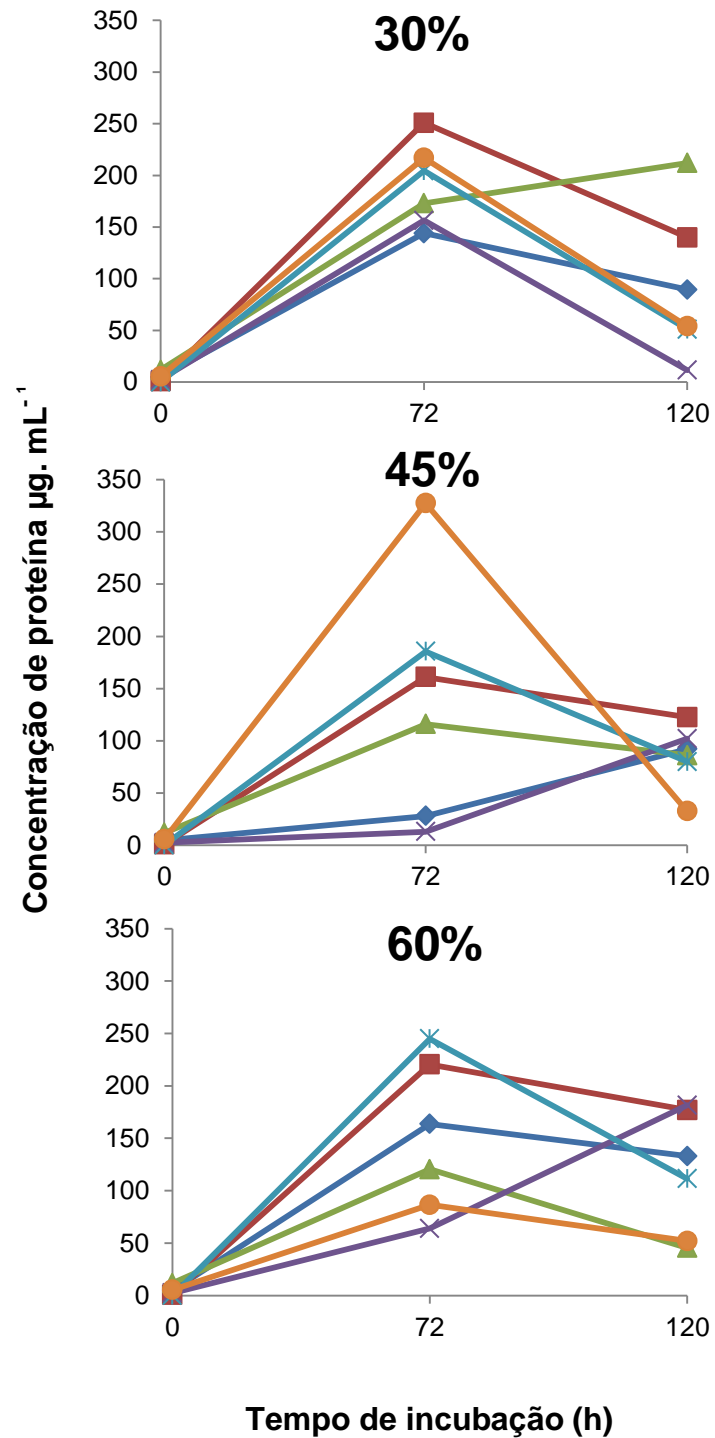


Figura 9 Valores de Proteína Total na fase aquosa em meio mineral em diferentes concentrações da mistura B10 durante 5 dias de incubação. A - 30 %; B - 45%; C - 60 %.

—◆— A —■— B —▲— C —×— G —*— H —●— I

Considerando que a mistura B10 foi a única fonte de carbono disponível no sistema, esperava-se que o aumento da concentração da mistura de 30 para 60 % acarretaria em maiores taxas de produção de proteínas. No entanto, o consórcio I, por exemplo, obteve seu pico de produção com 45 % (327 µg) e a produção mais baixa com 60 % (86 µg). Colla (2012) em estudo com diferentes combinações de isolados bacterianos em meio líquido e concentrações crescentes da mistura B10 (10 a 40 %), observou um perfil de produção proteica semelhante, com as maiores taxas de proteínas totais nas menores concentrações do combustível. A autora sugere que esse comportamento pode ter ocorrido devido à limitação de oxigênio e disponibilidade de nutrientes ocasionada pela alta concentração do contaminante (40 %) (Colla, 2012). No presente trabalho, esse efeito pode ter se intensificado considerando que a concentração do contaminante foi ainda maior, dificultando, desta forma, a difusão do oxigênio para os micro-organismos na coluna da fase oleosa para fase aquosa.

Na análise de biodegradação da mistura B10 pela redução do TTC, bem como na avaliação da viabilidade celular, todos os consórcios demonstraram comportamento semelhante. Todos permaneceram viáveis nos tempos amostrados para todas as concentrações. Com 72 h de cultivo, todos microcosmos demonstraram a utilização do combustível pelo aumento da turbidez do meio. Portanto, neste teste de tolerância, a produção de proteínas foi o diferencial entre os consórcios, já que foi o parâmetro em que os micro-organismos apresentaram comportamentos distintos, conforme mostrado na

Figura 9.

Os consórcios denominados de B e H foram os que demonstraram maior capacidade de crescimento na maioria das concentrações de combustível empregadas. Ambos apresentaram tolerância à presença de B10 nas concentrações de 30, 45 e 60 %. No primeiro ensaio de biodegradação (Tabela 7), no entanto, o consórcio B apresentou maior aumento no número de células (de $5,4 \times 10^6$ para $1,9 \times 10^9$) quando comparado ao consórcio H (de 1×10^7 para $1,1 \times 10^9$). Desta forma, o consórcio B foi capaz de sobreviver a todas as concentrações da mistura B10 e utilizar o combustível como fonte de carbono e energia para seu crescimento, tendo sido, portanto, selecionado para os testes de biorremediação em solo.

Estudos recentes tem demonstrado que a degradação dos constituintes do diesel é compartilhada entre os indivíduos de uma comunidade microbiana diversa, na qual alguns micro-organismos são capazes de crescer em ambientes contendo a maioria dos hidrocarbonetos, enquanto outros são especializados apenas em poucos substratos (Ciric, Philp e Whiteley, 2010). Portanto, a coexistência e a cooperação de micro-organismos especializados que apresentem complementaridade substrato-específica são requisitos importantes para a eficiência de biorremediação de um local impactado (Zanaroli *et al.*, 2010). Desta forma, tem crescido o número de estudos comparando o desempenho biodegradador de culturas puras e consorciadas ou a atuação de consórcios totalmente diversos (Ghazali *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2009; Cerqueira, 2011). No entanto, são escassas pesquisas direcionadas

ao entendimento da influência de cada membro do consórcio na eficiência da degradação (Colla, 2012).

O estudo com diferentes combinações de micro-organismos previamente a aplicação do consórcio em local impactado é uma etapa importante. Isso porque o potencial de um consórcio na biodegradação não necessariamente é um somatório das capacidades individuais de cada um dos isolados, uma vez que o metabolismo de determinado isolado pode estar associado à presença de outros micro-organismos (Ghazali *et al.*, 2004; Cerqueira *et al.*, 2011; Colla, 2012). Desta forma, dependendo da combinação utilizada, os efeitos sinérgicos positivos entre os membros de uma associação podem variar refletindo em potenciais de degradação distintos entre consórcios (Colla, 2012).

4.3.4 Identificação molecular dos micro-organismos utilizados no consórcio

A análise da sequência parcial do gene 16S rRNA mostrou que os os três micro-organismos utilizados para o tratamento de bioaugmentação com nativos correspondem às espécies *Klebsiella*, *Burkholderia* e *Ochrobactrum*, conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8 Identificação das bactérias utilizadas em consórcio no experimento de biorremediação.

Isolado	Identificação	Similaridade
UFRGS S2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100%
UFRGS S3	<i>Burkholderia lata</i>	99%
UFRGS S6	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	99%

Os gêneros dos micro-organismos isolados neste trabalho são constituídos de bactérias gram negativas em forma de bastonete que apresentam metabolismo comumente associado ao ciclo do nitrogênio, seja na fixação do N atmosférico (Iniguez, Dong e Triplett, 2004; Taule *et al.*, 2012) ou na desnitrificação (Kim, Song e Yoo, 2006; Padhi *et al.*, 2013), frequentemente isoladas da rizosfera de solos (Farina *et al.*, 2012). A presença e o isolamento destes micro-organismos em local de cultivo de plantas forrageiras como observado no presente trabalho, tem sido amplamente relatado na literatura (Ladha, Barraquio e Watanabe, 1983; Behar, Yuval e Jurkevitch, 2005; Jha e Kumar, 2007; Sachdev *et al.*, 2009; Taule *et al.*, 2012). Ainda, mesmo que essas bactérias tenham sido isoladas de uma área sem histórico de contaminação, a interação com as plantas cohabitantes permite a exposição desses micro-organismos a uma gama complexa de substâncias. Isso pode promover o desenvolvimento de estratégias de sobrevivência e metabolização de compostos orgânicos com características químicas relacionadas à composição dos combustíveis. Desta forma, bactérias provenientes desses ambientes podem carregar uma capacidade intrínseca para degradação de compostos orgânicos recalcitrantes.

O gênero *Klebsiella* é constituído por bacilos gram negativos anaeróbios facultativos isolados dos mais diversos ambientes como solos, rios, efluentes industriais e domésticos (Padhi *et al.*, 2013) plantas (Iniguez, Dong e Triplett, 2004; Taule *et al.*, 2012) e animais, incluindo seres humanos (Bagley, 1986). É descrita a resistência desses micro-organismos a compostos tóxicos (Daware *et al.*, 2012) como cianetos (Chen *et al.*, 2010) metais pesados (Bar *et*

al., 2007) e, por isso, vem sendo reportadas com potencial para a biorremediação de mercúrio, cádmio e outros compostos orgânicos (Zulfiqar e Shakoori, 2012), corantes (Boopathy e Melancon, 2004; Li, Y. *et al.*, 2008) agrotóxicos (Kwon *et al.*, 2002) e compostos nitroaromáticos (Zhao *et al.*, 2002). Ainda, o metabolismo associado a desnitrificação indica o uso desses micro-organismos para biorremediação de efluentes industriais com alto teor de nitrogênio (Kumar e Pal, 2013).

A presença desses micro-organismos tem sido relatada em diversos ambientes contaminados com hidrocarbonetos como em águas subterrâneas associadas a efluentes contaminados com diesel e gasolina, bem como a pluma de contaminação de hidrocarbonetos de petróleo (Kao *et al.*, 2010). Alguns estudos relatam o isolamento de bactérias do gênero *Klebsiella* de solos contaminados com potencial para degradação de óleo biodiesel (Chao *et al.*, 2010) diesel (Vieira *et al.*, 2007) e também compostos aromáticos (Zhang e Zhu, 2012), sendo observado seu potencial degradador quando combinadas com outras espécies (Owsianiak *et al.*, 2009). Ainda, linhagens de *K. pneumoniae* isoladas de estuário contaminado com hidrocarbonetos apresentaram capacidade de degradar até 100 % da concentração inicial de 30 mg .L⁻¹ dos hidrocarbonetos alifáticos (nonano) e aromáticos (tolueno, xileno, naftaleno) adicionados ao meio líquido (Rodrigues *et al.*, 2009). Além da capacidade catalítica associada à presença de enzimas, a habilidade de sobrevivência a estes compostos pode estar relacionada à produção de tensoativos já que micro-organismos deste gênero isolados de solos contaminados por hidrocarbonetos (Ajayi, Balogun e Adegbehingbe, 2008) ou

resíduo de óleo de soja (Lee *et al.*, 2008) mostraram capacidade para produção de biosurfactantes.

A espécie *Burkholderia lata* foi recentemente descrita como nova espécie do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBC) (Vanlaere *et al.*, 2009). O CBC compreende um conjunto diverso de bactérias encontrados nos mais variados ambientes, como solos, águas, plantas, rizosfera e animais, incluindo humanos (Coenye e Vandamme, 2003). Apresentam reconhecida habilidade como promotores de crescimento em plantas, degradação de pesticidas e ainda como agentes na biorremediação de xenobióticos. A degradação de óleo tem sido evidenciada (Joo *et al.*, 2008) já que são encontradas tanto em amostras de biodiesel contaminado (White *et al.*, 2011), como em solos impactados com hidrocarbonetos (Uhlik *et al.*, 2013). Além disso, esse gênero destaca-se pela versatilidade metabólica na degradação tanto do diesel como biodiesel, atuando na degradação simultânea de n-alcanos numa ampla faixa de números de carbonos (Mohanty e Mukherji, 2008), bem como de Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (Plangklang e Reungsang, 2011; Uhlik *et al.*, 2013)

O gênero *Ochrobactrum* identificado no presente trabalho também estava presente no consórcio de bactérias utilizado no tratamento de Bioaugmentação com exógenos (BE), cujas bactérias foram isoladas por Colla (2012) de solo contaminado com diesel. A linhagens deste gênero já foram descritas como resistentes e redutoras de metais (Branco, Alpoim e Moraes, 2004; Li, B. *et al.*, 2008), como degradadoras de agrotóxicos (Ermakova *et al.*,

2010). Há relatos de seu isolamento e degradação em meios impactados por petróleo (Arulazhagan e Vasudevan, 2011; Ferhat *et al.*, 2011), e derivados como diesel fóssil (Mariano *et al.*, 2008), sendo demonstrado seu potencial para aplicação na biorremediação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de baixo e alto peso molecular (Arulazhagan e Vasudevan, 2009; Wu *et al.*, 2009). Ainda, tem sido caracterizada como produtores biosurfactantes (Calvo *et al.*, 2008; Ferhat *et al.*, 2011; Mishra e Singh, 2012) e enzimas relacionadas à degradação de hidrocarbonetos (Cerqueira *et al.*, 2012; Mishra e Singh, 2012). Foi demonstrado que a presença de *Ochrobactrum*, *Klebsiella* associadas em consórcio com outras espécies pode ser positiva na degradação de misturas diesel/biodiesel em meio líquido (Owsianiak *et al.*, 2009). Em outro estudo de biodegradação de águas residuais provenientes de indústrias petroquímicas, um consórcio constituído de *Ochrobactrum* associado a outras cinco linhagens bacterianas, foi capaz de reduzir o HTP de 320 mg.L⁻¹ para 8 mg.L⁻¹, em biorreator (Gargouri *et al.*, 2011).

