

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

**AVALIAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO  
PELA MISTURA B10 POR CONSÓRCIO BACTERIANO**

Tatiana S. Colla

Bióloga – UFRGS

Porto Alegre, abril de 2012.

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

**AVALIAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO  
PELA MISTURA B10 POR CONSÓRCIO BACTERIANO**

Tatiana S. Colla  
Bióloga – UFRGS

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

Porto Alegre, RS, Brasil  
Abril de 2012

## CIP - Catalogação na Publicação

Colla, Tatiana Simonetto

Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura B10 por consórcio bacteriano / Tatiana Simonetto Colla. -- 2012.

138 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, 2012.

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

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Fátima Bento, pela orientação, oportunidade e confiança depositada em mim durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, por me ensinarem o valor que o conhecimento ocupa na vida de uma pessoa e por me incentivarem a buscar sempre o meu melhor.

À Fran, à Marcela e à Vanessa pelas inúmeras ajudas e pelo apoio “técnico”.

Aos colegas de laboratório, no ICBS e no Solos, pelo apoio, pelas boas risadas, e pela parceria nas horas de cafés e almoços no RU.

Aos meus amigos, pelo carinho e confiança de todas as horas.

Ao Moisés, pela compreensão, carinho e ajuda em todos os momentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente por contribuírem em minha formação acadêmica.

Ao CNPq e à CAPES, pelo investimento financeiro.

E a todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para conclusão desta minha etapa profissional.

# AVALIAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO PELA MISTURA B10 POR CONSÓRCIO BACTERIANO<sup>1</sup>

## Resumo

Autor: Tatiana Simonetto Colla  
Orientador: Fátima Menezes Bento

O diesel brasileiro é um importante combustível dentro da matriz energética e pode ser comercializado como uma mistura com biodiesel (Diesel B). A introdução do biodiesel trouxe importantes vantagens para esta nova formulação, em relação ao diesel de petróleo. Como vantagens: fonte renovável, maior biodegradabilidade e redução no impacto ambiental por emitir baixo teor de hidrocarbonetos não queimados, óxidos de enxofre, monóxido de carbono e material particulado. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a biodegradação da mistura diesel:biodiesel B10 em solo propositalmente contaminado, através das estratégias de atenuação natural, bioestimulação, bioaumentação convencional (adição do inóculo ao tempo 0) e bioaumentação sucessiva (adição do inóculo aos tempos 0 e 11). A seleção de um consórcio bacteriano foi realizada em meio mineral mínimo, contendo o indicador redox cloreto de trifeniltetrazólio e a mistura B10. A partir da estimativa da produção de proteínas totais, o consórcio T, composto por três micro-organismos, identificados como *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans* e *Ochrobactrum intermedium*, foi selecionado para participar dos ensaios de bioaumentação. Nos experimentos de biodegradação em solo, foram estimadas as populações de heterotróficos totais e degradadores e avaliada a dinâmica estrutural da comunidade por DGGE. A quantificação da liberação de CO<sub>2</sub> e da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) também foram realizadas. Os resultados obtidos apontaram para percentuais de biodegradação de 35,7% e 32,2% para os tratamentos bioestimulação e bioaumentação sucessiva, respectivamente. Verificou-se, assim, que a microbiota autóctone, embora não tivesse sido previamente exposta a contaminantes derivados de petróleo, diante de estímulos apropriados, foi capaz de expressar seu potencial degradador de maneira eficiente. A bioaumentação sucessiva, apesar de exibir um percentual de biodegradação semelhante ao da bioestimulação, exibiu níveis de redução de HTP superiores ao da bioaumentação convencional, demonstrando que o emprego da estratégia por inoculações sucessivas deve ser melhor investigado, para que seus resultados sejam otimizados, já que se trata de uma tecnologia ainda emergente.

---

<sup>1</sup> 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 (138p.), abril, 2012.

## BIODEGRADABILITY EVALUATION OF BLEND B10 IN SOIL BIOREMEDIATION ASSAY WITH BACTERIA CONSORTIUM<sup>2</sup>

### Abstract

Author: Tatiana Simonetto Colla

Advisor: Fátima Menezes Bento

The Brazilian diesel is an important fuel within the energy matrix and can be marketed as a mixture with biodiesel (Diesel B). The biodiesel introduction brought important advantages to this new formulation with respect to diesel oil. The advantages: renewable source, higher biodegradability and reduced environmental impact by emit low levels of hydrocarbons, sulfur oxides, carbon monoxide and particulate matter. The aim of this study was assess blend diesel:biodiesel B10 biodegradation in soil purposely contaminated, through strategies natural attenuation, biostimulation, conventional bioaugmentation (inoculum addition at the beginning time) and successive bioaugmentation (inoculum addition at the beginning and at day 11). The bacteria consortium selection was performed in mineral minimum medium, with redox indicator triphenyltetrazolium chloride (TTC) and B10. From the estimate of total protein production, T consortium, comprising three microorganisms, identified as *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans* e *Ochrobactrum intermedium*, was selected to participate in the bioaugmentation trials. In the soil biodegradation experiments were estimated total heterotrophic and degrading populations and it was evaluated the structural dynamic community through DGGE. The CO<sub>2</sub> evolution and total petroleum hydrocarbons (TPH) concentration were also carried out. The results showed to biodegradation percentages of 35,7% and 32,2% for the biostimulation and successive bioaugmentation treatment, respectively. Therefore, the autochthonous microbiota, although it had not been previously exposed to derivatives of oil contaminants, with appropriated stimuli, it was able to express their potential degraded efficiently. Successive bioaugmentation, despite showing a biodegradation percentage similar to the biostimulation, display reduction TPH levels higher than conventional bioaugmentation. The use of the successive inoculations strategy should be better investigated since it is still an emerging technology.

---

<sup>2</sup> 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 (138p.), abril, 2012.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	6
2.1 Caracterização e biodegradação de óleo diesel.....	6
2.2 Produção, caracterização e biodegradação de biodiesel.....	8
2.3 Inserção do biodiesel na matriz energética.....	11
2.4 Contaminação ambiental por combustíveis e legislação vigente.....	13
2.5 Técnicas de remediação de meios impactados.....	16
2.6 Biorremediação de ambientes impactados.....	18
2.7 Fatores bióticos e abióticos que afetam a biorremediação.....	24
2.8 Rotas metabólicas de degradação de hidrocarbonetos e ácidos graxos.....	26
2.9 Avaliação da dinâmica da comunidade microbiana em ambientes contaminados.....	35
2.10 Monitoramento da degradação de compostos orgânicos poluentes.....	38
3. Material e Métodos.....	40
3.1 Coleta das amostras.....	40
3.2 Combustíveis.....	41
3.2.1 Óleo diesel metropolitano.....	41
3.2.2 Biodiesel.....	41
3.2.3 Preparo da mistura B10.....	42
3.3 Enriquecimento, isolamento e seleção de micro-organismos.....	42
3.4 Preparo do pré-inóculo.....	43
3.5 Avaliação preliminar do potencial degradador de B0, B10 e B100 pelos isolados bacterianos com indicador-redox.....	44
3.6 Identificação molecular dos micro-organismos.....	45
3.7 Caracterização dos micro-organismos selecionados.....	46
3.7.1 Análise da produção de biossurfactantes pelas culturas puras.....	46
3.7.2 Identificação do gene <i>alkB</i> nos isolados bacterianos.....	46
3.8 Ensaio de biodegradação de B10 em meio líquido por 20 diferentes consórcios microbianos.....	47
3.9 Ensaio de biodegradação de B10 em meio líquido por 5 diferentes consórcios microbianos.....	48
3.9.1 Condições de cultivo.....	48
3.9.2 Estimativa da biodegradação por infravermelho.....	50
3.10 Experimento de Biorremediação.....	51
3.10.1 Amostra de solo não contaminado.....	51
3.10.2 Montagem dos microcosmos.....	52
3.10.3 Monitoramento da população microbiana.....	55
3.10.3.1 Estimativa da população total de micro-organismos heterotróficos.....	55
3.10.3.2 Estimativa da população de micro-organismos degradadores.....	55
3.10.4 Leitura de pH e monitoramento do teor de umidade.....	56
3.10.5 Avaliação da biodegradação do contaminante.....	56
3.10.5.1 Respirometria.....	56

3.10.5.2 Cromatografia Gasosa (CG).....	57
3.10.6 Diversidade da comunidade microbiana.....	58
3.10.6.1 Extração de DNA e amplificação por PCR.....	58
3.10.6.2 Análise por DGGE.....	59
3.11 Análise estatística.....	60
4. Resultados e Discussão.....	61
4.1 Isolamento bacteriano.....	61
4.2 Seleção de micro-organismos potencialmente degradadores.....	62
4.3 Identificação dos isolados.....	65
4.4 Caracterização dos isolados.....	68
4.4.1 Produção de biossurfactantes em meio líquido.....	68
4.4.2 Identificação da presença do gene <i>alkB</i> .....	71
4.5 Seleção do consórcio microbiano.....	74
4.5.1 Avaliação da degradação de ésteres por espectroscopia no infravermelho.....	84
4.6 Biorremediação de solo contaminado com B10.....	93
4.6.1 Avaliação do crescimento microbiano.....	93
4.6.2 Atividade respiratória microbiana.....	98
4.6.3 Degradação de hidrocarbonetos de petróleo.....	102
4.6.4 pH.....	108
4.6.5 Dinâmica e estrutura da comunidade bacteriana.....	109
5. Conclusões.....	116
6. Perspectivas.....	118
7. Referências Bibliográficas.....	119
8. Anexos.....	137

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Algumas propriedades de diesel e biodiesel, produzido a partir de diferentes matérias-primas.....	9
Tabela 2. Custos comparativos para métodos de remediação de solos contaminados por compostos orgânicos.....	18
Tabela 3. Fatores que afetam a biorremediação de contaminantes orgânicos em meios naturais impactados.....	26
Tabela 4. Análise físico-química do solo contaminado amostrado.....	41
Tabela 5. Análise físico-química do solo não contaminado amostrado.....	52
Tabela 6. Resultados para teste preliminar de biodegradação em meio de cultura MM1, contendo o indicador redox TTC e a fonte de carbono (B0, B10 ou B100).....	63
Tabela 7. Identificação das bactérias isoladas de solo contaminado com combustível e selecionadas em teste preliminar de biodegradação.....	65
Tabela 8. Tensão superficial analisada nos tempos 0 e 14 (dias) em meio líquido MM1 com 1% de B10.....	69
Tabela 9. Composição dos cinco consórcios integrantes do ensaio, a partir de diferentes combinações entre os isolados bacterianos.....	75
Tabela 10. Crescimento populacional dos consórcios bacterianos de A a V em contagens de UFC.mL <sup>-1</sup> , nos tempos 0, 1, 3, 5 e 7 (dias).....	76
Tabela 11. Ordem crescente de desempenho dos consórcios C, L, O, R e T na biodegradação da fração biodiesel de B10, obtida a partir dos espectros no infravermelho, em sistemas contendo 10%, 20%, 30% e 40% da mistura.....	86
Tabela 12. Biodegradação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo por diferentes tratamentos de biorremediação.....	103
Tabela 13. Valores de pH monitorados nos tempos 0, 10 e 32 (dias) de ensaio de biorremediação de solo contaminado por B10.....	108
Tabela 14. Índice de diversidade Shannon-Weaver (H') dos solos biorremediados pelos tratamentos de atenuação natural (AN), bioestimulação (BS), bioaumentação convencional (BA CO) e bioaumentação sucessiva (BA SC) nos tempos 0, 11 e 32 (dias).....	115

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo .....	10
Figura 2. Esquema-geral da rota de degradação microbiana para compostos aromáticos, provenientes de diversas fontes.....	28
Figura 3. Representação da rota de degradação aeróbia do benzoato por fungos e bactérias.....	30
Figura 4. Rota metabólica de assimilação de alcanos e de ácidos graxos.....	32
Figura 5. Envolvimento de biossurfactantes produzidos por <i>Pseudomonas sp</i> na captação intracelular de hidrocarbonetos.....	34
Figura 6. Curva padrão elaborada para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976).....	50
Figura 7. Gel de agarose 1,5%, mostrando a amplificação de fragmento de 312pb do gene <i>alk B</i> .....	72
Figura 8. Viragem da coloração do meio de cultura do consórcio O após 36h de incubação a 30°C, em meio MM1, com TTC e 5% de B10.....	78
Figura 9. Produção de proteínas totais pelos consórcios C, L, O, R e T em meio de cultura contendo MM1 e TTC, com 10%, 20%, 30% e 40% de B10, durante 7 dias.....	80
Figura 10. Viragem da coloração do meio de cultura do consórcio T, nos tempos inicial, após 24h de incubação, e final, após 7 dias de incubação em meio MM1, com TTC e 10%, 20%, 30% e 40% de B10.....	82
Figura 11. Espectro no infravermelho de degradação de biodiesel em microcosmos contendo MM1, com o indicador TTC e 20% de B10 pelos consórcios C, L, O, R e T após 7 dias de incubação.....	87
Figura 12. Espectro no infravermelho de degradação de biodiesel em microcosmos contendo MM1, com o indicador TTC e 40% de B10 pelos consórcios C, L, O, R e T após 7 dias de incubação.....	88
Figura 13. Correlação da biodegradação de biodiesel na mistura B10 com os consórcios degradadores C, L, O, R e T em microcosmos com 20% de contaminação, após 7 dias de incubação em MM1 com indicador TTC.....	89

Figura 14. Dendograma obtido pelo método aglomerativo do software MatLab. Clusters de mesma cor indicam consórcios com perfis semelhantes de degradação de biodiesel em sistemas contendo 20% de B10.....	90
Figura 15. Estimativa do Número Mais Provável de micro-organismos degradadores em 32 dias de experimento de biorremediação de solo contaminado por B10.....	93
Figura 16. Estimativa do Número Mais Provável de micro-organismos heterotróficos totais em 32 dias de experimento de biorremediação de solo contaminado por B10.....	94
Figura 17. Proporção entre as populações microbianas de degradadores e heterotróficos estimadas pela contagem do Número Mais Provável durante 32 dias de ensaio de biorremediação de solo contaminado com B10.....	97
Figura 18. Produção acumulada de C-CO <sub>2</sub> gerada pela população edáfica de solo contaminado por B10 durante ensaio de biorremediação ao longo de 32 dias.....	99
Figura 19. Produção diária de C-CO <sub>2</sub> gerada pela população edáfica de solo contaminado por B10 durante ensaio de biorremediação ao longo de 32 dias.....	101
Figura 20. Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (mg.kg solo <sup>-1</sup> ) quantificados por cromatografia gasosa em ensaio de biorremediação de solo contaminado por B10.....	104
Figura 21. Perfis de bandejamento obtidos por DGGE a partir da amplificação da região V3 do gene 16S rRNA em resposta aos tratamentos de atenuação natural, bioestimulação, bioaumentação convencional e bioaumentação sucessiva, em amostragens realizadas nos tempos 0, 11 e 32 (dias).....	110
Figura 22. Dendograma de comparação das comunidades microbianas baseado no padrão de bandas do DGGE, gerado a partir de amostras dos solos tratados por atenuação natural, bioestimulação, bioaumentação convencional e bioaumentação sucessiva, nos tempos 0, 11 e 32 (dias).....	111

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenina
<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
<b>BSA</b>	Albumina de Soro Bovino
<b>C</b>	Citosina
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>CETESB</b>	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
<b>CG</b>	Cromatografia Gasosa
<b>C: N: P</b>	Relação Carbono, Nitrogênio e Fósforo
<b>DGGE</b>	Desnaturação em Gradiente de Gel de Eletroforese
<b>FEPAM</b>	Fundação Estadual de Proteção Ambiental
<b>G</b>	Guanina
<b>HPA</b>	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
<b>HTP</b>	Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>MME</b>	Ministério de Minas e Energia
<b>mN.m<sup>-1</sup></b>	miliNewton por metro
<b>NMP</b>	Número Mais Provável
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCA</b>	Análise de Componentes Principais
<b>r.p.m.</b>	rotações por minuto
<b>T</b>	Timina
<b>TPF</b>	Trifenilformazan
<b>TS</b>	Tensão Superficial
<b>TTC</b>	2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>USEPA</b>	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

## 1. INTRODUÇÃO

O ambiente vem sofrendo alterações significativas que têm sido acompanhadas não só pelo crescimento do uso dos recursos naturais, mas também pela preocupação com a integridade e a recuperação de ambientes degradados. A intensificação na exploração do petróleo como fonte de energia trouxe consigo o aumento dos riscos de contaminação ambiental inerentes às etapas de extração, refino, transporte, armazenamento e distribuição do mesmo e de seus derivados (Das & Chandran, 2011). Assim, além do meio marinho, o solo e, por conseguinte, também as águas subterrâneas configuram meios suscetíveis à poluição proveniente de pelo menos algum desses processos.

Com as previsões que indicam o término das reservas petrolíferas, a busca por fontes de energia renováveis tem se intensificado. A semelhança das propriedades físico-químicas do biodiesel e do petrodiesel tem despertado o interesse de diversos governos, empenhados em desenvolver políticas públicas de inserção gradual do biodiesel na matriz energética nacional (Knothe et al, 2006). Além disso, a utilização de biodiesel proporciona reduções substanciais na liberação de hidrocarbonetos não queimados, óxidos de enxofre, monóxido

de carbono, componentes cancerígenos e material particulado, constituindo uma opção interessante não só do ponto de vista econômico, mas também social e ambiental (Knothe, 2010; Sharma et al, 2008).

O biodiesel é um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (Lei Federal 11.097/05). Quimicamente, pode ser definido como uma mistura de mono-álquil ésteres de ácidos graxos, derivado de óleo vegetal ou gordura animal, via transesterificação (Demirbas, 2009; Knothe, 2010). Esse processo de transformação química permite a utilização do biocombustível em automotores sem emprego de quaisquer alterações mecânicas, uma vez que, ao reduzir sua viscosidade de 28-40mm<sup>2</sup>/s para 4-5 mm<sup>2</sup>/s, aproxima suas propriedades às do petrodiesel, permitindo sua mistura ao combustível fóssil (Knothe, 2010).

No Brasil, a introdução de biodiesel foi estabelecida a partir da obrigatoriedade da adição de 2% do combustível ao diesel de petróleo, em 2008, por determinação da Lei Federal N° 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Após esse período, o percentual passaria aos atuais 5%. Além disso, em 2012, em atendimento ao Programa de Controle de Poluição do Ar por Veículos Automotores (Proconve), entrou em vigor uma nova etapa do cronograma de redução gradual da emissão de poluentes para veículos leves (automóveis) e pesados (caminhões e ônibus). Passa a ser comercializado desde então o Óleo Diesel de Baixo Teor de Enxofre, contendo 50ppm do elemento.

Considerando que a inserção de misturas diesel/biodiesel na matriz energética mundial é recente, estudos acerca de sua biodegradabilidade ainda são necessários. Técnicas de remediação, que apresentem uma relação custo/benefício favorável e que sejam compatíveis com aspectos socioambientais, precisam ser melhor compreendidas para impulsionar a expansão de seu uso frente a métodos convencionais de descontaminação, como a incineração, solidificação/estabilização, extração de vapor do solo e lavagem (Xu & Lu, 2010).