O potencial para degradação de compostos do diesel e biodiesel para os três isolados evidenciado nos estudos ora citados é predominantemente relacionado ao diesel em ensaios de biodegradação com concentração de combustível até 50 %. No presente trabalho, as espécies foram testadas isoladamente e em consórcio para degradação das mistura B10 em concentrações crescentes, atingindo 60 %. Desta forma, o estudo com esses micro-organismos permitiu avaliar a capacidade de tolerância a altas concentrações da mistura em meio líquido e ainda a habilidade de degradação do B10 no solo impactado com concentração de intervenção (36 g.Kg⁻¹ de solo)

da mistura. No entanto, considerando os diversos nichos ecológico que esses micro-organismos podem ocupar, sugere-se maior aprofundamento nos estudos.

4.4 Etapa 4 - Experimento de Biorremediação

Os experimento de biorremediação foi avaliado durante 28 dias através da quantificação das populações de micro-organismos heterotróficos e degradadores (estimativa de NMP), liberação de CO₂ por respirometria e da degradação da mistura B10 pela cromatografia gasosa.

4.4.1 Monitoramento da população microbiana

A técnica de NMP pode ser aplicada para o monitoramento tanto da comunidade heterotrófica, quanto degradadora de um determinado contaminante em amostras ambientais (Braddock e Catteral, 1999; Vinas *et al.*, 2002; Bento *et al.*, 2005; Lors *et al.*, 2010; Cerqueira *et al.*, 2011). Desta forma, pode-se avaliar o impacto de um dado contaminante pelo crescimento microbiano durante a descontaminação e recuperação de um local. O crescimento no número de micro-organismos através da estimativa de NMP em cada estratégia de biorremediação está apresentado nas figuras 10 e 11.

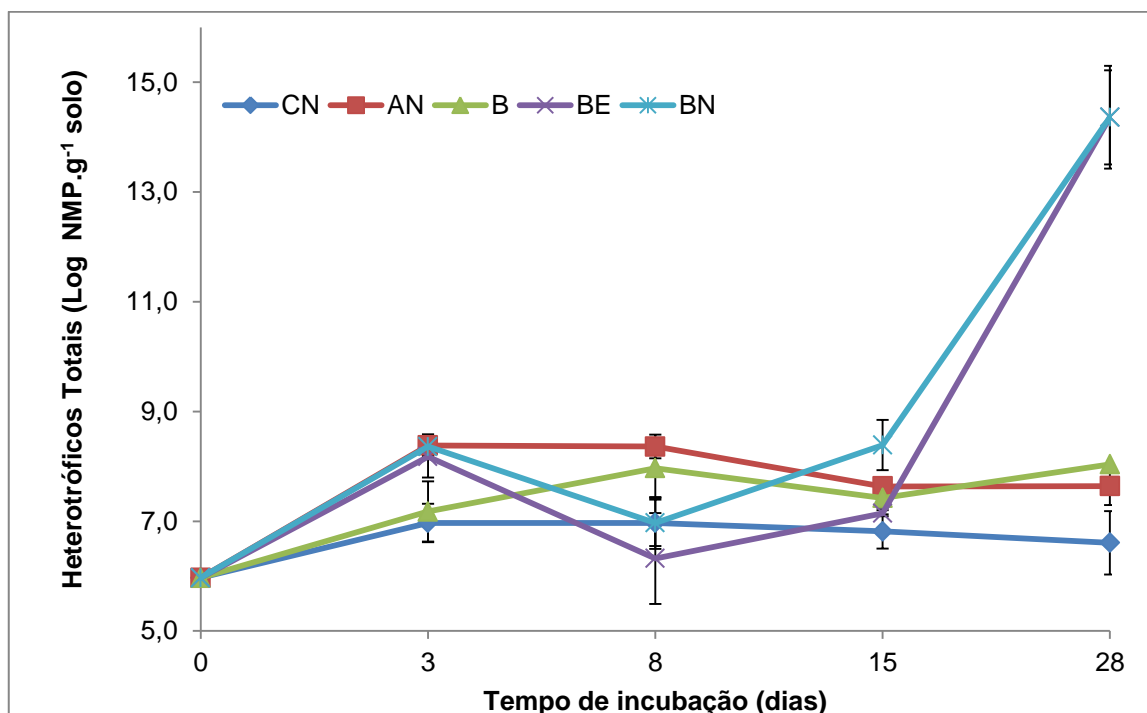


Figura 10: Estimativa do Número Mais Provável de micro-organismos heterotróficos totais em 28 dias de experimento de biorremediação de solo contaminado com B10. CN - Controle; AN - Atenuação natural; BN - Bioaumentação com consórcio de bactérias nativas; BE - Bioaumentação.

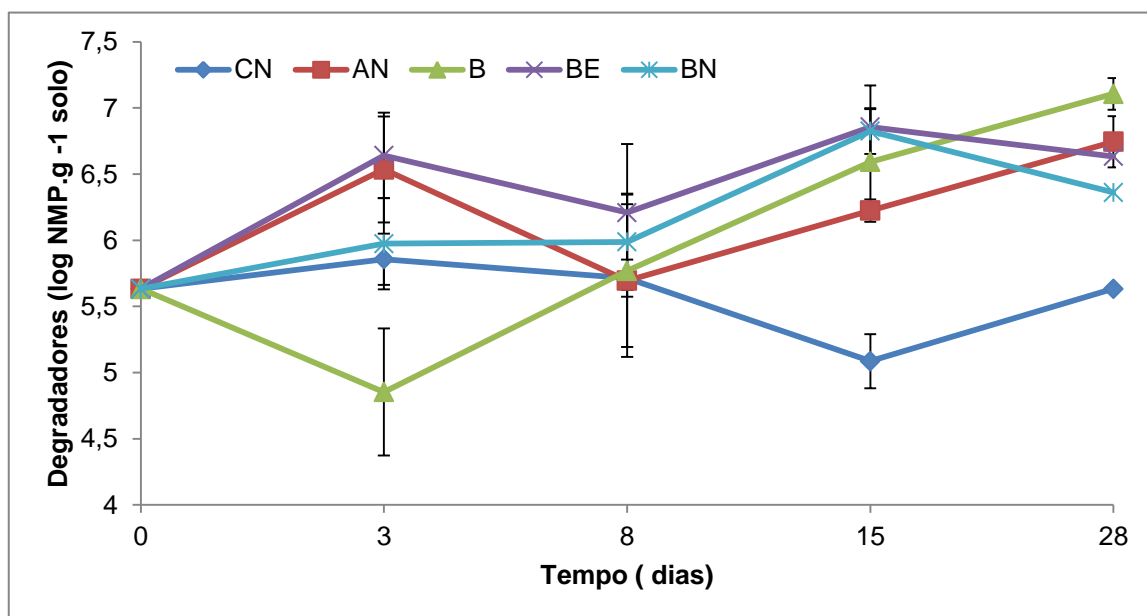


Figura 11 Estimativa do Número Mais Provável de micro-organismos degradadores em 28 dias de experimento de biorremediação de solo contaminado por B10. CN - Controle; AN - Atenuação natural; BN - Bioaumentação com consórcio de bactérias nativas; BE - Bioaumentação.

A partir dos dados de NMP, de uma forma geral, o aumento populacional de micro-organismos heterotróficos foi observado para todos microcosmos, incluindo o controle (sem combustível), nos primeiros 3 dias. Após esse período, a população manteve-se praticamente constante. Apenas para os tratamentos de bioaugmentação foi observado um aumento populacional de 10^8 para 10^{14} no último dia amostrado (28).

Considerando que o solo estava seco no momento da coleta devido a época de verão (altas temperaturas – $30\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) (Tramontini, 2013), o aumento populacional observado nas primeiras 72 h até mesmo no controle pode ter ocorrido devido a adequação dos fatores abióticos (umidade e pH) que são limitantes. Desta forma, esse ajuste prévio permitiu que a microbiota nativa demonstrada no controle aumentasse mesmo sem o aporte de carbono dos demais tratamentos com a mistura. Nesse microcosmo, tanto a população de heterotróficos quanto de degradadores apresentou um aumento inicial seguido por um decréscimo a partir do 8º dia, mantendo-se estável até o final do tratamento. Colla (2012) e Tramontini (2013) em estudos com biorremediação de solo contaminado com B10 também observaram um aumento da população nos estágios iniciais do ensaio e levantaram a hipótese de que a adição de água destilada para correção da umidade pode ter solubilizado os compostos orgânicos do solo, deixando-os mais disponíveis a microbiota nativa. No entanto, esse carbono não foi suficiente para manter as populações, conforme observado pelo declínio após a primeira semana de ensaio. Ao analisar a Tabela 2 (físico-química do solo), pode-se inferir que essa redução populacional pode ter ocorrido porque a população nativa contou apenas com a

matéria orgânica e o carbono orgânico presentes no solo e estes estavam em baixa concentração (1,5 % e 0,93 %, respectivamente), não suportando o crescimento inicial observado.

As estratégias BN (Bioaugmentação com Nativas), BE (Bioaugmentação com Exógenas) e AN (Atenuação Natural) apresentaram um aumento das populações em 72 h de 10^6 para 10^8 . Para os tratamentos BE e BN esse resultado era esperado, visto que foi adicionada microbiota com concentração inicial de 10^8 cels.g⁻¹ de solo. Com o resultado demonstrado para o tratamento AN, no qual havia apenas o combustível sem a adição de microorganismos, é possível inferir que a concentração de B10 adicionada não foi tóxica para microbiota, tanto para nativa como para exógena. Ainda, foi observado que em 72 h a microbiota heterotrófica aumentou sua população em aproximadamente 100 x, indicando o provável uso do combustível como fonte de carbono e energia pela microbiota nativa.

O potencial da microbiota nativa para utilização do B10 já havia sido evidenciado no ensaio preliminar de biorremediação, pois a taxa de produção de C-CO₂ para o tratamento com combustível foi sempre maior do que no tratamento sem o combustível ($p < 0,05$). Neste experimento, os resultados obtidos para a atenuação natural corroboram com os resultados observados no ensaio preliminar, indicando que o combustível estimulou o desenvolvimento da população degradadora nativa, evidenciado pelo aumento populacional comparado ao controle.

Em relação à população de micro-organismos degradadores, foi observado um aumento na densidade populacional para maioria dos microcosmos, com exceção do tratamento com bioestimulação (B), no qual houve uma redução populacional nos primeiros 3 dias de tratamento. Apenas no controle, onde não havia aporte adicional de carbono, foi observada redução do NMP após os primeiros três dias de tratamento. Após o período inicial, detectou-se um aumento da população microbiana nos microcosmos do tratamento de bioestimulação ao longo dos 28 dias de biorremediação. A maior densidade populacional para este tratamento (B) ocorreu na última amostragem (28^o dia) ($p < 0,05$). Os tratamentos de bioaugmentação (BE e BN) apresentaram um aumento populacional inicial e a densidade manteve-se maior ($p < 0,05$) que encontrada originalmente para este solo. No microcosmo em atenuação natural, houve uma redução populacional no 8^o dia e, posteriormente, a concentração de degradadores manteve-se maior que a concentração inicial, sendo semelhante aos valores observados para os tratamentos de bioaugmentação no 28^o dia. Esse perfil apresentado pelo microcosmo em atenuação natural é interessante, pois em um cenário de contaminação recente proveniente de derramamento de óleo, a população nativa, mesmo não tendo sido exposta previamente a contaminação, sugere capacidade de adaptação e sobrevivência, conforme discutido por Colla, (2012).

No microcosmos sob a estratégia de bioaugmentação com exógenos (BE), foi observada a maior densidade populacional na maioria dos tempos amostrados, quando comparado aos demais microcosmos. Para esse

tratamento, a população de degradadores aumentou nos primeiros 3 dias, com uma pequena redução no 8º dia e, no 15º dia, apresentou novo aumento populacional, mantendo-se até o final do experimento. A manutenção da densidade populacional de alóctones pode ter ocorrido devido à introdução de bactérias com potencial de degradação do contaminante, previamente testado por Colla (2012). Para a estratégia de bioaugmentação com nativos (BN), a população de degradadores apresentou acréscimo nos primeiros 15 dias, com uma pequena redução na densidade ao final de 28 dias. Desta forma, provavelmente a microbiota proveniente dos consórcios introduzidos, aumentou em aproximadamente 100 x o número de células e manteve-se ao final de 28 dias em níveis superiores ao observado no tempo inicial ($p < 0,05$).