Nesse sentido, o emprego da biorremediação é atrativo, pois seu conjunto de tecnologias é compatível com as rotas biogeoquímicas naturais de reciclagem de nutrientes, tratando-se de uma abordagem sustentável e ambientalmente adequada para descontaminação de meios impactados (El Fantroussi & Agathos, 2005). Além disso, apresenta eficiência nos resultados, simplicidade na manutenção, vasta aplicabilidade e envolvimento de baixos custos operacionais (Bento et al., 2005). O objetivo da técnica é acelerar o processo de transformação de substâncias complexas e recalcitrantes em substâncias essencialmente inócuas ou, ao mínimo, menos tóxicas por meio de micro-organismos e de suas enzimas, através de metabolismos aeróbios ou anaeróbios (El Fantroussi & Agathos, 2005; Aluyor et al., 2009).

Sabe-se que em meios impactados o percentual da população microbiana com capacidade de degradação pode atingir a mesma ordem de grandeza do total de heterotróficos presentes (Tahhan & Abu Atieh, 2009). Apesar disso, o registro de micro-organismos biodegradadores no sítio contaminado não garante a ocorrência de biodegradação dos compostos

poluentes. Parâmetros como pH, oxigênio, umidade e fontes de nitrogênio e fósforo disponíveis são determinantes para o estabelecimento estrutural de comunidades microbianas, e o desequilíbrio nesses fatores pode inviabilizar o processo sob condições naturais. Características próprias do contaminante, como composição química, estado físico e concentração também exercem influência sobre sua taxa de biodegradação, por estarem relacionadas à biodisponibilidade do composto à microbiota (Tyagi et al., 2011).

A fim de otimizar o processo de biorremediação, estratégias que promovem a adição de micro-organismos autóctones ou alóctones competentes – bioaugmentação – e o ajuste de fatores abióticos, como incorporação de nutrientes, correção de pH, umidade e aeração – bioestimulação – têm sido aplicadas isolada ou associadamente (Rahman et al., 2003; Evans et al., 2004). Apesar do crescente número de trabalhos abordando a temática, a eficiência das estratégias ainda é discutida, pois enquanto alguns autores observam resultados satisfatórios (Xu & Lu, 2010; Tahhan et al., 2011; Taccari et al., 2012), outros não obtêm o sucesso esperado (Silva et al., 2009; Mariano et al., 2009; Ruberto et al., 2010).

Diante desse contexto, o objetivo geral desse trabalho foi o de avaliar a biodegradabilidade da mistura diesel/biodiesel B10, confeccionada em laboratório com óleo diesel com 50ppm de enxofre, em solo propositalmente contaminado por um derrame superficial simulado, utilizando-se as estratégias de atenuação natural, bioestimulação, bioaugmentação convencional e bioaugmentação sucessiva.

Como objetivos específicos: 1) isolamento e seleção de bactérias potencialmente biodegradadoras a partir de amostra de solo com contaminação crônica de combustíveis; 2) avaliação da biodegradabilidade da mistura B10 pelos micro-organismos selecionados, compondo consórcios sob diferentes combinações; 3) investigação do incremento do percentual de biodegradação do combustível por meio de diferentes estratégias de biorremediação.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Caracterização e biodegradação de óleo diesel**

O óleo diesel constitui uma mistura complexa, proveniente do processo de refinamento do petróleo cru, via destilação fracionada. É composto principalmente por alcanos de cadeia linear, mas também estão presentes em sua constituição hidrocarbonetos de cadeia ramificada e compostos aromáticos, na faixa de C<sub>9</sub>-C<sub>28</sub> (Knothe, 2010). Embora predominantemente formado por átomos de carbono e hidrogênio, o óleo diesel possui, em baixas concentrações, átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre. Compostos polares, formados a partir desses elementos, conferem boas características lubrificantes ao combustível, mas aumentam seu potencial tóxico para o meio ambiente (ANP, 2012).

A iniciativa de reduzir o teor de enxofre presente no diesel de petróleo faz parte de programas governamentais no mundo inteiro e visam à diminuição da emissão atmosférica de compostos nocivos derivados da queima de combustíveis fósseis. No entanto, o processo de hidrodessulfurização elimina também compostos contendo oxigênio e nitrogênio, gerando a

diminuição indesejável da lubricidade do petrodiesel, o que pode acarretar o desgaste prematuro de bombas e componentes dos sistemas de injeção de combustível. Nesse sentido, a adição de biodiesel, que no Brasil iniciou ao nível mínimo de 2%, foi também uma alternativa para solucionar o problema, pois promove a restauração dos padrões de lubricidade perdidos (Knothe, 2010).

Entre os constituintes do diesel mineral, hidrocarbonetos de baixo peso molecular, como os n-alcanos e compostos aromáticos simples, podem ser prontamente removidos via biodegradação microbiana ou volatilização (Leahy & Colwell, 1990; Olson et al., 1999; Lee et al., 2005). Trabalhos têm avaliado o potencial de degradação de compostos derivados de petróleo por micro-organismos (Zanaroli et al., 2010; Lin et al., 2010), bem como sua toxicidade à biota (Serrano et al., 2009; Pietroletti et al., 2010). A biodegradabilidade dos componentes presentes em derivados do petróleo geralmente diminui na seguinte ordem: n-alcanos > alcanos de cadeia ramificada > alcenos de cadeia ramificada > n-alquil aromáticos de baixo peso molecular > monoaromáticos > cicloalcanos > hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) > asfaltenos (Van Hamme et al., 2003). Foi apontado que algumas populações microbianas podem degradar simultaneamente frações alifáticas e aromáticas de hidrocarbonetos, embora porções recalcitrantes possam permanecer no solo (Molina-Barahona et al., 2004). Diante disso, a adição do biodiesel ao diesel promoveria o incremento nas taxas de biodegradação de frações orgânicas de derivados do petróleo (Owsianiak et al., 2009). O fenômeno ocorreria pela ação de efeitos sinérgicos promovidos pelo

biodiesel, via cometabolismo microbiano (Mudge & Pereira, 1999; Fernández-Álvarez et al., 2007).

## **2.2 Produção, caracterização e biodegradação de biodiesel**

Biocombustíveis são derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores à combustão ou em outro tipo de geração de energia. Os dois principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil são o etanol extraído de cana-de-açúcar e, em escala crescente, o biodiesel, que é produzido a partir de óleos ou de gorduras e adicionado ao diesel de petróleo (ANP, 2012).

A produção mundial de biocombustíveis se baseia hoje nas chamadas tecnologias de primeira geração, o que significa produção de etanol a partir de açúcares ou amidos, como cana, beterraba, milho, trigo e mandioca, e biodiesel de óleos vegetais ou gordura animal, derivados de soja, mamona, dendê, sebo e óleo de fritura. Estão em desenvolvimento várias tecnologias que utilizam os materiais lignocelulósicos como matérias-primas (resíduos agroflorestais, madeira de florestas plantadas, culturas energéticas de curto ciclo, lixo urbano), que são mais baratos, mais abundantes e podem ser produzidos nas mais variadas condições de solo e clima (Leite & Leal, 2007).

As propriedades físico-químicas do biodiesel variam conforme a composição de ácidos graxos do elemento empregado na sua produção (Lin et al., 2011a). Na Tabela 1, algumas dessas variações estão listadas. De acordo com dados de 2010, divulgados pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), a maior parte do biodiesel atualmente

produzido no Brasil deriva do óleo de soja, seguida do uso de sebo bovino e óleo de algodão. Mas outras espécies vegetais potenciais, como dendê, girassol, babaçu, amendoim, mamona e pinhão-manso, também são utilizadas. Na produção mundial, destaca-se ainda o óleo de colza como matéria-prima produtiva (Ferrari et al., 2005).

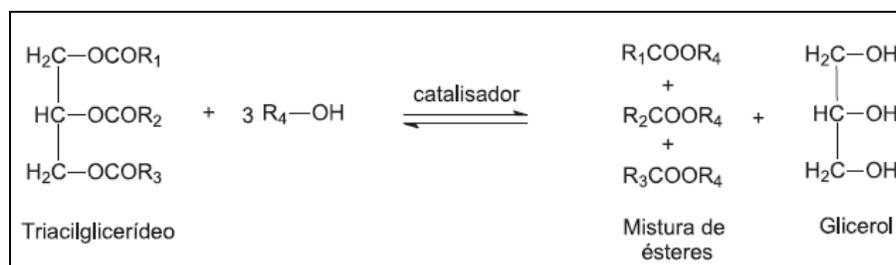
**Tabela 1.** Algumas propriedades de diesel e biodiesel, produzido a partir de diferentes matérias-primas (adaptado de Lin et al., 2011a).

<b>Combustível</b>	<b>Viscosidade (mm<sup>2</sup>/s, 40°C)</b>	<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>, 21°C)</b>	<b>Número cetano</b>	<b>Ponto de fulgor (°C)</b>
Diesel	2.0-4.5	0.82-0.86	51.0	55
Biodiesel de soja	4.08	0.884	50.9	131
Biodiesel de colza	4.83	0.882	52.9	155
Biodiesel de palma	4.71	0.864	57.3	135
Biodiesel de girassol	4.60	0.880	49.0	183
Biodiesel de pinhão-manso	4.40	0.875	57.1	163
Biodiesel de sebo	5.00	0.877	58.8	150

Quimicamente, os óleos e gorduras consistem em moléculas de triacilglicerídeos, constituídas por três ácidos graxos de cadeia longa ligados na forma de ésteres a uma molécula de glicerol. Para viabilizar o uso de óleos vegetais como combustível alternativo, métodos químicos que modificam algumas de suas características podem ser empregados, como a microemulsificação e a pirólise (Geris et al., 2007). No entanto, a transesterificação é considerada a técnica de maior aceitabilidade, pois produz biodiesel com propriedades similares às do diesel fóssil (Demirbas, 2009). Ao reduzir substancialmente sua viscosidade, possibilita sua utilização sem a necessidade de modificações nos sistemas automotivos já existentes (Lin et al., 2011a).