A adição de nutrientes ao solo, nos tratamentos B, BE e BN, mostrou efeito positivo para o crescimento da população heterotrófica. No tratamento B, pode ser avaliado o efeito da adição de nutrientes para microbiota nativa na degradação da mistura. Para a população de degradadores, nos primeiros 15 dias, BE e BN destacaram-se em relação a B. Somente no 28º dia, os microcosmos do tratamento B apresentaram densidade populacional superior aos tratamentos de bioaugmentação ($p < 0,01$). Desta forma, considera-se que a incorporação de nutrientes aliado a introdução de micro-organismos pode ser uma alternativa promissora para o processo de biorremediação, pois tanto a microbiota nativa quanto exógena é beneficiada pela regulação de alguns fatores do meio (El Fantroussi e Agathos, 2005; Colla, 2012).

Ao analisar a proporção de degradadores e heterotróficos (DG/HT), pode-se observar que o solo originalmente apresentava uma proporção de 46% de degradadores em relação aos heterotróficos e, no controle, aumentou a proporção nos primeiros dias, mantendo-se até o final do ensaio. Espera-se que a proporção de degradadores seja maior para os tratamentos de bioaugmentação, mas isto só foi observado apenas no 15º dia de tratamento. Conforme observado na Figura 12, no dia 3, o NMP de micro-organismos heterotróficos e degradadores no controle foi semelhante (em torno de 10^6), indicando que aproximadamente 90% da microbiota heterotrófica corresponde a microbiota capaz de degradar a mistura B10 em condições adequadas de umidade e pH. Desta forma, a população nativa, demonstrada pelo controle, permaneceu em uma proporção de 80 % (DH/HT) ao longo de todo período de ensaio. Conforme também demonstrado no estudo de Bento et al.(2005), a proporção de degradadores/heterotróficos indica que existem mais micro-organismos heterotróficos do que degradadores no solo sob as condições testadas.

A proporção DG/HT nos microcosmos em que não houve adição de micro-organismos mantiveram uma média em torno de 75 %. Para os microcosmos com bioaugmentação, a proporção de degradadores teve uma redução ao longo do tempo, atingindo a proporção inicial do solo. Porém, entre o 15º e o 28º dia, a população heterotrófica de ambos microcosmos em bioaugmentação apresentaram incremento, o que não foi observado para população de degradadores, justificando a baixa proporção para esses tratamentos. Considerando-se o valor de NMP, a população degradadora ao

final de 28 dias estava maior que a originalmente observada para o solo, mesmo com a baixa proporção DG/HT, sugerindo que a mistura B10 adicionada nos microcosmos estimulou a microiota degradadora.

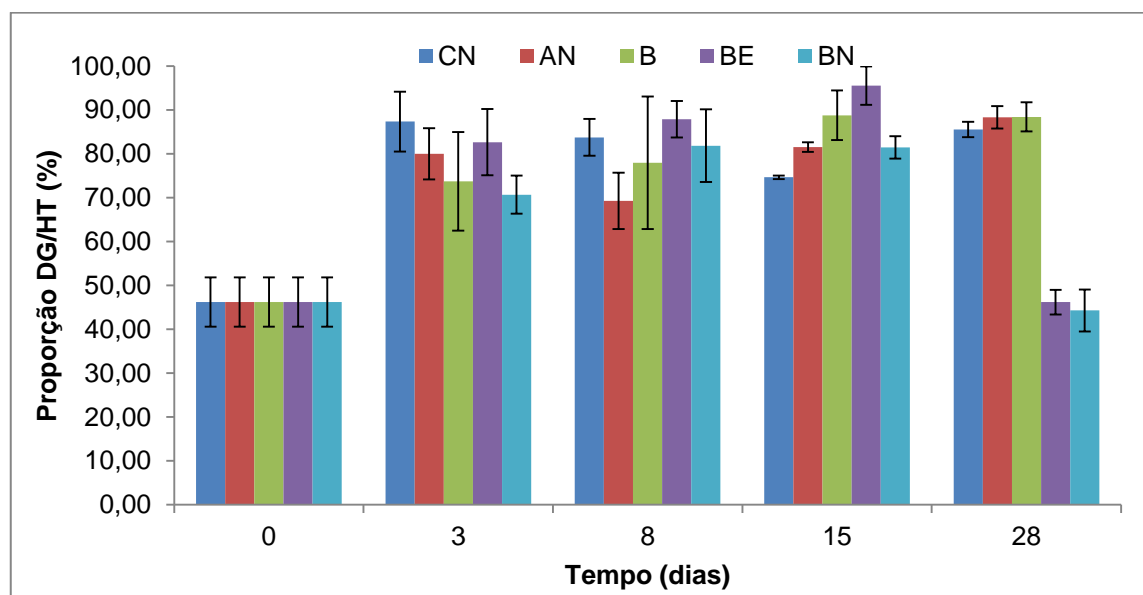


Figura 12: Proporção entre as populações microbianas de degradadores (DG) e heterotróficos (HT) estimadas pela contagem do Número Mais Provável durante 28 dias de ensaio de biorremediação de solo contaminado com B10. CN - Controle; AN - Atenuação natural; BN – Bioaumentação com consórcio de bactérias nativas; BE- Bioaumentação com consórcio de bactérias exógena.

4.4.1.1 Respirometria e cromatografia

A atividade microbiana, bem como a mineralização do contaminante foi avaliada pela quantificação do gás carbônico liberado no processo, demonstrado na Figura 13 ao longo de 28 dias.

Ao analisar a produção cumulativa de C-CO₂ ao longo de 28 dias, foi possível observar que para todos microcosmos com adição de combustível, houve maior taxa respiratória quando comparado ao controle sem a mistura

B10 ($p < 0,01$). Os valores de C-CO₂ observados nos microcosmos das estratégias de bioaugmentação e bioestimulação foram superiores à estratégia de atenuação natural e esta superior ao controle ($p < 0,01$) a partir do 5º dia de ensaio. Entre as estratégias de bioaugmentação e bioestimulação não houve diferença na liberação de C-CO₂ em todos os períodos amostrados, indicando que a adição de nutrientes foi eficiente para estimular a microbiota nativa ao ponto de atingir níveis similares de liberação de C-CO₂ aos observados com adição de inóculo (bioaugmentação).

A produção de C-CO₂ quando comparados os microcosmos com e sem a mistura B10 sugere que a microbiota foi capaz de utilizar os hidrocarbonetos e ésteres em seu crescimento. A introdução de microbiota nativa e exógena, bem como a adição de nutrientes, podem ser as estratégias que apresentaram taxa respiratória superior a atenuação natural.

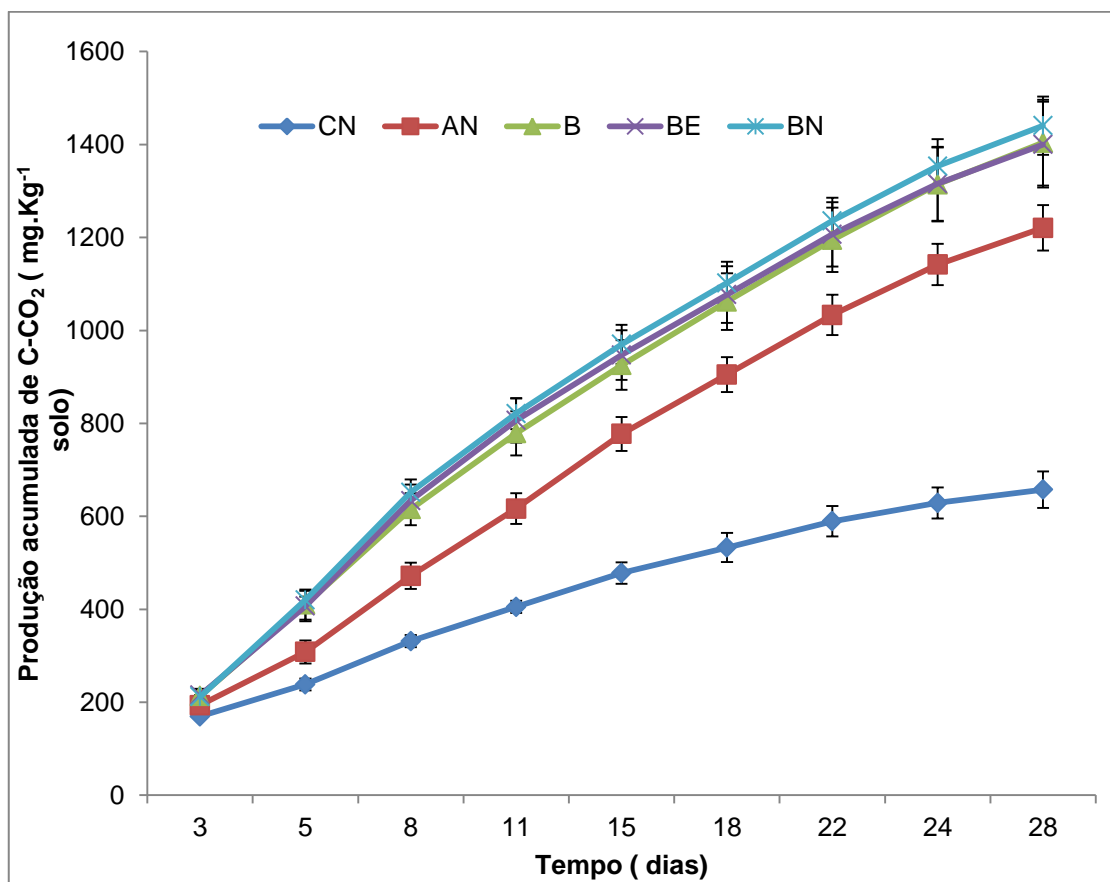


Figura 13: Produção cumulativa de C-CO₂ do solo contaminado por B10 durante o ensaio de biorremediação por 28 dias. CN - Controle; AN - Atenuação natural; BN – Bioaugmentação com consórcio de bactérias nativas; BE- Bioaugmentação com consórcio de bactérias exógenas.

Os maiores valores de C-CO₂ ocorreram nos primeiros 8 dias de ensaio, atingindo a máxima liberação do gás carbônico nos tratamentos de Bioaugmentação (em torno de 230 mg). Conforme demonstrado, o crescimento microbiano teve um acréscimo de aproximadamente 2 log NMP nos primeiros 3 dias de ensaio e para todos os demais tratamentos decresceu a partir do 8º dia. É importante considerar que o ensaio de biorremediação foi realizado a temperatura ambiente e esta não foi constante ao longo do tempo de ensaio. Até o 5º dia, a temperatura atingiu 40°C, diminuindo para 30°C até o 15º dia e, posteriormente, a temperatura máxima manteve-se em 25°C. A variação de temperatura pode ter limitado o desenvolvimento mais acentuado da microbiota

em todos os tratamentos. Contudo, a liberação de C-CO₂ nas estratégias de biorremediação superiores ao controle negativo sugere que as populações foram capazes de se manter e metabolizar o B10, mesmo estando menos ativas quando comparadas ao ensaio preliminar de biorremediação.

Um comportamento semelhante da comunidade microbiana foi observado por Cerqueira (2011), estudando a biorremediação de borra oleosa em solo, com a máxima produção de C-CO₂ em 10 dias de processo e substancial diminuição nas medições posteriores. Por outro lado, Silva *et al.* (2012), em estudo com biorremediação de solo contaminado com B20, verificaram taxas de liberação de C-CO₂ variando em torno de 30 mg.kg solo⁻¹, com máxima produção ao 25º dia de ensaio. Com isso, pode-se inferir que não só não o tipo de contaminante, mas outros fatores, como o metabolismo microbiano e o perfil físico-químico do solo podem ter determinado o comportamento observado no presente trabalho.

Ao comparar o ensaio preliminar de biorremediação com o presente experimento, podem-se fazer algumas considerações. Primeiramente, verifica-se que produção acumulada em torno de 1600 mg.kg⁻¹ de solo após 30 dias do primeiro ensaio (item 4.1.1) foi praticamente semelhante da taxa encontrada no presente ensaio (1500 mg.kg⁻¹). Esperava-se que com a adição de uma maior concentração da mistura e a possibilidade de utilização do combustível como fonte de carbono e energia, houvesse consequentemente um aumento na produção geral de C-CO₂ devido ao aporte de carbono para crescimento da biomassa. Isso seria evidenciado também com a estimativa de NMP. No entanto, os dados observados para o NMP do presente ensaio coincidem com

essa menor taxa produtiva comparada ao ensaio preliminar, uma vez que, com exceção dos tratamentos de bioaumentação em 15 dias, a atividade microbiana não teve um aumento pronunciado após os primeiros dias de incubação. Neste sentido, sugere-se que a temperatura pode ter sido um dos fatores determinantes para essa diferença.