O palmitato e o estearato são os ácidos graxos saturados mais comumente encontrados em óleos vegetais, que também são compostos por oleato, linoleato, mirístico, laureato e linolenato em concentrações variáveis, conforme a fonte de origem do óleo (Murugesan et al., 2009). Enquanto o biodiesel de soja, por exemplo, contém triacilglicerídeos cuja composição inclui ácido linoleico (C18:2) (53%), oleico (C18:1) (23%), palmítico (C16:0) (11%), linolênico (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).

O biodiesel é obtido através de uma reação química de conversão de ésteres de longa cadeia de ácidos graxos em mono alquil ésteres (Knothe, 2010). Na reação de transesterificação, um triacilglicerídeo reage com um álcool na presença de uma base ou ácido forte, produzindo uma mistura de ésteres de ácidos graxos e glicerol (Figura 1).



**Figura 1:** Equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo (Geris et al., 2007).

O biodiesel possui muitas vantagens sobre os combustíveis convencionais (Silva et al., 2012; Mothe et al., 2011; Owsianiak et al., 2009; Schleicher et al., 2009; Demirbas, 2009). Sua biodegradabilidade é favorecida pela presença de cadeias C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> (ácidos graxos), ausência de moléculas

aromáticas, propriedades higroscópicas e disponibilidade de ligações éster de alta energia (Passman et al., 2005). Porém, apresenta também algumas vulnerabilidades em relação ao petrodiesel, como a suscetibilidade à biodeterioração em sistemas de estocagem e a liberação de óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>) durante sua combustão (Passman et al., 2005; Demirbas, 2009). Ainda assim, o apelo ambiental vinculado ao seu uso tem fomentado a ampliação de sua utilização.

### **2.3 Inserção do biodiesel na matriz energética**

O primeiro uso documentado de óleo vegetal como combustível em um motor a diesel ocorreu em 1900, na Exposição Mundial de Paris, quando foi demonstrado o funcionamento de um motor com óleo de amendoim. No entanto, as pesquisas por fontes alternativas de energia pouco avançaram até a primeira crise do petróleo, na década de 70 (Knothe, 2010). Nessa época, floresceram vários programas de desenvolvimento de energias renováveis, de economia de energia, de uso da energia nuclear, do gás natural e do carvão mineral. No Brasil, houve o desenvolvimento de um programa nacional, denominado Próalcool, visando à substituição parcial do petróleo pelo etanol. Este quadro internacional se manteve até meados dos anos 1980, quando os preços do petróleo caíram a valores em torno de US\$ 12 por barril e o interesse pelos substitutos do insumo fóssil arrefeceu devido ao custo dos subsídios necessários para mantê-los no mercado (Leite & Leal, 2007).

Recentemente, novas questões despertaram o interesse pelos biocombustíveis, como a diminuição da dependência externa de petróleo, por

razões de segurança de suprimento ou impacto na balança de pagamentos; minimização dos efeitos das emissões veiculares na poluição local, principalmente nos grandes centros urbanos; e o controle da concentração de gases de efeito estufa na atmosfera (Leite & Leal, 2007).

Acompanhando o crescente consumo e produção de biodiesel principalmente na Europa, o Brasil lança oficialmente, em 06 de dezembro de 2004, o Programa Nacional de Produção de Biodiesel, regulamentado pela Lei nº 11.097, de 2005. A partir desse marco legal, ficou estabelecida a obrigatoriedade do uso de 2% de biodiesel misturado ao petrodiesel a partir de 2008, e de 5% a partir de 2013. Por possuir capacidade de produção instalada, essa última data foi antecipada para 2010. Dessa forma, os tipos de óleo diesel comercializados no território brasileiro são diferenciados basicamente pelos teores máximos de enxofre contidos: S50 (50 ppm de enxofre), S500 (500 ppm de enxofre) e S1800 (1800 ppm de enxofre) (ANP, 2012).

Atualmente, o Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo. Com capacidade instalada para cerca de 5,8 bilhões de litros, a produção anual, em 2010, foi de 2,4 bilhões de litros. Com isso, cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos no país já são renováveis. O Plano Nacional de Energia 2030 (PNE 2030), desenvolvido pelo Ministério de Minas e Energia (MME), projeta um cenário de circulação e comercialização nacional da mistura B8 em 2020, e da B12 em 2030.

## **2.4 Contaminação ambiental por combustíveis e legislação vigente**

Qualquer substância indesejada que seja introduzida no ambiente é referida como 'contaminante', e os efeitos deletérios por ele 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).

Considerando a liberação de análogos de poluentes emitidos por atividades geotérmicas e vulcânicas ao longo da existência do planeta, a Terra sempre foi repositório de contaminantes (Marcano et al., 2003). No entanto, esse aporte intensificou-se após a era da industrialização, com a magnificação dos usos de substâncias químicas, tais como solventes, pesticidas, metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo. Em muitos casos, os efeitos ambientais negativos gerados pela disposição dessas substâncias superam os benefícios de seus usos. De acordo com dados da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), todo o ano, aproximadamente 1,7 a 8,8 milhões de toneladas de óleo são liberadas em corpos d'água no mundo. Na atmosfera, cerca de 100 diferentes Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) já são ubíquos, devido à combustão incompleta de combustíveis fósseis (Megharaj et al., 2011).

No ano de 2010, o consumo de petróleo no Brasil aumentou em torno de 8,5% em relação a 2009. Dessa forma, o país passou a ocupar a 7ª posição em consumo mundial do insumo fóssil. Dentre os derivados energéticos do petróleo, a produção nacional de óleo diesel foi da ordem de 41,4 milhões m<sup>3</sup> (44,6%), e a produção de biodiesel foi de 2,4 milhões m<sup>3</sup>. Com

base na geração de volumes tão expressivos, deve-se considerar que a probabilidade da ocorrência de acidentes, envolvendo vazamentos e derrames, durante as etapas de refino, transporte, armazenamento e manipulação de combustíveis, é grande.

Segundo um histórico de acidentes relacionados ao transporte de cargas perigosas no estado do Rio Grande do Sul, foram registrados pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM), de 1994 a maio de 2010, 475 acidentes rodoviários com produtos químicos de diversas origens. Aproximadamente 25% desse total estavam relacionados ao derramamento de combustíveis, fossem de origem fóssil ou de caráter renovável, em acidentes ocorridos prevalentemente em ferrovias e rodovias (90%), sendo o solo o compartimento ambiental mais impactado (Meyer, 2011).

Contudo, não só derrames acidentais, mas contaminações crônicas por combustíveis também podem comprometer a qualidade do solo e das águas superficiais e subterrâneas. Os postos de combustíveis configuram como potenciais agentes causadores de impactos dessa natureza (Coutinho & Gomes, 2006). Assim, medidas como uso de tanques de 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 estão dentre as normativas da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) para instalação segura de postos de combustíveis (CETESB, 2012).

A CETESB, em seu relatório mais recente (2011), catalogou 4.131 áreas contaminadas no Estado. Dentre os principais grupos de contaminantes

encontrados destacam-se os combustíveis líquidos, solventes aromáticos e HPAs. Nas áreas que estão em remediação ou que já foram reabilitadas, as técnicas de bombeamento e tratamento, recuperação de fase livre e extração multifásica foram as mais empregadas no tratamento de águas subterrâneas. Para remediação de solos, a extração de vapores e a remoção de solo/resíduo foram as preponderantes. No quadro geral, a atenuação natural monitorada configura como a quarta técnica em empregabilidade.

A operação dos postos de combustíveis é responsável por cerca de 78% do total das áreas contaminadas registradas em São Paulo. Esse percentual deve-se ao desenvolvimento de um programa de licenciamento que se iniciou em 2001, após a promulgação da Resolução CONAMA n° 273, de novembro de 2000, que considera que toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis, configuram como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais. 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.

Recentemente, dois outros importantes marcos legais que versam sobre a matéria foram estabelecidos. Em dezembro de 2009, foi publicada a Resolução CONAMA n° 420, primeira regulamentação federal sobre gerenciamento de áreas contaminadas, tendo como referência os parâmetros utilizados pela Lista Holandesa e pela CETESB. No Rio Grande do Sul, a Portaria FEPAM n° 16, de abril de 2010, que dispõe sobre a destinação

adequada de resíduos classe I com características de inflamabilidade no solo, determina o encaminhamento desses resíduos, dentre eles o solo contaminado com combustíveis, a unidades licenciadas de tratamento e não mais a sistemas de destinação final de resíduos denominados “aterro de resíduos classe I”.

## **2.5 Técnicas de remediação de meios impactados**

Uma área contaminada pode ser definida como um local ou um terreno 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 determina impactos negativos sobre os bens a proteger (CETESB, 2012).