A diferença na temperatura entre os dois experimentos foi de aproximadamente 10°C considerando todo tempo de tratamento. Apesar da biodegradação de hidrocarbonetos ocorrer em uma ampla faixa de temperatura (0-70°C) (Sorkhoh *et al.*, 1993), as taxas de degradação geralmente diminuem com a redução da temperatura (Dzida e Prusakiewicz, 2008). Desta forma, a redução na T °C pode ter levado a diminuição na atividade microbiana de uma forma geral possivelmente por dois motivos: redução do metabolismo microbiano e atividade catalítica (já que a taxa metabólica é diretamente proporcional ao aumento da temperatura) (Atlas, 1981; Leahy e Colwell, 1990; Meyer, 2011) e diminuição da biodisponibilidade do contaminante. A redução da temperatura aumenta a viscosidade do óleo que passa a ser menos solúvel em água e também pode levar ao acúmulo de compostos voláteis tóxicos, conseqüentemente reduzindo a biodegradação do contaminante (Atlas, 1981; Das e Chandran, 2011).

A biodegradação da mistura B10 utilizada nos microcosmos foi avaliada pela quantificação dos HTPs por cromatografia gasosa no tempo inicial e final do experimento de biorremediação. Os resultados de degradação das porções presentes no óleo diesel mostraram que para todos os

tratamentos a fração com maior degradação foi na faixa entre C₂₀-C₄₀ (DRO), conforme observado na Tabela 9.

Tabela 9 Percentual de degradação das diferentes frações de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) nas diferentes estratégias de biorremediação após 28 dias.

	(C ₈ -C ₁₁) Gasolina	(C ₁₁ -C ₁₄) Querosene	(C ₁₄ -C ₂₀) Diesel	(C ₂₀ -C ₄₀) Óleo Lubrificante	Total
AN	35,3 ± 7,76	10,6 ± 11,05	6,0 ± 6,62	42,6 ± 3,72	18,9 ± 6,83
B	27,3 ± 9,79	3,7 ± 10,63	3,2 ± 8,33	43,8 ± 5,18	15,7 ± 8,47
BE	33,1 ± 7,93	1,3 ± 13,33	0,9 ± 9,20	42,2 ± 4,85	14,2 ± 8,93
BN	36,6 ± 13,29	16,2 ± 7,96	13,1 ± 9,10	47,8 ± 3,50	24,6 ± 7,76

AN - Atenuação natural; B – Bioestimulação; BN – Bioaugmentação com consórcio de bactérias nativas; BE – Bioaugmentação com consórcio de bactérias exógenas.

Na estratégia de atenuação natural, os resultados de HTP mostraram uma redução semelhante à encontrada no ensaio preliminar de biorremediação – 19 %. A concentração de HTP no presente experimento (36 g.Kg⁻¹ de solo) foi maior comparada ao primeiro ensaio (20 g.Kg⁻¹ solo), indicando que a microbiota residente foi capaz de sobreviver e utilizar a fração de hidrocarbonetos presentes no solo, mesmo aumentando-se a concentração a que a microbiota foi submetida.

Os microcosmos com adição de nutrientes e inóculo tiveram comportamento diferente em relação à degradação. Enquanto para Bioestimulação (B) e Bioaugmentação com exógenos (BE), não houve uma pronunciada redução na concentração dos hidrocarbonetos totais (15,7 e 14,2%, respectivamente), a estratégia BN destacou-se para todas as frações avaliadas.

Os resultados de biodegradação das frações dos hidrocarbonetos evidenciam que a fração com maior degradação foi na faixa entre C₂₀-C₄₀.

Alguns autores sugerem que a fração C₈-C₁₁ é mais facilmente degradada (Van Hamme, Singh e Ward, 2003; Bento *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2007; Hasinger *et al.*, 2012) o que concorda com o observado no presente trabalho em que todos os microcosmos apresentaram percentual de degradação em torno de 30 %. A faixa C₁₁-C₂₀ de hidrocarbonetos foi a que apresentou menor percentual de degradação quando comparada às demais, e a maior degradação foi observada para fração mais pesada (C₂₀-C₄₀) para todos os microcosmos. O microcosmo que apresentou maior redução da fração pesada foi BN (49,7 %) ($p < 0,05$), embora sem diferença do tratamento com exógenos (BE) ($p > 0,05$). No estudo de Tramontini (2013) utilizando o mesmo solo e contaminante do presente estudo e com maior concentração de HTP (50 g .Kg⁻¹de solo), foi observado comportamento semelhante em relação a degradação das diferentes faixas de hidrocarbonetos, com menor redução do contaminante nas faixas intermediárias, porém apresentando maior degradação da fração mais lábil quando comparada ao 36,6% encontrado no presente estudo. No estudo de Bento *et al.*, (2005) foi observada degradação em torno de 70 % da fração C₂₀-C₄₀ para bioaugmentação com consórcio nativo somente após 110 dias de tratamento. A utilização da fração mais pesada dos hidrocarbonetos com maior percentual de degradação para todos os microcosmos e semelhante ao encontrado por Tramontini (2013) e Bento (2005) demonstra que tanto a microbiota nativa quanto a microbiota exógena tem potencial para utilização desta fração.

Na concentração de HTP total, a bioaugmentação com consórcio nativo apresentou maior percentual (24,6 %) de degradação, sem, no entanto,

se diferenciar dos demais tratamentos. Esse percentual de degradação foi semelhante aos resultados observados por Colla (2012) em seu ensaio de biorremediação com menor nível de contaminação de B10 (30 g Kg⁻¹ de solo) e condições de temperatura controlada (28°C).

É importante ressaltar que mesmo nas condições de temperatura reduzida que podem ter diminuído o metabolismo microbiano para todos microcosmos, ainda houve uma degradação em espaço de tempo menor, comparado aos trabalhos da literatura. Silva *et al.* (2012) analisaram a biodegradabilidade de B5, B20 e B50 em solo contaminado em 60 dias de incubação e observaram taxas de degradação de 51 %, 80 % e 62 %, respectivamente. Li *et al.* (2007) avaliaram a biodegradação de óleo diesel em concentração crescente do combustível durante 110 dias e verificaram que as duas maiores concentrações (30 e 50 g.Kg⁻¹ de solo) testadas resultaram em menores taxas de remoção do HTP nos sistemas, atingindo 49,5 % e 36,8 %, respectivamente. Owsianiak *et al.* (2009) em ensaio com consórcio de bactérias e misturas diesel/biodiesel em meio líquido, relata a redução de aproximadamente 10 % na degradação da fração do diesel quando a mistura B10 foi utilizada. Desta forma, além do tempo de tratamento, a concentração do contaminante e o tipo de mistura diesel/biodiesel podem também ter influenciado nos valores de degradação encontrados neste trabalho.

Dentre as estratégias de bioaugmentação, foi observado diferença na capacidade degradativa dos nativos quando comparados aos microorganismos exógenos. O microcosmo com consórcio exógeno apresentou

menor percentual de degradação que o microcosmo em atenuação natural. No estudo de Bento *et al.* (2005), comparando a adição de consórcio degradador nativo com exógeno, verificou a maior degradação quando o consórcio foi inoculado no solo de origem, comportamento semelhante ao encontrado no presente trabalho. Alguns autores sugerem que a introdução dos inóculos logo após a contaminação pode gerar um impacto negativo sobre as taxas de degradação (El Fantroussi e Agathos, 2005; Xu e Lu, 2010; Colla, 2012). Desta forma, a introdução de células microbianas em uma comunidade em equilíbrio também poderia ocasionar distúrbios na microbiota residente, e conseqüentemente, reduzir a degradação do contaminante até o restabelecimento da população original. Por isso, talvez a microbiota exógena necessite de um maior tempo de tratamento para ser observada degradação semelhante à microbiota nativa (Colla, 2012).

Ao fazer um comparativo geral da degradação dos ensaios com adição de nutrientes (B, BE e BN) com o ensaio de atenuação natural (AN), pode-se sugerir o efeito dos nutrientes na degradação dos hidrocarbonetos pela microbiota adicionada, nativa ou exógena. Verifica-se que a adição de nutrientes não teve influência da degradação da microbiota nativa, uma vez que a atenuação natural apresentou maior degradação em todas as frações quando comparada a bioestimulação. Diferente do que é observado no presente trabalho, a bioestimulação tem se mostrado eficiente em diversos estudos, no entanto, geralmente esse resultado está associado à biorremediação de solos com histórico de contaminação, que apresentam uma biota adaptada à presença do poluente (Ruberto *et al.*, 2009; Kauppi,

Sinkkonen e Romantschuk, 2011). Assim, a microbiota nativa, previamente demonstrada pelo ensaio preliminar (item 4.1), foi capaz de expressar seu potencial degradador com ajuste do pH e umidade, mesmo que a concentração do contaminante tenha aumentado. Ainda, a degradação observada no microcosmo com bioaugmentação (BN) foi maior comparada aos demais nas frações mais pesadas, indicando que a adição da microbiota nativa potencializou a degradação destas frações mais recalcitrantes.

Neste contexto, o tratamento com bioaugmentação com consórcio nativo foi eficiente na degradação das frações do contaminante comparado aos demais tratamentos. A complexidade de compostos existentes no combustível exige a presença de uma microbiota com diferentes capacidades catalíticas que atuem sinergicamente de modo que possam utilizar as moléculas descontaminando determinado ambiente impactado (Megharaj *et al.*, 2011). Sugere-se que a combinação de micro-organismos utilizada apresenta um perfil metabólico diversificado capaz de degradar os diferentes constituintes do diesel. É importante salientar que a microbiota seja capaz de tolerar e metabolizar compostos mais recalcitrantes como hidrocarbonetos de cadeia longa, evitando o seu acúmulo no ambiente. Contudo, considerando o debate que a literatura apresenta em relação ao uso da bioaugmentação, o emprego desta estratégia deve ser melhor investigado. A abordagem que utiliza a microbiota indígena de determinado local impactado para posterior introdução no mesmo ambiente pode otimizar o processo de descontaminação. Considerando que a presença de comunidades microbianas potencialmente degradadoras seja ubíqua, o aumento populacional através da bioaugmentação

pode ser uma forma de acelerar a remediação. No entanto, mesmo com a realização de testes preliminares expondo a microbiota indígena prospectada a concentrações elevadas do combustível, não há garantia de que no solo, a microbiota selecionada expressará o potencial degradador com a mesma eficiência (Devinny e Chang, 2000).

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível isolar bactérias do gênero *Bacillus* utilizando a metodologia de aquecimento de solo artificialmente contaminado com a mistura B10.

A partir de nova prospecção do solo artificialmente contaminado, foi possível isolar bactérias degradadoras da mistura B10 através da técnica de enriquecimento com 1 % da mistura. Após serem submetidas à pressão seletiva, 5 isolados bacterianos mostraram-se potencialmente degradadores de 25 % da mistura em meio mineral com capacidade para crescer utilizando o combustível como única fonte de carbono.

Das 11 combinações testadas, 7 apresentaram potencial degradador sob concentrações crescentes da mistura (30, 45, 60 %) e ainda para o diesel e biodiesel separadamente como única fonte de carbono.

As percentagens de remoção de HTP do solo após 28 dias de não tiveram diferenças significativas entre os tratamentos de biorremediação.

6. PERSPECTIVAS

Traçar um perfil das comunidades microbianas e a dinâmica populacional ao longo do experimento de Biorremediação a partir da técnica de pirosequenciamento caracterizando a abundância, a composição e a interação entre as espécies durante os tratamentos de biorremediação.

Realizar a identificação molecular dos demais micro-organismos utilizados para compor os consórcios testados.

Identificar a presença de genes catabólicos envolvidos na degradação de compostos aromáticos e de alcanos de cadeia longa nos micro-organismos selecionados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, S.; CHHIBBER, V.; BHATNAGAR, A. Tribological behavior of diesel fuels and the effect of anti-wear additives. **Fuel**, Índia, v. 106, p. 21-29, 2013.

AJAYI, A.; BALOGUN, S.; ADEGBEHINGBE, K. Microorganisms in the crude oil-producing areas of Ondo State, Nigeria. **Scientific Research and Essays**, Nigéria, v. 3, n. 5, p. 174-179, 2008.

ALEER, S.; ADETUTU, E.M.; MAKADIA, T.H.; PATIL, S.; BALL, A.S. Harnessing the Hydrocarbon-Degrading Potential of Contaminated Soils for the Bioremediation of Waste Engine Oil. **Water Air and Soil Pollution**, Holanda, v. 218, n. 1-4, p. 121-130, 2011.

ALEXANDER, M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. **Environmental Science & Technology**, EUA, v. 34, n. 20, p. 4259-4265, 2000

ALISI, C.; MUSELLA, R.; TASSO, F.; UBALDI, C.; MANZO, S.; CREMISINI, C.; SPROCATI, A.R. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. **Science of the Total Environment**, Itália, v. 407, n. 8, p. 3024-3032, 2009.

ALUYOR, E.; OBAHIAGBON, K.; ORI-JESU, M. Biodegradation of vegetable oils: A review. **Scientific Research and Essays**, Nigéria, v. 4, n. 6, p. 543-548, 2009.

AMOURIC, A.; QUEMENEUR, M.; GROSSI, V.; LIEBGOTT, P.P.; AURIA, R.; CASALOT, L. Identification of different alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus ruber* strain SP2B, an hexane-degrading actinomycete. **Journal of Applied Microbiology**, França, v. 108, n. 6, p. 1903-1916, 2010.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. Washington 1995.