Muitas opções ou combinações de opções estão disponíveis para restaurar a qualidade de um sítio impactado. Entretanto, há de se colocar que embora haja diversas tecnologias aplicáveis, o processo de remediação inevitavelmente resultará na mudança ou suspensão das funções naturais do meio, seja permanente ou temporariamente. Em vista disso, Zhu et al. (2010) afirmam que solos que apresentam baixo grau de contaminação por compostos orgânicos poderiam passar apenas por processos que diminuam a disponibilidade ou restrinjam a mobilidade dos poluentes. Para tanto, métodos de estabilização e imobilização funcionariam como tecnologias de mitigação, sendo suficientes para sanar contaminações dessa magnitude. Entretanto, diante de sítios altamente impactados, abordagens mitigadoras não seriam a

melhor opção, havendo a necessidade de recuperar o meio através de técnicas remediadoras (Zhu et al., 2010).

Duas classes principais de remediação podem ser distinguidas. A remediação *in situ*, que envolve tratamentos como a lavagem, a ventilação, a extração de vapores e a biodegradação, realizados sem o deslocamento do material contaminado do local de origem, e a remediação *ex situ*, que promove a descontaminação de um compartimento após a escavação e remoção do material impactado para um ambiente de condições controladas.

As técnicas de depuração para remoção de hidrocarbonetos do solo aplicam diferentes métodos químicos, físicos e biológicos (Pietroletti et al., 2010). A remediação física envolve a separação do contaminante do compartimento ambiental em que se localiza, empregando altas temperaturas ou campos elétricos, por exemplo. São as características do contaminante que determinam a opção mais adequada. Enquanto a remediação térmica seria apropriada ao tratamento de compostos voláteis, semivoláteis ou termicamente instáveis, a remediação eletrocinética seria recomendada para descontaminação de locais impactados por compostos iônicos (Zhu et al., 2010).

As técnicas de remediação química incluem principalmente a aplicação de agentes oxidantes ou solventes para extração dos contaminantes do solo. De acordo com os compostos poluentes envolvidos, diferentes substâncias podem ser utilizadas, como peróxido de hidrogênio, etanol, metanol, surfactantes, óleos vegetais, ciclohexano ou diclorometano (Zhu et al., 2010).

Ainda que as técnicas convencionais de remediação tenham seu uso bastante disseminado e que contem com tecnologias avançadas de apoio, implicam altos custos de execução (Tabela 2) e meios de tratamento que, muitas vezes, remediam, mas também geram impacto ao ambiente. Tratamentos térmicos, como a incineração, por exemplo, promovem um distúrbio inestimável ao solo contaminado. Já a remediação por agentes químicos pode resultar na presença residual do solvente aplicado ao solo para remoção do poluente, gerando um passivo ambiental que requer um tratamento secundário para sua extração (Zhu et al., 2010). Nesse cenário, o tratamento biológico se insere como uma interessante alternativa, pois, embora não tenha todas suas deficiências equalizadas, apresenta vantagens ambientais e econômicas relevantes.

**Tabela 2.** Custos comparativos para métodos de remediação de solos contaminados por compostos orgânicos (Zhu et al., 2010).

<b>Tipo de tratamento</b>	<b>Faixa de custo (\$·ton<sup>-1</sup> solo)</b>
remediação física	120-1500
remediação química	80-440
biorremediação <i>in situ</i>	50-150

## **2.6 Biorremediação de ambientes impactados**

Nas duas últimas décadas, a aplicação de processos biológicos ao tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo tem despertado grande interesse da comunidade acadêmica e industrial (Seabra, 2008). Comparativamente, a técnica possui, em relação às tecnologias

convencionais de remediação, vasta aplicabilidade e envolvimento de baixos custos operacionais. Embora o processo, em alguns casos, possa vir a ser longo, é eficiente na transformação de contaminantes em substâncias inócuas (Madsen, 1991; Scragg, 2005; Zhang et al., 2010).

A metabolização de poluentes orgânicos por organismos vivos compõe a base fundamental da biorremediação. Ao fazerem uso dessa fonte de energia disponível, eles podem promover a transformação de moléculas persistentes em compostos menos tóxicos e complexos, por meio de uma degradação parcial, ou produzir compostos químicos simples, como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e NH<sub>3</sub>, através da mineralização da molécula orgânica (Megharaj et al., 2011; Jacques et al., 2010; Das & Chandran, 2010; Gaylarde et al., 2005; Moreira & Siqueira, 2006).

Em comparação a outros organismos vivos capazes de degradar poluentes orgânicos, os micro-organismos são os agentes preferenciais para desempenhar a função de restauradores da qualidade ambiental, devido a alguns aspectos principais. Dentre eles estão sua natureza ubíqua, sua ampla diversidade genética e catalítica e capacidade de atuação sob condições ambientais extremas (Megharaj et al., 2011). Além disso, podem apresentar estratégias de adaptação à presença dos contaminantes, como alteração da permeabilidade celular (Carvalho et al., 2009), produção de biossurfactantes (Chrzanowski et al., 2012) e ativação de bombas de efluxo para reduzir a concentração intracelular de compostos tóxicos (Van Hamme et al., 2003). Essas características têm levado à busca pelo entendimento pleno de suas rotas bioquímicas de degradação, caracterização genética e ao

desenvolvimento de metodologias para aplicação desses organismos a campo (Megharaj et al., 2011).

A variedade de compostos poluentes que um sítio pode apresentar implica a presença de uma comunidade degradadora de ampla diversidade catabólica. Assim, quando uma situação de contaminação é simulada em laboratório, a utilização de consórcios microbianos ao invés do uso de culturas puras é mais vantajosa, pois provê essa diversidade metabólica necessária para um tratamento efetivo (Tyagi et al., 2011). Essa perspectiva tem sido confirmada pelos bons resultados obtidos em diversos trabalhos, tanto em solo (Jacques et al., 2007) quanto em meio líquido (Cerqueira et al., 2011). O efeito de interações sinérgicas entre os membros da associação contribui para a completa mineralização dos contaminantes, em que determinado grupo de micro-organismos pode remover metabólitos que são tóxicos a outro grupo ou ainda utilizar produtos de degradação como seu substrato (Mukred et al., 2008).

Como já mencionado para tratamentos convencionais, a biorremediação também pode ser realizada *in situ* ou *ex situ*. Dentre as duas possibilidades, a biorremediação *in situ* é o procedimento que oferece os menores custos de execução e manutenção e os mais baixos riscos de exposição aos poluentes. Além disso, é o método que promove a restauração das funções ecológicas do ambiente em maior grau por causar um distúrbio menos expressivo durante a fase de tratamento (Jorgensen, 2007). No entanto, cada uma das abordagens possui vantagens e desvantagens que devem ser ponderadas a cada nova situação.

As estratégias de biorremediação podem ser classificadas, de modo geral, em atenuação natural, bioestimulação e bioaumentação. A escolha pela opção mais apropriada é determinada por diversos fatores, tais como as condições do meio, a estrutura da comunidade microbiana residente e o tipo, quantidade e toxicidade do composto químico presente (Megharaj et al., 2011). Ainda que possuam conceitos gerais, a seguir detalhados, essas abordagens podem variar em alguns aspectos. A utilização da biestimulação em associação à bioaumentação e a inoculação sucessiva de micro-organismos degradadores em ambientes bioaumentados estão dentre eles. O emprego de plantas no processo (fitorremediação) também vem sendo estudado (Tang et al., 2010).

**Atenuação natural:** a estratégia é dependente de processos naturais de degradação, dentre os quais a biodegradação. Durante a atenuação natural (bioatenuação), os poluentes são transformados em substâncias menos nocivas ou são imobilizados. Esses processos de transformação e imobilização se devem em grande parte à biodegradação microbiana, mas, em alguma extensão, também a reações químicas e a processos de sorção que ocorrem naturalmente no meio edáfico. A atenuação natural é um método aceito para tratamento de meios impactados por combustíveis (Atteia & Guillot, 2007; Silva et al., 2009). No entanto, a aplicação isolada da bioatenuação se torna inadequada e prolongada em muitos casos, pois grande parte dos solos são originalmente oligotróficos e desprovidos de uma população microbiana degradadora em magnitude satisfatória (Megharaj et al., 2011).

**Bioestimulação:** envolve o estímulo intencional da microbiota intrínseca pela correção de parâmetros físico-químicos do meio, pois a aceleração da atividade microbiana de degradação depende, em grande parte, da presença de fonte de carbono disponível, nutrientes em proporções adequadas e temperatura, pH, umidade, aeração e potencial redox apropriados. Os ajustes nesses parâmetros não obedecem a uma fórmula geral, devendo ser conduzidos de acordo com a combinação sítio/polvente existente (Das & Chandran, 2010).

Segundo Paliwal et al. (2012), o componente nutricional de um local poluído determina a eficiência da biorremediação. A disponibilidade de fósforo e nitrogênio é fator limitante do processo, pois os elementos estão relacionados à formação de constituintes celulares básicos, como ácidos nucleicos, moléculas energéticas (ATP) e proteínas. Considerando o desbalanço que uma fonte de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo pode causar na relação C:N:P natural do solo, a proporção entre esses elementos deve ser reconduzida ao equilíbrio através da adição de fontes de nutrientes adequadas e em quantidades tais que evitem uma super-dosagem (Peltola et al., 2006; Kauppi et al., 2011). Dessa forma, o uso eficiente do carbono disponível pode ser viabilizado e níveis eficientes de biodegradação atingidos (Tyagi et al., 2011; Kauppi et al., 2011).

**Bioaugmentação:** a bioaugmentação envolve o incremento da capacidade degradadora do meio impactado, através da incorporação de linhagens puras ou consorciadas, pré-adaptadas ao contaminante; introdução de micro-organismos geneticamente modificados; utilização de enzimas livres;

ou adição de vetores gênicos (El Fantroussi & Agathos, 2005; Scott et al., 2010). Em geral, a bioaugmentação é indicada para eliminar contaminantes em locais onde a microbiota indígena degradadora inexistente ou é inexpressiva. O inoculado contém micro-organismos pré-selecionados, de caráter autóctone ou alóctone, com comprovada capacidade de degradação e competição, capazes de metabolizar compostos específicos (Lin et al., 2010; Zanaroli et al., 2010; Bento et al., 2003; Silva et al., 2009).

No entanto, a efetividade da estratégia de bioaugmentação é questionada (Ruberto et al., 2010) e um de seus desafios é manter a viabilidade dos micro-organismos introduzidos ao longo de todo o tratamento. O estresse ao qual o inóculo, produzido sob condições ótimas, é submetido ao entrar em contato com a complexidade do habitat natural é apontado como um dos fatores responsáveis por eventuais insucessos (Tyagi et al., 2011). Por esse motivo, alternativas, como a utilização de carreadores para imobilização do consórcio microbiano têm sido testadas (Xu & Lu, 2010; Lawniczak et al., 2011). Essa ferramenta aumentaria não só sua longevidade, mas também permitiria a reutilização do inóculo.

A competição que pode ocorrer entre a população indígena e a introduzida também contribui para resultados inefetivos no emprego da estratégia (Goldstein et al., 1985; Ruberto et al., 2010). A remoção do contaminante não é completa, muitas vezes, 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., 2011b; Tahhan et al., 2011). A inoculação sucessiva de micro-organismos (bioaugmentação sucessiva), a

ocorrer em estágios diferentes do tratamento, poderia aumentar a eficiência do processo, uma vez que garantiria a presença da população degradadora em concentração adequada até o fim da biorremediação. A estratégia já foi testada com êxito em alguns estudos (Lebkowska et al., 2011; Tahhan et al., 2011).

### **2.7 Fatores bióticos e abióticos que afetam a biorremediação**

As condições bióticas e abióticas do meio são de fundamental importância para o sucesso da biorremediação (Jacques et al., 2010). Limitações oferecidas pelo substrato e por fatores geológicos, climatológicos e ecológicos afetam a eficiência do processo (Van Hamme et al., 2003). Bento et al. (2005) reiteraram a necessidade de estudos sítio-específicos detalhados em tratamentos de biorremediação, uma vez que verificaram em seus estudos que as propriedades do solo e a população indígena afetam diretamente a biodegradação.

Os habitats naturais são conhecidos por conterem grande número de micro-organismos indígenas capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo, inclusive a despeito de não apresentarem histórico de contaminação (Gogoi et al., 2003; Tahhan et al., 2011). A identificação de micro-organismos com capacidade de degradar contaminantes é o principal fator biótico que deve ser considerado em uma avaliação preliminar no estudo da biorremediação (Das & Chandran, 2010), determinando a estratégia a se aplicar. No entanto, além do tamanho da população microbiana degradadora, alguns estudos

apontam que a proporção entre o inóculo degradador e a população residente também exerce efeito sobre o processo (Ruberto et al., 2010).

Dentre os fatores abióticos que influenciam as taxas de biodegradação, pode-se citar os parâmetros de umidade, temperatura, concentração de nutrientes e de oxigênio, granulometria do solo e salinidade da água como os de maior relevância (Fountoulakis et al., 2009). Em faixas e teores adequados eles podem garantir o bom desempenho da microbiota, por oferecerem meios para seu estabelecimento e crescimento, ou, se fora de padrões apropriados, podem inviabilizar o processo de biorremediação sob condições naturais (Tyagi et al., 2011).

Para Antizar-Ladislao (2010) o processo de remediação biológica depende do potencial degradador da comunidade microbiana, cuja atuação está vinculada à acessibilidade e biodisponibilidade do contaminante. A associação do composto tóxico à matéria orgânica do solo, pela combinação de processos químicos e físicos, como adsorção e precipitação, ou a resistência que o meio oferece ao transporte dos poluentes até os microorganismos degradadores poderiam resultar na diminuição de formas livres e acessíveis do contaminante. Nesse sentido, uma alternativa cada vez mais explorada é a aplicação de surfactantes ao sítio impactado. Essas moléculas anfipáticas aumentam a dessorção dos compostos poluentes associados à partículas do solo, disponibilizando-os à biodegradação (Laha et al., 2009).

A seguir, um quadro-resumo (Tabela 3) destaca alguns dos principais fatores bióticos e abióticos relacionados à biodegradação microbiana de compostos poluentes e seu efeito no processo de biorremediação.

**Tabela 3.** Fatores que afetam a biorremediação de contaminantes orgânicos em meios naturais impactados (adaptado de Megharaj et al., 2011).

<b>Fator</b>	<b>Efeito</b>
Conteúdo de água	Transporte de poluentes e de produtos de degradação
Temperatura	Composição da comunidade e velocidade de degradação (poluentes persistem mais tempo no meio, sob baixas temperaturas)
pH	A atividade máxima de micro-organismos e de enzimas é pH-depende
Potencial redox	Concentração e proporção entre doadores e receptores de elétrons determina rota e eficiência de degradação
Solubilidade, volatilidade, tamanho da partícula	Biodisponibilidade do poluente
Matéria orgânica	Degradação e a sorção dos compostos
Nutrientes	Crescimento e reprodução dos micro-organismos
Co-substratos	Possibilitam a transformação co-metabólica dos contaminantes
Co-contaminantes	Influenciam a biodisponibilidade da fonte de carbono e aumentam/inibem a biodegradação
Comunidade microbiana	Membros com capacidade metabólica de degradação determinam a taxa de remediação

## **2.8 Rotas metabólicas de degradação de hidrocarbonetos e de ésteres**

O potencial de degradação de poluentes orgânicos varia entre os grupos microbianos e é dose-dependente. Componentes inibitórios ou tóxicos podem atenuar o potencial de degradação dos micro-organismos, consistindo em fatores de estresse aos mesmos. Providencialmente, diversas bactérias desenvolvem mecanismos de resistência a essas substâncias, pela transformação isômera de ácidos graxos, aumento da síntese de fosfolipídios, diminuição da hidrofobicidade celular (modificação de lipopolissacarídeos ou

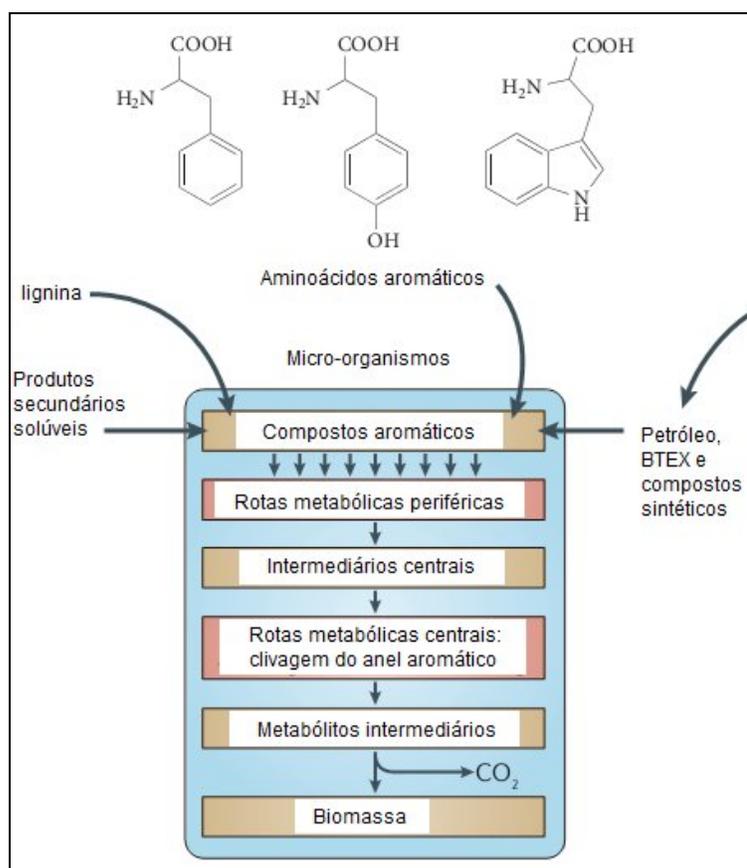
porinas presentes na membrana externa), e ativação de bombas de efluxo (Megharaj et al., 2011). No entanto, diversos gêneros microbianos apresentam capacidade não só de tolerância aos contaminantes, mas também são capazes de fazerem uso dos mesmos como fonte de carbono e energia.

O sistema metabólico que tem se mostrado mais eficiente na biodegradação de moléculas xenobióticas recalcitrantes é o microbiano (Gaylarde et al., 2005; Mnif et al., 2011). Constituem exemplos taxonômicos de micro-organismos degradadores de combustíveis as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Sphingobacterium*, *Achromobacter*, *Klebsiella*, *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Paecilomyces*, os fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Pleurotus*, e as algas dos gêneros *Cladophora* e *Chlamydomonas*.

A via mais rápida e completa de degradação de poluentes orgânicos ocorre sob condições aeróbias (Das & Chandran, 2010). Essas rotas metabólicas envolvem a ação de oxigenases, um amplo grupo de enzimas denominadas oxidoredutases que catalisam reações de transferência de elétrons entre moléculas (Pazmiño et al., 2010). Existem duas categorias principais dessa classe de enzimas: as mono-oxigenases, que incorporam um átomo de O<sub>2</sub> ao seu substrato, e as dioxigenases, que incorporam dois átomos de O<sub>2</sub> ao substrato.