ARULAZHAGAN, P.; VASUDEVAN, N. Role of a moderately halophilic bacterial consortium in the biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **Marine Pollution Bulletin**, Índia, v. 58, n. 2, p. 256-262, 2009.

_____. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1. **Marine Pollution Bulletin**, Coreia do Sul, v. 62, n. 2, p. 388-394, 2011.

ASPRAV, T.; GLUSZEK, A.; CARVALHO, D. Effect of nitrogen amendment on respiration and respiratory quotient (RQ) in three hydrocarbon contaminated soils of different type. **Chemosphere**, Escócia, v. 72, n. 6, p. 947-951, 2008

ATADASHI, I.; AROUA, M.; AZIZ, A. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Malásia, v. 14, n. 7, p. 1999-2008, 2010.

ATLAS, R.; BARTHA, R. Degradation and mineralization of petroleum in sea water: Limitation by nitrogen and phosphorous. **Biotechnology and Bioengineering**, EUA, 14: 309-318 p. 1972.

ATLAS, R. M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. **Microbiological Reviews**, EUA, v. 45, n. 1, p. 180-209, 1981.

ATLAS, R. M.; HAZEN, T. C. Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History: **Environmental Science & Technology**, EUA, v.45, p 6709–6715, 2011.

BACOSA, H.; SUTO, K.; INOUE, C. Preferential Degradation Of Aromatic Hydrocarbons In Kerosene By A Microbial Consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Japão, v. 64, n. 8, p. 702-710, 2010.

BALAT, M. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production - A review of current work. **Energy Conversion and Management**, Turquia, v. 52, n. 2, p. 1479-1492, 2011.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology**, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.

BAR, C.; PATIL, R.; DOSHI, J.; KULKARNI, M.J.; GADE, W.N. Characterization of the proteins of bacterial strain isolated from contaminated site involved in heavy metal resistance - A proteomic approach. **Journal of Biotechnology**, Índia, v. 128, n. 3, p. 444-451, FEB 20 2007 2007. ISSN 0168-1656.

BARRETO, R. V. G. **Prospecção de Micro-organismos e Genes envolvidos com a produção de Biosurfactantes em Solo de Manguezal**. 2011. 148f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza Ceará ,2011

BEHAR, A.; YUVAL, B.; JURKEVITCH, E. Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. **Molecular Ecology**, Israel, v. 14, n. 9, p. 2637-2643, 2005.

BEKER, S. A. **Avaliação da mistura B7 em meio líquido por bactérias isoladas de locais impactados**. 2011. 79f. Trabalho de Conclusão (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) Unidade Bento Gonçalves, Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2011.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JUNIOR, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, Brasil, v. 96, n. 9, p. 1049-1055, 2005.

BENTO, F. M.; ENGLERT, G. E.; GAYLARDE, C. C.; MULLER, I. L. Influence of aqueous phase on electrochemical biocorrosion tests in diesel/water systems. **Materials and Corrosion**, Brasil, v. 55, n. 8, p. 577-585, 2004.

BENTO, F.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JUNIOR, W.T. Bioremediation approaches for soil contaminated with diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, 34, suppl. 1, 2003.

BERTHE-CORTI, L.; FETZNER, S. Bacterial metabolism of n-alkanes and ammonia under oxic, suboxic and anoxic conditions. **Acta Biotechnologica**, Alemanha, v. 22, n. 3-4, p. 299-336, 2002

BISSANI, C.A.; GIANELLO, C.; CAMARGO, F.A.O.; TEDESCO, M.J. **Fertilidade dos Solos e Manejo da Adubação de Culturas**, 2ª Ed. Porto Alegre: Gênese, 344p., 2008.

BOCZAR, B. FORNEY, L. J.; BEGLEY, W. M.; LARSON, R. J.; FEDERLE, T. W. Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge. **Water Research**, EUA, v. 35, n. 17, p. 4208-4216, 2001.

BOOPATHY, R.; MELANCON, E. Metabolism of compounds with nitro-functions by *Klebsiella pneumoniae* isolated from a regional wetland. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Japão, v. 54, n. 4, p. 269-275, 2004.

BOSSERT, I.; BARTHA, R. The fate of petroleum in soil ecosystems In: ATLAS, R. M. (Ed.). **Petroleum microbiology** New York Macmillan Publishing Co., 1984. p.434 - 476.

BOUWER, E.; ZEHNDER, A. Bioremediation Of Organic-Compounds - Putting Microbial-Metabolism To Work. **Trends in Biotechnology**, EUA, v. 11, n. 8, p. 360-367, 1993.

BRADDOCK, J. F.; CATTERAL, P. H. A simple method of enumerating gasoline- and diesel-degrading microorganisms. : **Bioremediation Journal**, EUA, v 3, n. 2: p 81-84, 1999.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, EUA, v. 72, n. 1 - 2, p. 248-254, 1976

BRANCO, R.; ALPOIM, M.; MORAIS, P. *Ochrobactrum tritici* strain 5bv11 - characterization of a Cr(VI)-resistant and Cr(VI)-reducing strain. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadá, v. 50, n. 9, p. 697-703, 2004.

BRITO, G.C.B.; SOUZA, D.B.; VASCONCELOS, F.C.W.; BRAGA, L.C. A Importância Da Bioprospecção de Microrganismos em Áreas Contaminadas Com Produtos Derivados Do Petróleo.: **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Brasil, .v. 3: p. 291-310, 2010.

BÜCKER, F. **Biodeterioração de Misturas de Diesel e Biodiesel e seu Controle com Biocidas** . 2009. 147f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiental) . Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, 2009.

BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N. A.; ROESCH, L. F.; JACQUES, R. J. S.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Brasil,v. 65, n. 1, p. 172-178, 2011..

BUSHNELL, C. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. . **Journal of Bacteriology**, EUA, v. 41, p. 654 - 674, 1941.

CALVO, C.; SILVA-CASTRO, G.A.; UAD, I.; FANDINO, C.G.; LAGUNA, J.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Espanha, v. 35, n. 11, p. 1493-1501, 2008.

CAVALCANTI, E. H. S. Estabilidade do Biodiesel e Misturas - Abrangência, Limitações dos Métodos de Avaliação e Alternativas Futuras. Paraná: **Revista Biodiesel**. v. 3: p. 71-73, 2009.

CERQUEIRA, V.S.; HOLLENBACH, E.B.; MABONI, F.; CAMARGO, F.A.O.; PERALBA, M.D.R.; BENTO, F.M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Brasil, v. 28, n. 3, p. 1203-1222, 2012..

CERQUEIRA, V.S.; HOLLOENBACH, E.B.; MABONI, F.; VAINSTEIN, M.H.; CAMARGO, F.A.O.; PERALBA, M.C.R.; BENTO, F.M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology**, Brasil, v. 102, n. 23, p. 11003-11010, 2011.

CERQUEIRA, V. S. **Biorremediação de borra oleosa proveniente de indústria petroquímica**. 2011. 196f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, 2011.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>. Acesso em junho de 2013.

CHAGAS-SPINELLI, A.C.O.; KATO, M.T.; LIMA, E.S.; GAVAZZA, S. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. **Journal of Environmental Management**, Brasil, v. 113, p. 510-516, 2012.

CHAO, Y.; LIU, N.; ZHANG, T.; CHEN, S. Isolation and characterization of bacteria from engine sludge generated from biodiesel-diesel blends. **Fuel**, China, v. 89, n. 11, p. 3358-3364, 2010.

CHEN, C.Y.; CHEN, S.C.; FINGAS, M.; KAO, C.M. Biodegradation of propionitrile by *Klebsiella oxytoca* immobilized in alginate and cellulose triacetate gel. **Journal of Hazardous Materials**, Taiwan, v. 177, n. 1-3, p. 856-863, 2010.

CHHIBBER, V. K.; JOSHI, H. C.; SAXENA, S. K. Sal (*Shorea Robusta*), an Environment friendly and Ecofriendly Alternative Vegetable Oil Fuel in Comparison to the Diesel Oil: **Advances in Pure and Applied Chemistry**, v.1:p. 36-39,2012.

CHRZANOWSKI, L.; LAWNICZAK, L.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Holanda, v. 28, n. 2, p. 401-419, 2012.

CIRIC, L.; PHILP, J.; WHITELEY, A. Hydrocarbon utilization within a diesel-degrading bacterial consortium. **Fems Microbiology Letters**, Inglaterra, v. 303, n. 2, p. 116-122, 2010.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Bélgica, v. 5, n. 9, p. 719-729, 2003.

COLLA, T. S. **Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura B10 por consórcio bacteriano**. 2012, 138f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde., Porto Alegre, 2012.

COOKSON, W. R.; ABAYEB, D. A.; MARSCHNER, P.; MURPHY, D. V.; STOCKDALEB, E. A.; GOULDING, K. W. T. The contribution of soil organic matter fractions to carbon and nitrogen mineralization and microbial community size and structure. **Soil Biology & Biochemistry**, Austrália, v. 37, n. 9, p. 1726-1737, 2005.

COUTINHO, R. C. P.; GOMES, C. C. Técnicas para biorremediação de aquíferos contaminados por vazamentos de derivados de petróleo em postos de combustíveis. **XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos**. São Paulo, SP, Brasil, 2006.

CUNHA, C. D.; LEITE, S.; G.; ROSADO, A. S.; ROSÁRIO, M. Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente. Rio de Janeiro: **Série Tecnologia Ambiental CETEM/MCT**: 45 p. 2008.

CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F. Gasoline biodegradation in different petroleum microcosms, **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 31, p. 45-49, 2000.

CYPLIK, P.; SCHMIDT, M.; SZULC, A.; MARECIK, R.; LISIECKI, P.; HEIPIEPER, H.J.; OWSIANIAK, M.; VAINSHTEIN, M.; CHRZANOWSKI, L. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 102, n. 6, p. 4347-4352, 2011.

DAMASCENO, S.S.; SANTOS, N.A.; SANTOS, I.M.G.; SOUZA, A.L.; SOUZA, A.G.; QUEIROZ, N. Caffeic and ferulic acids: An investigation of the effect of antioxidants on the stability of soybean biodiesel during storage. **Fuel**, Brasil, v. 107, p. 641-646, 2013.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnology Research International**, Índia, v. 2011, p. 1-13, 2011.

DAWARE, V.; KESAVAN, S.; PATIL, R.; NATU, A.; KUMAR, A.; KULKARNI, M.; GADE, W. Effects of arsenite stress on growth and proteome of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Biotechnology**, Índia, v. 158, n. 1-2, p. 8-16, 2012.

De CARVALHO, C.; WICK, L.; HEIPIEPER, H. Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Portugal, v. 82, n. 2, p. 311-320, 2009.

De LORENZO, V. Systems biology approaches to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, Espanha, v. 19, n. 6, p. 579-589, 2008.

DE MELLO, J. CARMICHAEL, C.A.; PEACOCK, E.E.; NELSON, R.K.; AREY, J.S.; REDDY, C.M. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. **Marine Pollution Bulletin**, EUA, v. 54, n. 7, p. 894-904, 2007.

DEMIRBAS, A. Biodegradability of Biodiesel and Petrodiesel Fuels. **Energy Sources Part a-Recovery Utilization and Environmental Effects**, Turquia, v. 31, n. 2, p. 169-174, 2009a.

_____. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, Turquia, v. 50, n. 1, p. 14-34, 2009b.

DEVINNY, J.; CHANG, S. H. Bioaugmentation for soil bioremediation. In: WISE, D. L. e TRANTOLO, D. J. (Ed.). **Bioremediation of Contaminated Soils**. EUA, p.465-488, 2000

DIREITO, I. C. N. **Detecção de gene degradadores de compostos aromáticos em solos de rizosfera sob manejo convencional e orgânico**, 2005, 121f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal). Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

DOMINGOS, A.K.; SAAD, E.B.; VECHIATTO, W.W.D.; WILHELM, H.M.; RAMOS, L.P.. The influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (biodiesel). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 18, n. 2, p. 416-423, 2007

DZIDA, M.; PRUSAKIEWIEZ, P. The effect of temperature and pressure on the physicochemical properties of petroleum diesel oil and biodiesel fuel. **Fuel**, Polônia, v. 87, n. 10-11, p. 1941-1948, 2008.

EL FANTROUSSI, S.; AGATHOS, S. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? **Current Opinion in Microbiology**, Bélgica, v. 8, n. 3, p. 268-275, 2005.

ELAZHARI-ALI, A. Singh, A.K.; Davenport, R.J.; Head, I.M.; Werner, D. Biofuel components change the ecology of bacterial volatile petroleum hydrocarbon degradation in aerobic sandy soil. **Environmental Pollution**, Inglaterra, v. 173, p. 125-132, 2013.

EPA. US Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/>. Acesso em: junho de 2013l.

ERMAKOVA, I.T.; KISELEVA, N.I.; SHUSHKOVA, T.; ZHARIKOV, M.; ZHARIKOV, G.A.; LEONTIEVSKY, A.A. Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Rússia, v. 88, n. 2, p. 585-594, 2010.

FARINA, R. Beneduzi, A.; Ambrosini, A. de Camposa, S.B.; Lisboa, B.B.; Wendisch, V.; Vargas, L.K.; Passaglia, L.M.P. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v. 55, p. 44-52, 2012.