Os compostos aromáticos são abundantes e estruturalmente diversos na natureza (Figura 2). Eles podem ser encontrados em todos os organismos vivos na forma de três aminoácidos (fenilalanina, tirosina e

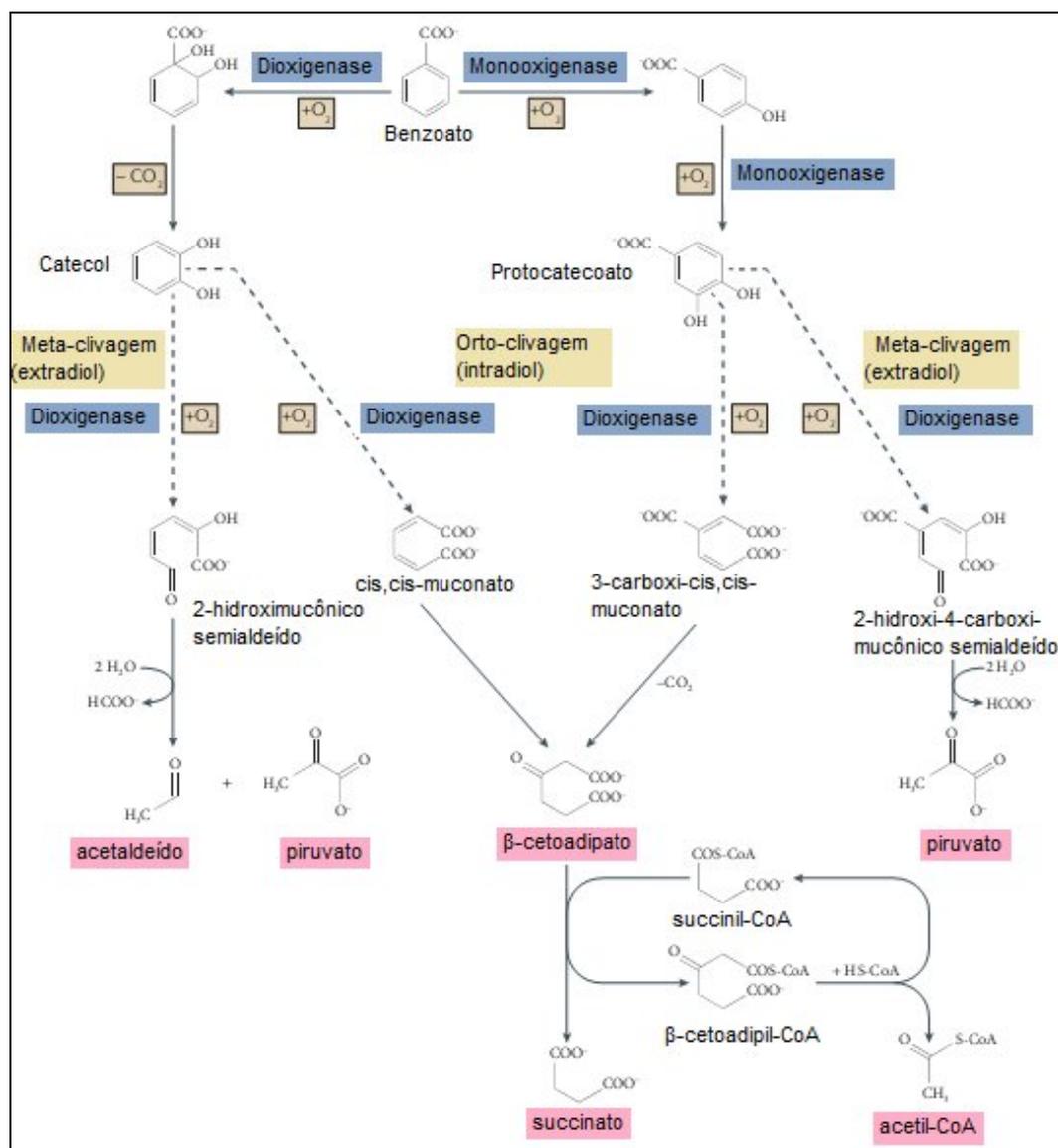
triptofano), podendo representar cerca de um quarto da biomassa das plantas terrestres. No entanto, embora as plantas sejam suas produtoras majoritárias, são as bactérias aeróbias e anaeróbias e os fungos aeróbios que possuem rotas metabólicas de degradação dessas substâncias, presentes em diversos combustíveis derivados do petróleo (Fuchs et al., 2011).



**Figura 2.** Esquema-geral da rota de degradação microbiana para compostos aromáticos, provenientes de diversas fontes (Fuchs et al., 2011).

Os compostos aromáticos apresentam baixa reatividade devido à estabilidade química conferida pelo anel aromático (fenômeno da ressonância). Após o ataque inicial pelos micro-organismos, comumente via enzimas mono-

oxigenases, formam-se compostos intermediários centrais como o catecol (em bactérias) e o protocatecol (na maioria dos fungos e em algumas bactérias). Essa degradação periférica do composto é seguida pela clivagem do anel aromático, catalisada por dioxigenases, que podem atuar tanto na posição *orto* (entre dois grupos hidroxil) quanto na posição *meta* (adjacente a grupos hidroxil). De acordo com sua atuação, são denominadas respectivamente de intradiol e extradiol dioxigenases, representadas pela 1,2-catecol dioxigenases, 3,4-catecol dioxigenases e 2,3-catecol dioxigenases. Segue-se então através de uma rota de degradação central que irá gerar como produtos finais acetil-CoA, succinato ou piruvato, que poderão ser utilizados para o crescimento microbiano (Figura 3). Em ambientes anaeróbios, ao invés da oxidação do composto aromático, ocorre sua redução. Em se tratando de hidrocarbonetos aromáticos, a via de degradação anaeróbia pode apresentar três rotas alternativas: adição de fumarato (tolueno), hidroxilação  $O_2$ -independente (etilbenzeno, propilbenzeno) e carboxilação (benzeno, naftaleno) (Fuchs et al., 2011).



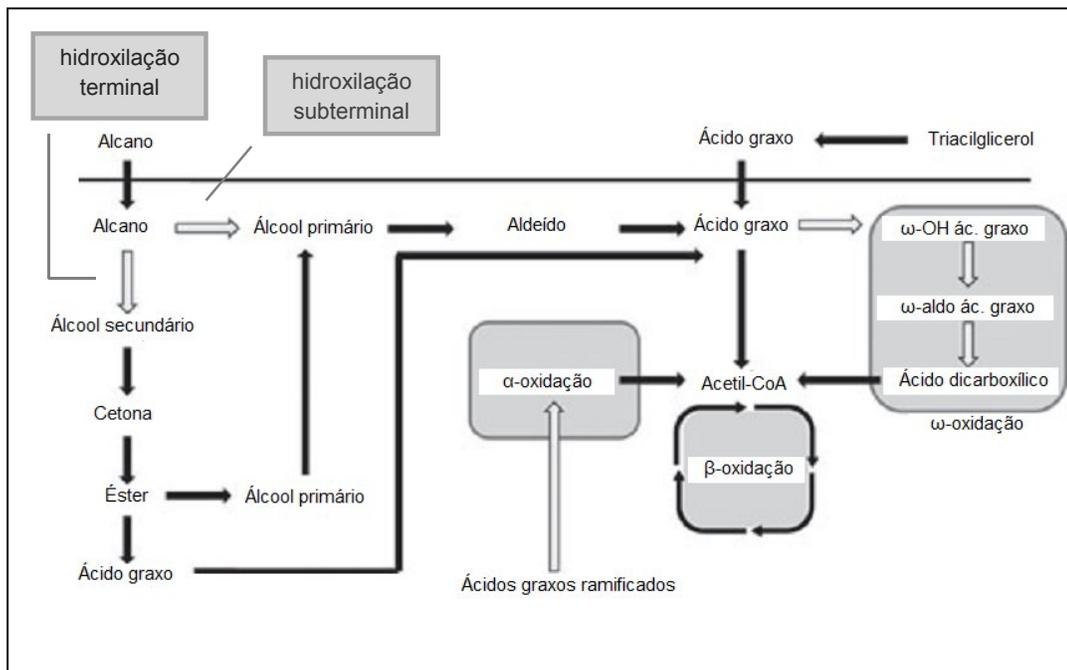
**Figura 3.** Representação da rota de degradação aeróbica do benzoato por fungos e bactérias (Fuchs et al., 2011).

A degradação de compostos alcanos também prescinde da ativação dessas moléculas para ocorrer. Isso acontece através da adição de um  $C_1$  ( $CO_2$ ) ou de  $C_4$  (fumarato), em condições anaeróbicas, ou pela incorporação de um átomo de  $O_2$ , em ambientes óxicos. As enzimas alcano mono-oxigenases

catalisam o primeiro passo na degradação aeróbia de n-alcenos, os constituintes majoritários de derivados de petróleo (Hamamura et al., 2008).

As alceno mono-oxigenases compõem uma vasta classe de enzimas relacionadas à degradação de moléculas endógenas e de xenobióticos. A maior parte delas catalisa reações de hidroxilação (incorporação de um átomo de  $O_2$  ao substrato) e tem os ácidos graxos e os alcenos como alvos de ação, já que suas rotas catabólicas estão inerentemente acopladas. Essas enzimas diferem entre si na posição de hidroxilação, que pode ocorrer próximo ao grupo carboxil, gerando ácidos graxos  $\alpha$ - ou  $\beta$ -hidroxilados, no interior da molécula ou nas porções terminal ou subterminal da cadeia (Van Bogaert et al., 2011).