FERHAT, S.; MNIF, S.; BADIS, A.; EDDOUAOUDA, K.; ALOUAOUI, R.; BOUCHERIT, A.; MHIRI, N.; MOULAI-MOSTEFA, N.; SAYADI, S. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp 1C and *Brevibacterium* sp 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Argélia, v. 65, n. 8, p. 1182-1188, 2011.

FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, P.; VILA, J.; GARRIDO, J.M.; GRIFOLL, M.; FEIJOO, G.; LEMA, J.M. Evaluation of biodiesel as bioremediation agent for the treatment of the shore affected by the heavy oil spill of the Prestige. **Journal of Hazardous Materials**, Espanha, v. 147, n. 3, p. 914-922, 2007.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja: taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**. Brasil, v.28, p. 19-23, 2005.

FERRÉS, J. D.; KLEIN, O. História do biodiesel. Biodiesel em foco: UBRABIO. 1 2009.

FRANCO, I.; CONTIN, M.; BRAGATO, G.; DE NOBILI, M. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. **Geoderma**, Itália, v. 121, n. 1-2, p. 17-30, 2004.

FRANÇA, F. P.; VIEIRA, D. M.; CAVALCANTI, E. H. D. S. Biodegradation of soy biodiesel by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pichia guilliermondii*. **Canadian Journal of pure & applied sciences**, Brasil, v. 5, p. 1355-1361, 2011.

FRITSCH, W.; HOFRICHTER, M. Aerobic Degradation by Microorganisms In: REHM, H. J. R., G. (Ed.). **Biotechnology: Environmental Processes** II. 2. Germany: Biotechnology Techniques, v.11, 2008. p.145-167.

FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. **Nature Reviews**, Alemanha, v. 9, n. 11, p. 803-816, 2011.

FUNHOFF, E.; VAN BEILEN, J. Alkane activation by P450 oxygenases. **Biocatalysis and Biotransformation**, Suíça, v. 25, n. 2-4, p. 186-193, 2007

GALLEGO, J.L.; LOREDO, J.; LLAMAS, J.F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, Espanha, v. 12, n. 5, p. 325-335, 2001.

GARGOURI, B.; KARRAY, F.; MHIRI, N.; ALOUI, F.; SAYADI, S. Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents. **Journal of Hazardous Materials**, Tunisia, v. 189, n. 1-2, p. 427-434, 2011.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos de biorremediação de xenobióticos. : **Biociência e Desenvolvimento**, n.34, p. 36-43 , 2005.

GERIS, R.; SANTOS, N.A.C.; AMARAL, B.A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J.R.M. Biodiesel de soja – reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. Brasil. **Química Nova**, Brasil, v. 30, p. 1369-1373, 2007.

GHAZALI, F.M.; RAHMAN, R.N.Z.A.; SALLEH, A.B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Malásia, v. 54, n. 1, p. 61-67, 2004.

- GOLDEMBERG, J. Biomassa e Energia. **Química Nova**, Brasil, v. 32, p.582-587 2009.
- GONÇALO, A. C. **Estudo da eficiência de novos aditivos na gasolina através da cromatografia gasosa..** Monografia de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte Natal, 124f. 2004.
- HAMAMURA, N.; FUKUI, M.; WARD, D.M.; INSKEEP, W.P. Assessing Soil Microbial Populations Responding to Crude-Oil Amendment at Different Temperatures Using Phylogenetic, Functional Gene (alkB) and Physiological Analyses. **Environmental Science & Technology**, EUA, v. 42, n. 20, p. 7580-7586, 2008
- 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, p. 745-748, 1993.
- HASINGER, M.; SCHERR, K.E.; LUNDAA, T.; BRAUER, L.; ZACH, C.; LOIBNER, A.P. Changes in iso- and n-alkane distribution during biodegradation of crude oil under nitrate and sulphate reducing conditions. **Journal of Biotechnology**, Austria, v. 157, n. 4, p. 490-498, 2012.
- HOSOKAWA, R.; NAGAI, M.; MORIKAWA, M.; OKUYAMA, H. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Japão, v. 25, n. 9, p. 1519-1528, 2009.
- INIGUEZ, A.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, EUA, v. 17, n. 10, p. 1078-1085, 2004..
- JACQUES, R.J.S.; OKEKE, B.C.; BENTO, F.M.; PERALBA, M.C.R.; CAMARGO, F.A.O. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. **Bioresource Technology**, Brasil, v. 99, n. 7, p. 2637-2643, 2008.
- JACQUES, R.J.S.; SILVA, K.J.; BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, Brasil, v. 40: 310-317 p. 2010.
- JHA, P.; KUMAR, A. Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. **Journal of Applied Microbiology**, India, v. 103, n. 4, p. 1311-1320, 2007.
- JOO, H.S.N.; DEGWA, P.M.; SHODA, M.; PHAE, C.G. Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste. **Environmental Pollution**, Coreia do Sul, v. 156, n. 3, p. 891-896, 2008.
- JORGENSEN, K. S.; LASKIN, A.I.; SARIASLANI, S.; GADD, G.M. In situ bioremediation. **Advances in Applied Microbiology**, EUA, v. 61, p. 285-305, 2007
- KAO, C.M.; CHEN, C.S.; TSA, F.Y.; YANG, K.H.; CHIEN, C.C.; LIANG, S.H.; YANG, C.A.; CHEN, S.C. Application of real-time PCR, DGGE fingerprinting, and culture-based method to evaluate the effectiveness of intrinsic bioremediation on the control of petroleum-hydrocarbon plume. **Journal of Hazardous Materials**, Taiwan, v. 178, n. 1-3, p. 409-416, 2010.
- KAUPPI, S.; SINKKONEN, A.; ROMANTSCHUK, M. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Finlândia, v. 65, n. 2, p. 359-368, 2011.
- KEBRIA, D.; KHODADADI, A.G.; ANJIDOUST, H.; BADKOUBI, A.A.; MOOZEGAR, M.A. Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel.

International Journal of Environmental Science and Technology, Irã, v. 6, n. 3, p. 435-442, 2009.

KIM, S.; CHOI, D.H.; SIM, D.S.; OH, Y.S. Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. **Chemosphere**, Coreia do Sul, v. 59, n. 6, p. 845-852, 2005.

KIM, S.; SONG, S.; YOO, Y. Characterization of membrane-bound nitrate reductase from denitrifying bacteria *Ochrobactrum anthropi* SY509. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Coreia do Sul, v. 11, n. 1, p. 32-37, 2006.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**, EUA, v. 36, n. 3, p. 364-373, 2010.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual de Biodiesel**. Ed. Edgard Blucher, 332p., 2006.

KUHNT, G. BEHAVIOR AND FATE OF SURFACTANTS IN SOIL. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Alemanha, v. 12, n. 10, p. 1813-1820, 1993.

KUMAR, R.; PAL, P. Turning hazardous waste into value-added products: production and characterization of struvite from ammoniacal waste with new approaches. **Journal of Cleaner Production**, Índia, v. 43, p. 59-70, 2013.

KWON, G.; KIM, J.E.; KIM, T.K.; SOHN, H.Y.; KOH, S.C.; SHIN, K.S.; KIM, D.G. *Klebsiella pneumoniae* KE-1 degrades endosulfan without formation of the toxic metabolite, endosulfan sulfate. **Fems Microbiology Letters**, Coreia do Sul, v. 215, n. 2, p. 255-259, 2002.

LADHA, J.; BARRAQUIO, W.; WATANABE, I. Isolation And Identification Of Nitrogen-Fixing Enterobacter-Cloacae And *Klebsiella-Planticola* Associated With Rice Plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Filipinas, v. 29, n. 10, p. 1301-1308, 1983.

LAPINSKIENE, A.; MARTINKUS, P.; REBZDAITE, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. **Environmental Pollution**, Lituania, v. 142, n. 3, p. 432-437, 2006.

LAWNICZAK, L.; KACZOREK, E.; OLSZANOWSKI, A. The influence of cell immobilization by biofilm forming on the biodegradation capabilities of bacterial consortia. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Polônia, v. 27, n. 5, p. 1183-1188, 2011.

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

LEE, S. LEE, S.J.; KIM, S.H.; PARK, I.H.; LEE, Y.S.; CHUNG, S.Y.; CHOI, Y.L. Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp Y6-1 isolated from waste soybean oil. **Bioresource Technology**, Coreia do Sul, v. 99, n. 7, p. 2288-2292, 2008.

LEME, D. GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; RENZ, S.; REINEL, S.; DE OLIVEIRA, D.P.; FERRAZ, E.R.A.; DE MARCHI, M.R.R.; MACHADO, M.C.; ZOCOLO, G.J.; MARIN-MORALES, M.A. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **Journal of Hazardous Materials**, Brasil, v. 199, p. 343-349, 2012.

LEME, D.M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; SKERSWETAT, M.; MARCHI, M.R.R.; MACHADO, M.C.; OLIVEIRA, D.P.; MARIN-MORALES, A. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Brasil, v. 74, n. 8, p. 2148-2155, 2011.

LEUNG, D.; KOO, B.; GUO, Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions. **Bioresource Technology**, China, v. 97, n. 2, p. 250-256, 2006.

LI, B.; PAN, D.M.; ZHENG, J.S.; CHENG, Y.J.; MA, X.Y.; HUANG, F.; LIN, Z. Microscopic investigations of the Cr(VI) uptake mechanism of living *Ochrobactrum anthropi*. **Langmuir**, China, v. 24, n. 17, p. 9630-9635, 2008.

LI, X.J.; LIN, X.; LI, P.J.; LIU, W.; WANG, L.; MA, F.; CHUKWUKA, K.S. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. **Journal of Hazardous Materials**, China, v. 172, n. 2-3, p. 601-605, 2009.

LI, Y.G.; LI, W.L.; HUANG, J.X.; XIONG, X.C.; GAO, H.S.; XING, J.M.; LIU, H.Z. Biodegradation of carbazole in oil/water biphasic system by a newly isolated bacterium *Klebsiella* sp LSSE-H2. **Biochemical Engineering Journal**, China, v. 41, n. 2, p. 166-170, 2008.

LIANG, Y.T.; ZHANG, X.; WANG, J.; LI, G.H. Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China. **Journal of Hazardous Materials**, China, v. 241, p. 371-378, 2012.

LIN, Q.; MENDELSSOHN, I. Potential of restoration and phytoremediation with *Juncus roemerianus* for diesel-contaminated coastal wetlands. **Ecological Engineering**, EUA, v. 35, n. 1, p. 85-91, 2009.

LIN, T.; PAN, P.; CHENG, S. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, Taiwan, v. 176, n. 1-3, p. 27-34, 2010.

LIN, T.C.; PAN, P.T.; YOUNG, C.C.; CHANG, J.S.; CHANG, T.C.; CHENG, S.S. Evaluation of the optimal strategy for ex situ bioremediation of diesel oil-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, Alemanha, v. 18, n. 9, p. 1487-1496, 2011.

LORS, C.; RYNGAERT, A.; PERIE, F.; DIELS, L.; DAMIDOT, D. Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. **Chemosphere**, França, v. 81, n. 10, p. 1263-1271, 2010.

LOZANO-GARCIA, B.; PARRAS-ALCANTARA, L.; DE ALBORNOZ, M. Effects of oil mill wastes on surface soil properties, runoff and soil losses in traditional olive groves in southern Spain. **Catena**, v. 85, n. 3, p. 187-193, 2011.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. **Applied and Environmental Microbiology**, Áustria, v. 67, n. 7, p. 3127-3133, 2001.

MARIANO, A.P.; TOMASELLA, R.C.; DE OLIVEIRA, L.M.; CONTIERO, J.; DE ANGELIS, D.D. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, Brasil, v. 7, n. 9, p. 1323-1328, 2008.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162f. Tese (Doutorado. Instituto de Geociências e Ciências Exatas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MATTIUZI, C. D. P.; PALAGI, A. C.; TEIXEIRA, E.C. W. Poluição Atmosférica do Biodiesel - Estado da Arte. In: TEIXEIRA, E. C. (Ed.). *Biodiesel: impacto ambiental, agrônômico e atmosférico*. Porto Alegre: FEPAM, 2012. p.41-61.

MCKEW, B.A.; COULON, F.; YAKIMOV, M.M.; DENARO, R.; GENOVESE, M.; SMITH, C.J.; OSBORN, A.M.; TIMMIS, K.N.; MCGENITY, T.J. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. **Environmental Microbiology**, Inglaterra, v. 9, n. 6, p. 1562-1571, 2007.

MEGHARAJ, M.; RAMAKRISHNAN, B.; VENKATESWARLU, K.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. **Environment International**, Índia, v. 37, n. 8, p. 1362-1375, 2011.

MEYER, D. **Avaliação da biodegradabilidade das misturas de diesel e biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias**. 2011. 161 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

MEYER, D. D.; SANTESTEVAN, N.A.; BUCKER, F.; SALAMONI, S.P.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F.A.D.; BENTO, F.M. Capability of a selected bacterial consortium for degrading diesel/biodiesel blends (B20): Enzyme and biosurfactant production. **Journal of Environmental Science and Health Part A -Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering**, Brasil, v. 47, n. 12, p. 1776-1784, 2012

MISHRA, S.; JYOT, J.; KUHAD, R.C.; LAL, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Índia, v. 67, n. 4, p. 1675-1681, 2001.

MISHRA, S.; SINGH, S. Microbial degradation of n-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes. **Bioresource Technology**, Índia, v. 111, p. 148-154, 2012.

MNIF, S.; CHAMKHA, M.; LABAT, M.; SAYADI, S. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Tunísia, v. 111, n. 3, p. 525-536, 2011.

MOHAN, S.; SHAILAJA, S.; KRISHNA, M.R.; REDDY, K.B. SARMA, P.N. Bioslurry phase degradation of di-ethyl phthalate (DEP) contaminated soil in periodic discontinuous mode operation: Influence of bioaugmentation and substrate partition. **Process Biochemistry**, Índia, v. 41, n. 3, p. 644-652, 2006

MOHANTY, G.; MUKHERJI, S. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Índia, v. 61, n. 3, p. 240-250, 2008.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R.; HERNANDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUIN, C.; ZAPATA-PEREZ, O.; MENDOZA-CANTU, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, México, v. 27, n. 2, p. 165-175, 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006.

MOREIRA, I.T.A.; OLIVEIRA, O.M.C.; TRIGUIS, J.A.; DOS SANTOS, A.M.P.; QUEIROZ, A.F.S.; MARTINS, C.M.S.; SILVA, C.S.; JESUS, R.S. Phytoremediation using *Rizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). **Microchemical Journal**, Brasil, v. 99, n. 2, p. 376-382, 2011.

MORGAN, P.; WATKINSON, R. HYDROCARBON DEGRADATION IN SOILS AND METHODS FOR SOIL BIOTREATMENT. **Critical Reviews in Biotechnology**, Inglaterra, v. 8, n. 4, p. 305-333, 1989.

MUDGE, S.; PEREIRA, G. Stimulating the biodegradation of crude oil with biodiesel preliminary results. **Spill Science & Technology Bulletin**, Paíse de Gales v. 5, n. 5-6, p. 353-355, 1999

MUKRED, A. M. et al. Development Of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation Of Crude Petroleum-Oil in Contaminated Water: **OnLine Journal of Biological Sciences**, v.8, p. : 73-79, 2008.

NADKARNI, M. A.; MARTIN, F. E.; JACQUES, N. A.; HUNTER, N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. **Microbiology**, Austrália, v. 148, n. Pt 1, p. 257-66, 2002

NICHOLSON, W.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.;SETLOW, P. Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, EUA, v. 64, n. 3, p. 548-572, 2000.

OSTERREICHER-CUNHA, P.; VARGAS, E.D.; GUIMARAES, J.R.D.; LAGO, G.P.; ANTUNES, F.D.; DA SILVA, M.I.P. Effect of ethanol on the biodegradation of gasoline in an unsaturated tropical soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**,Brasil, v. 63, n. 2, p. 208-216, 2009.

OWSIANIAK, M. CHRZANOWSKI, L.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.;OLSZANOWSKI, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A.K.; HEIPIEPER, H.J. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, Polônia, v. 100, n. 3, p. 1497-1500, 2009.

PADHI, S.; TRIPATHY, S.; SEN, R.; MAHAPATRA, A.S.;MOHANTY, S.; MAITI, N.K. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying Klebsiella pneumoniae CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Índia, v. 78, p. 67-73, 2013.

PALIWAL, V.; PURANIK, S.; PUROHIT, H. Integrated Perspective for Effective Bioremediation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Índia, v. 166, n. 4, p. 903-924, 2012.

PASQUALINO, J.; MONTANE, D.; SALVADO, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass & Bioenergy**, Espanha, v. 30, n. 10, p. 874-879, 2006.

PASSMAN, F.; DOBRANICK, J. K. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. . **International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels 2005**.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. Soil microbiology and biochemistry California: **Academic Press**, 1989. 275.

PAZMINO, D.; WINKLER, M.; GLIEDER, A.; FRAAIJE, M.W. Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. **Journal of Biotechnology**, Holanda, v. 146, n. 1-2, p. 9-24, 2010.

PEIXOTO, R. S.; VERMELHO, A. B.; ROSADO, A. S. Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects. **Enzyme Research**, p. 1-7, 2011.

PEREIRA JUNIOR, N.; E.B., G.; SORIANO, A. U. **Séries em Biotecnologia: Biodegradação de Hidrocarbonetos**. Rio de Janeiro: Amiga Digital. v. 3, 75 p. 2009.

PIETROLETTI, M. et al. Preliminary evaluation of hydrocarbon removal power of Caulerpa racemosa in seawater by means of infrared and visible spectroscopic measurements. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Itália, v. 77, n. 3, p. 673-679,2010.

PIGNATELLO, J.; OLIVEROS, E.; MACKAY, A. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, EUA, v. 36, n. 1, p. 1-84, 2006.

PINTO, A. GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIRO, N.M. TORRES, E.A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P.A.D.; DE ANDRADE, J.B. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.

PLANGKLANG, P.; REUNGSANG, A. Bioaugmentation of carbofuran residues in soil by Burkholderia cepacia PCL3: A small-scale field study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Tailândia, v. 65, n. 6, p. 902-905, 2011.

PRINCE, R.; HAITMANEK, C.; LEE, C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere**, EUA, v. 71, n. 8, p. 1446-1451, 2008.

PRINCE, R. C. Biodiesel. In: TIMMIS, K. N. (Ed.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, 2010.

PÉRES DA SILVA, E.; CAMARGO, J.C.; SORDI, A.; SANTOS, A.M.R. O Futuro dos Recursos: **Revista Multiciências**, Brasil, v. 1, p.1-22, 2003.

RASHID, U.; IBRAHIM, M.; YASIN, S.; YUNUS, R.; TAUFIQ-YAP, Y.H.; KNOTHE, G. Biodiesel from Citrus reticulata (mandarin orange) seed oil, a potential non-food feedstock. **Industrial Crops and Products**, EUA, v. 45, p. 355-359, 2013..

REDDY, K. R.; ADMAS, J. F.; RICHARDSON, C. Potential technologies for remediation of Brownfield. **Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management**. v.3, p. 61–68, 1999.

RICHARD, J.; VOGEL, T. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, França, v. 44, n. 2-3, p. 93-100, 1999.

RISER-ROBERTS, E. **Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes**. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1998.

ROCHA, D. Q.; BARROS, D.K.; COSTA, E.J.C.; SOUZA, K.S.; PASSOS, R.R.; JUNIOR, V.F.V; CHAAR, J.S. Determinação da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel adicionado ao diesel mineral através de monitoramento seletivo de íons. **Química Nova**, Brasil v.31, p 1062-1066, 2008.

RODRIGUES, D.; SAKATA, S.K.; COMASSETO, J.V.; BICEGO, M.C.; PELLIZARI, V.H. Diversity of hydrocarbon-degrading Klebsiella strains isolated from hydrocarbon-contaminated estuaries. **Journal of Applied Microbiology**, EUA, v. 106, n. 4, p. 1304-1314, 2009.

RUBERTO, L.; DIAS, R.; LO BALBO, A.; VAZQUEZ, S.C.; HERNANDEZ, E.A.; MAC CORMACK, W.P. Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. **Journal of Applied Microbiology**, Argentina, v. 106, n. 4, p. 1101-1110, 2009.

SACHDEV, D. CHAUDHARI, H.G.; KASTURE, V.M.; DHAVAL, D.D.; CHOPADEV, B.A. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing Klebsiella pneumoniae strains from rhizosphere of wheat (Triticum aestivum) and their effect on plant growth. **Indian Journal of Experimental Biology**, Índia, v. 47, n. 12, p. 993-1000, 2009.

SCHERR, K.; AICHBERGER, H.; BRAUN, R.; LOIBNER, A. P Influence of soil fractions on microbial degradation behavior of mineral hydrocarbons. **European Journal of Soil Biology**, Austria, v. 43, n. 5-6, p. 341-350, 2007.

SCHLEICHER, T., WERKMEISTER, R., RUSS, W., MEYER-PITTRUFF, R. Microbiological stability of biodiesel-diesel-mixtures. **Bioresource Technology**, Alemanha, v. 100, n. 2, p. 724-730, 2009.

SCOTT, C.; LEWIS, S.E.; MILLA, R.; TAYLOR, M.C.; RODGERS, A.J.W.; DUMSDAY, G.; BRODIE, J.E.; OAKESHOTT, J.G.; RUSSELL, R.J. A free-enzyme catalyst for the bioremediation of environmental atrazine contamination. **Journal of Environmental Management**, Austrália, v. 91, n. 10, p. 2075-2078, 2010.

SCRAGG, A. **Environmental Biotechnology**. Ed.Oxford, Nova York, 2ª ed.,:447p., 2005.

SEABRA, P. N. Capítulo. 24, Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In:**Microbiologia Ambiental**. 2.ª ed. rev. ampl. - Jaguariúna, p.547-570,2008.

SENDZIKIENE, E.; MAKAREVICIENE, V.; JANULIS, P.; MAKAREVICIUTE, D. Biodegradability of biodiesel fuel of animal and vegetable origin. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Lituania, v. 109, n. 5, p. 493-497, 2007.

SERRANO, M.; GALLEGU, M.; GONZALEZ, J.L. TEJADA, M. Natural attenuation of diesel aliphatic hydrocarbons in contaminated agricultural soil. **Environmental Pollution**, Espanha, v. 151, n. 3, p. 494-502, 2008.

SHABIR, G.; AFZAL, M.; ANWAR, F.; TAHSEEN, R.; KHALID, Z.M. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Paquistão, v. 61, n. 2, p. 161-166, 2008.

SILVA, C. M. M.; VIEIRA, R. F. Capítulo 2. Impacto de Xenobióticos e Metais Pesados na Microbiota do Solo. In: **Microbiologia Ambiental**. 2.ª ed. rev. ampl. - Jaguariúna, p.18-48, 2008.

SILVA, G.S.; MARQUES, E.L.S.; DIAS, J.C.T.; LOBO, I.P.; GROSS, E.; BRENDEL, M.; DA CRUZ, R.S.; REZENDE, R.P. Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. **Applied Soil Ecology**, Brasil, v. 55, p. 27-35, 2012.

SILVA, I.S.; SANTOS, E.C.; MENEZES, C.R.; FARIA, A.F.; FRANCISCON, E.; GROSSMAN,M.; DURRANT, L.R. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. **Bioresource Technology**, Brasil, v. 100, n. 20, p. 4669-4675, 2009.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. Brasil: **Ciência Rural**, Brasil, v. 38, n. 3, p. 843 – 851, 2008.

SINGH, C.; LIN, J. Evaluation of nutrient addition to diesel biodegradation in contaminated soils. **African Journal of Biotechnology**,África do Sul, v. 8, n. 14, p. 3286-3293, 2009.

SOARES, J.; MARIANO, A.; DE ANGELIS, D. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **African Journal of Biotechnology**,Brasil, v. 8, n. 12, p. 2774-2778, 2009.

SORKHOH, N. A.; IBRAHIM, A. S.; GHANNDOUM, M. A.;RADWAN, S. S. High temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil - polluted Kuwait desert, **Applied Microbiology e Biotechnology**, v. 39, p. 123-126, 1993.

de SOUZA, M. M. **Biodegradação de biodiesel em misturas diesel/biodiesel por microrganismos de água portuária**. 164f. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

SRIDEVI, V.; LAKSHMI, M.V.V.C.; SWAMY, A.V.N; RAO, M.N. Implementation of response surface methodology for phenol degradation using *Pseudomonas putida* (NCIM 2102). **J Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v. 2, p 1- 7, 2011.

STOTZKI, G. Microbial respiration. In.: Black, C. A. (ed.). **Methods in soil analysis**. Madison. SSSA , p. 1550 – 1572, 1965.

SUEIRO, R.; GARRIDO, M.; ARAUJO, M. Mutagenic assessment of Prestige fuel oil spilled on the shore and submitted to field trials of bioremediation. **Science of the Total Environment**, Espanha, v. 409, n. 23, p. 4973-4978, 2011.

SZCZESNA-ANTCZAK, M.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, Polônia, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009

TACCARI, M.; MILANOVIC, V.; COMITINI, F.; CASUCCI, C.; CIANI, M. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Itália, v. 66, n. 1, p. 39-46, 2012.

TAHHAN, R.A; AMMARI, T.G.; GOUSSOUS, S.J.; AL-SHDAIFAT, H.I. Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Jordânia, v. 65, n. 1, p. 130-134, 2011.

TANG, J.; WANG, M.; WANG, F.; SUN, Q.; ZHOU, Q. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Environmental Sciences**, China, v. 23, n. 5, p. 845-851, 2011.

TANG, J.C.; WANG, R.G.; NIU, X.W.; ZHOU, Q.X. Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms. **Soil & Tillage Research**, China, v. 110, n. 1, p. 87-93, 2010.

TAULE, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V.M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, Itália, v. 356, n. 1-2, p. 35-49, 2012.

TEDESCO, M. J. ; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A., BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solos, plantas e outros materiais**, Porto Alegre, Departamento de Solos, UFRGS, 174p., 1995.

THAPA, B.; KUMAR, A. K. C.; GHIMIRE, M. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil.: **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 164, p. 164-170, 2012.

TRAMONTINI, L. **Micorremediação de solo contaminado com a mistura diesel/biodiesel**. 2013. 125f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. **Chemosphere**, Brasil, v. 58, n. 4, p. 515-522, 2005.

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

UENO, A.; ITO, Y.; YUMOTO, I.; OKUYAMA, H. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Japão, v. 23, n. 12, p. 1739-1745, 2007.

UHLIK, O.; LEEWIS, M.C.; STREJCEK, M.; MUSILOVA, L.; MACKOVA, M.; LEIGH, M.B.; MACEK, T. Stable Isotope Probing In The Metagenomics Era: A Bridge Towards Improved Bioremediation. **Biotechnology Advances**, República Tcheca v. 31, n. 2, p. 154-165, 2013.

USTA, N.; OZTURK, E.; CAN, O.; CONKUR, E.S.; NAS, S.; CON, A.H.; CAN, A.C.; TOPCU, M. Combustion of biodiesel fuel produced from hazelnut soapstock/waste sunflower oil mixture in a Diesel engine. **Energy Conversion and Management**, Turquia, v. 46, n. 5, p. 741-755, 2005.

SRIDEVI, V., LAKSHMI, M.V.V.C.; SWAMY, A.V.N.; RAO, M.N. Implementation of response surface methodology for phenol degradation using *Pseudomonas putida* (NCIM 2102). **J Bioremed Biodegrad**, Índia, v. 2, 2011.

VAN BEILEN, J.; FUNHOFF, E. Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. **Current Opinion in Biotechnology**, Suíça, v. 16, n. 3, p. 308-314, 2005.

VAN BEILEN, J. B.; FUNHOFF, E. G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Zurique, v. 74, n. 1, p. 13-21, 2007.

VAN BEILEN, J. B.; LI, Z.; DUETZ, W. A.; SMITS, T. H. M.; WITHOLT, B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology-Rev. IFP*, v. 58, n. 4, p. 427-440, 2003.

VAN BOGAERT, I.N.A.; GROENEBOER, S.; SAERENS, K.; SOETAERT, W. The role of cytochrome P450 monooxygenases in microbial fatty acid metabolism. **Febs Journal**, Bélgica, v. 278, n. 2, p. 206-221, 2011.

VAN HAMME, J.; SINGH, A.; WARD, O. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Canadá, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.

VANLAERE, E. BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; LIPUMA, J.J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D.P.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. Taxon K, a complex within the Burkholderia cepacia complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp nov and *Burkholderia lata* sp nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Bélgica, v. 59, p. 102-111, 2009.

VASCONCELLOS, S. P. **Atividades enzimáticas e de biodegradação de microrganismos do petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul)**. 2006. 238f. Tese (Doutorado em Ciências). Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

VIEIRA, P.A.; VIEIRA, R.B.; DE FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. **Journal of Hazardous Materials**, Brasil, v. 140, n. 1-2, p. 52-59, 2007.

VIÑAS, M.; GRIFOLL, M.; SABATÉ, J.; SOLANAS, A.M. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Espanha, v. 28, n. 5, p. 252-260, 2002.

VON OEPEN, B.; KORDEL, W.; KLEIN, W. Sorption of non-polar and polar compounds to soils: processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106. **Chemosphere**, v. 22, n. 3, p. 285-304, 1991.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, n. 3, p. 237-241, JUN 2001 2001. ISSN 0958-1669.

WHITE, J.; GILBERT, J.; HILL, G.; HILL, E.; HUSE, S.M.; WEIGHTMAN, A.J.; MAHENTHIRALINGAM, E. Culture-Independent Analysis of Bacterial Fuel Contamination Provides Insight into the Level of Concordance with the Standard Industry Practice of Aerobic Cultivation. **Applied and Environmental Microbiology**, EUA, v. 77, n. 13, p. 4527-4538, 2011.

WOLICKA, D.; SUSZEK, A. Bioremediation of contaminated area by monocyclic hydrocarbons. **Mineral Resources Management**, Polónia, v. 24, n. 2, p. 59-66, 2008.

WU, Y.R.; HE, T.T.; ZHONG, M.Q.; ZHANG, Y.L.; LI, E.M.; HUANG, T.W.; HU, Z. Isolation of marine benzo[a]pyrene-degrading *Ochrobactrum* sp BAP5 and proteins characterization. *Journal of Environmental Sciences-China*, v. 21, n. 10, p. 1446-1451, 2009..

XU, Y.; LU, M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Journal of Hazardous Materials**, China, v. 183, n. 1-3, p. 395-401, 2010.

YUSUF, N.; KAMARUDIN, S.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, Maçásia, v. 52, n. 7, p. 2741-2751, 2011.

ZANAROLI, G.; DI TORO, S.; TODARO, D.; VARESE, G.C; BERTOLOTTA, A.; FAVA, F.. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. **Microbial Cell Factories**, Itália, v. 9, 2010.

ZHANG, D.; ZHU, L. Effects of Tween 80 on the removal, sorption and biodegradation of pyrene by *Klebsiella oxytoca* PYR-1. **Environmental Pollution**, China, v. 164, p. 169-174, 2012.

ZHANG, X.; PETERSON, C.L.; REECE, D.; MÖLLER, G.; HAWS, R . Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, EUA, v. 41, n. 5, p. 1423-1430, 1998.

ZHANG, Z.; GAI, L.; HOU, Z.; YANG, C.; MA, C.; WANG, Z.; SUN, B.; HE, X.; TANG, H.; XU, P. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. **Bioresource Technology**, China, v. 101, n. 21, p. 8452-8456, 2010.

ZHAO, J. HALASZ, A.; PAQUET, L.; BEAULIEU, C.; HAWARI, J. Biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine and its mononitroso derivative hexahydro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triazine by *Klebsiella pneumoniae* strain SCZ-1 isolated from an anaerobic sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, Canadá, v. 68, n. 11, p. 5336-5341, 2002.

ZHU, L.; LU, L.; ZHANG, D. Mitigation and remediation technologies for organic contaminated soils. **Frontiers of Environmental Science & Engineering in China**, v. 4, n. 4, p. 373-386, 2010.

ZULFIQAR, S.; SHAKOORI, A. Molecular characterization, metal uptake and copper induced transcriptional activation of efflux determinants in copper resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Gene**, Paquistão, v. 510, n. 1, p. 32-38, 2012.

8. ANEXOS

8.1 Meio mineral (Bushnell e Haas, 1941)

Solução de Nutrientes	
Reagentes	g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1
NH ₄ NO ₃	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
FeCl ₃	0,05
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02

8.2 Meio mineral (Richard & Vogel, 1999).

Solução de Macronutrientes			
Reagentes	g L ⁻¹	Substituto	g L ⁻¹
KCl	0,7		
KH ₂ PO ₄	2	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2,9
Na ₂ HPO ₄	3		
NH ₄ NO ₃	1		

Solução de Micronutrientes - 1mL.L ⁻¹			
Reagentes	g L ⁻¹	Substituto	g L ⁻¹
MgSO ₄	4	MgSO ₄ .7H ₂ O	8,2
FeSO ₄	0,2	FeSO ₄ .7SO ₄	0,36
MnCl ₂	0,2	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,31
CaCl ₂	0,2	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,26

8.3 Solução mineral com Indicador-Redox (TTC ou DCPIP)

Solução	Volume
MM1	400 mL
TTC ou DCPIP (0,25 g L ⁻¹)	100 mL

8.4 Meio ágar nutriente

Reagentes	g L ⁻¹
Extrato de Carne	3,0
Peptona Bacteriológica	5,0
Ágar Bacteriológico	15,0

8.5 Caldo nutriente

Reagentes	g L ⁻¹
Extrato de Carne	3,0
Peptona Bacteriológica	5,0

8.6 Curva padrão para quantificação de proteínas totais

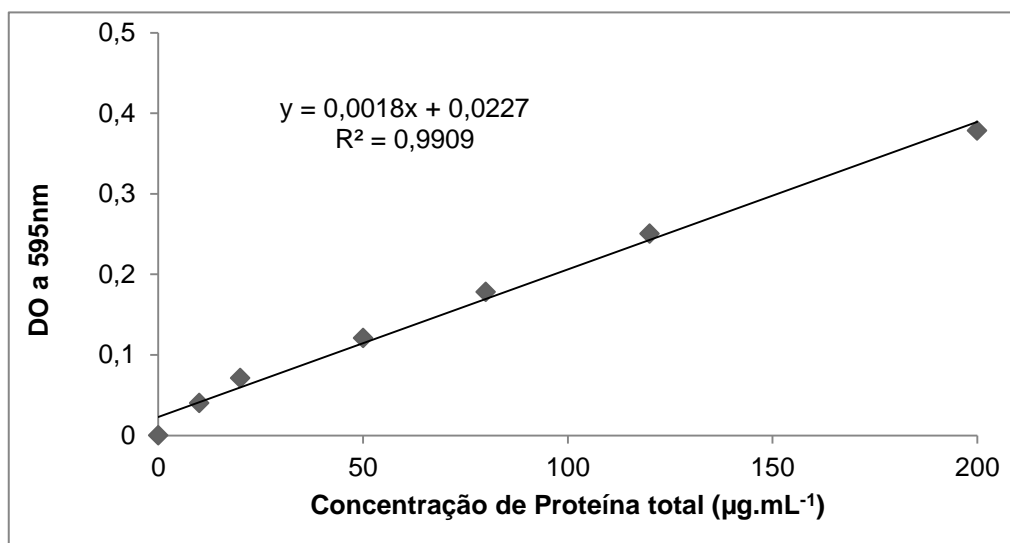


Figura 14 Curva padrão para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976) referente ao ensaio realizado no item 3.2.5.3.

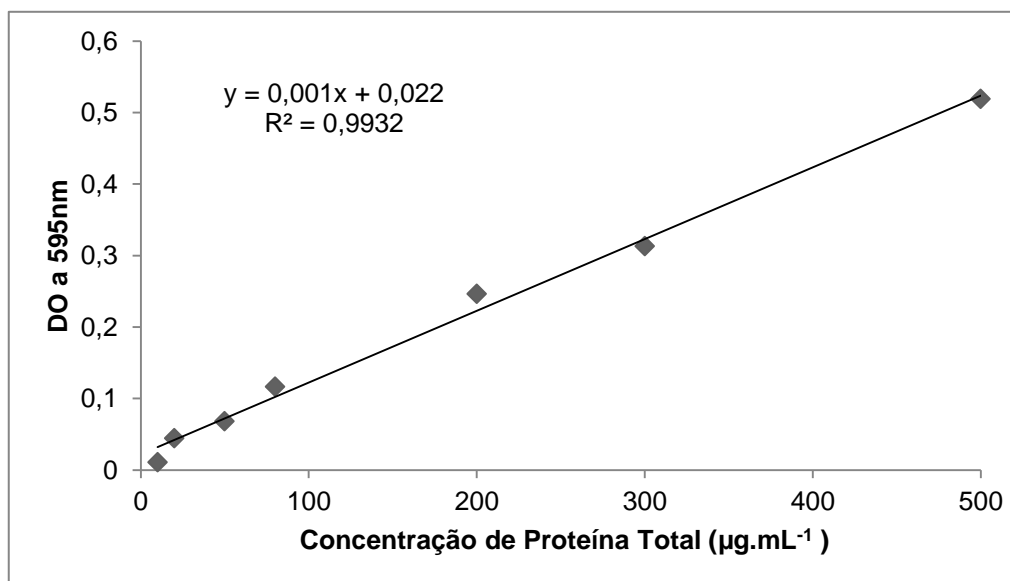


Figura 15 Curva padrão para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976) referente ao ensaio realizado no item 3.3.4.

8.7 Monitoramento de temperaturas mínimas e máximas e a média ponderada (22,7°C).

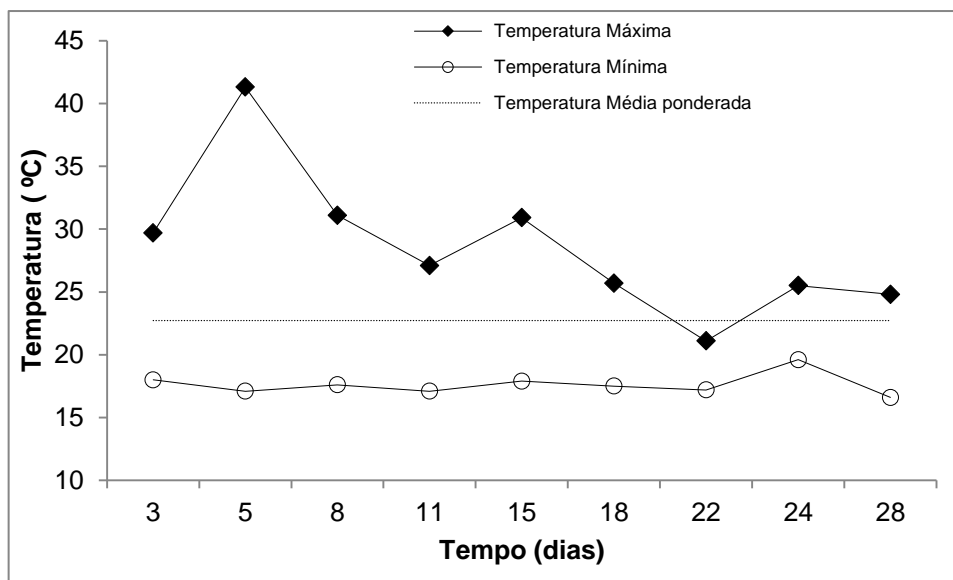


Figura 16 Monitoramento de temperaturas máximas e mínimas ao longo do ensaio de Biorremediação.