Conforme van Beilen & Funhoff (2007), as alceno hidroxilases podem ainda ser divididas em diversos grupos de acordo com seu substrato de ação, como por exemplo, as AH1, que oxidam as cadeias curtas e médias de alcenos, e as AH2, que reúne a maioria das enzimas AlkB, e agem na oxidação de compostos de cadeias longas. Como muitos dos micro-organismos degradadores são capazes de consumir uma vasta diversidade de alcenos, é comum que eles possuam múltiplas alceno hidroxilases. Existem também sistemas de amplo espectro de ação, competentes para agir sobre diversos substratos. A via de degradação simplificada desses compostos está esquematizada na Figura 4.



**Figura 4.** Rota metabólica de assimilação de alcanos e de ácidos graxos. O envolvimento de enzimas mono-oxigenases está representado pelas setas cinza vazadas (Van Bogaert et al., 2011).

Os genes que codificam para alcano hidroxilases estão amplamente distribuídos tanto em bactérias gram-positivas quanto em gram-negativas, dentre as quais os gêneros mais comumente citados são *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Mycobacterium* spp. e *Rhodococcus* spp. (Panicker et al., 2010). O mecanismo mais bem estudado de metabolização de alcanos é o que foi primeiramente descrito para *P. putida* GPo1. Nesse caso, o processo inicia com a oxidação do grupo metil pelo sistema alcano hidroxilase, composto por uma mono-oxigenase de membrana, a alcano hidroxilase *per se*, codificada pelo gene *alkB*. O sistema é integrado ainda por uma cadeia de transportadores de elétrons, formada por duas rubredoxinas e por uma

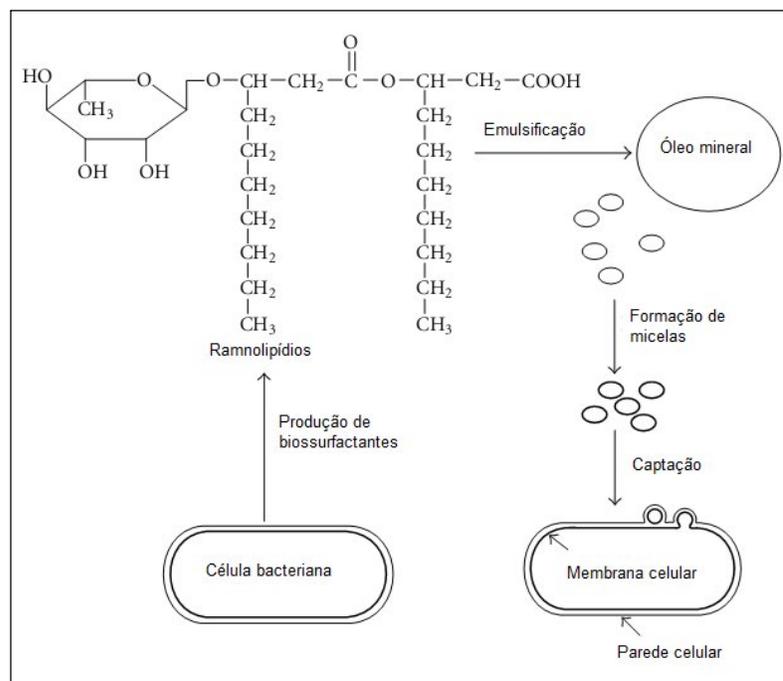
rubredoxina redutase NADH-dependente, codificadas pelos genes *alkG*, *alkF* e *alkT*, respectivamente (Belhaj et al., 2002). Atualmente, já se tem conhecimento da existência de uma ampla diversidade de sistemas alceno hidroxilase (van Beilen et al., 2003). Um deles está relacionado ao complexo de enzimas do citocromo P450, que está presente em todos os organismos eucarióticos e em um número substancial de procaríotos (Van Bogaert et al., 2011).

Uma provável rota de degradação do biodiesel, considerando sua origem lipídica, constituiria a ação inicial de uma esterase ou lipase, com capacidade potencial para hidrólise das ligações éster do substrato, produzindo um ácido graxo e um álcool. O produto preliminar de ácido graxo com longa cadeia entraria na via de  $\beta$ -oxidação, que promoveria o encurtamento da molécula pela liberação sucessiva de acetil-CoA, até a completa degradação do ácido (Zhang et al., 1998).

A literatura traz diversos estudos que relatam alterações na cinética de degradação quando biodiesel é adicionado ao diesel (Mariano et al., 2008a; Owsianiak et al., 2009). De acordo com estudos de DeMello et al. (2007), o grau de biodegradabilidade das misturas de diesel/biodiesel pode variar, uma vez que a presença de metil-ésteres de ácidos graxos, componentes do biodiesel, pode retardar o início da biodegradação de alguns compostos do diesel fóssil, apesar de constituírem, juntamente com n-alcenos, as frações prontamente biodegradáveis.

Devido ao caráter hidrofóbico dos hidrocarbonetos, além do aparato enzimático de degradação, os micro-organismos precisam desenvolver

adaptações específicas que os habilitem a utilizar esses substratos insolúveis. Um dos mecanismos possíveis é a captação intracelular do hidrocarboneto na forma de micelas, envolvendo a produção de moléculas biológicas surfactantes (Figura 5). Esses compostos agem como emulsificantes, diminuindo a tensão superficial e formando diminutas gotículas, que permitem a internalização do poluente a ser metabolizado (Das & Chandran, 2010). A produção desses compostos por muitos dos micro-organismos degradadores não é constitutiva (Bento, 2001), o que indica que a exposição ao contaminante resulta na ativação de genes específicos, envolvidos na biodegradação do composto alvo.



**Figura 5.** Envolvimento de biosurfactantes produzidos por *Pseudomonas sp* na captação intracelular de hidrocarbonetos (Das & Chandran, 2010).

Biosurfactantes e bioemulsificantes são produzidos por uma ampla variedade de micro-organismos, podendo apresentar diferentes propriedades e

estruturas químicas. Podem estar localizados extra ou intracelularmente e agir no aumento da área de contato entre a fonte de carbono e a célula microbiana, através de modificações na superfície celular, ou atuar sobre os hidrocarbonetos hidrofóbicos, de baixa solubilidade, aumentando sua disponibilidade ao ataque dos micro-organismos (Chrzanowski et al., 2012). Em geral, podem ser moléculas de baixa massa molecular, tais como glicolipídeos e lipopeptídeos, que reduzem eficientemente tanto a tensão superficial quanto interfacial entre substâncias imiscíveis, ou polímeros de alta massa molecular, como biodispersantes, que atuam comumente como agentes emulsificantes, responsáveis pela formação de gotículas e estabilidade da emulsão (Calvo et al., 2008; Meyer, 2011).

A diversidade desses compostos desperta o interesse em sua utilização em diferentes áreas, como agricultura e indústrias têxtil, alimentícia, farmacêutica e cosmética. Recentemente sua aplicação vem sendo explorada também em tratamentos de biorremediação, em áreas contaminadas por derivados de petróleo, por contribuírem para o aumento da biodisponibilidade desses compostos poluentes à ação microbiana (Tyagi et al., 2011; Chrzanowski et al., 2012).

## **2.9 Avaliação da dinâmica da comunidade microbiana em ambientes contaminados**

A existência de enorme e desconhecida diversidade de micro-organismos não cultiváveis em amostras ambientais tem encorajado o desenvolvimento de novas metodologias para seu estudo. Estima-se que 1g de

solo contenha em torno de mil diferentes gêneros bacterianos, mas somente cerca de 1% dessa população seria passível de cultivo a partir das práticas laboratoriais clássicas (Malik et al., 2008). Para superar essa limitação, técnicas vinculadas à análise molecular da microbiota vêm sendo incorporadas a grande parte dos trabalhos desenvolvidos na área de biorremediação, para verificação da composição filogenética ou da presença de genes funcionais na comunidade.

Abordagens baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são pertinentes para acessar a diversidade gênica em uma amostra ambiental. Após a extração e purificação do DNA, *primers* universais ou específicos viabilizam a amplificação de regiões alvo do ácido nucléico. O produto gerado pode ser submetido a diversos mecanismos de separação de acordo com o objetivo do ensaio.

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) foi originalmente desenvolvida para detectar mutações em sequências de DNA (Kirk et al., 2004). Atualmente vem sendo utilizada para caracterização das estruturas e dinâmicas populacionais em estudos de biorremediação. O princípio da técnica está baseado na utilização de fragmentos do gene 16S rRNA amplificados a partir de *primers* universais. É imprescindível que um dos *primers* do par utilizado possua um grampo GC, de 35-40 pares de bases (pb), para garantir que o ácido nucléico mantenha pelo menos uma parte de sua estrutura em forma de fita dupla quando passar pelo gradiente desnaturante. A separação dos amplicons, de tamanhos iguais, mas com composição de bases diferentes, resulta em um perfil de bandas e está baseada na maior

estabilidade do pareamento GC em relação ao AT. Dessa forma, fragmentos de DNA com maior conteúdo GC migrariam mais facilmente através do gradiente desnaturante, ao passo que os com mais pareamentos AT tenderiam a ter suas fitas abertas, diminuindo sua mobilidade (Kirk et al., 2004).

Dentre as principais vantagens da técnica está o acompanhamento espacial e temporal das mudanças estruturais da microbiota e o provimento de uma visão simples e objetiva das espécies dominantes que compõem a amostra ambiental. Como limitações pode-se citar a existência de espécies com múltiplas cópias de rRNA com sequências heterogêneas (uma banda não necessariamente representaria uma espécie) e a migração semelhante que amplicons com sequências diferentes podem apresentar (Malik et al., 2008). Ainda assim, o perfil de bandas gerado pelo DGGE pode ser utilizado em estudos de diversidade, visando ao estabelecimento de graus de similaridades entre as populações de diferentes tratamentos (Ciric et al., 2010; Tang et al. 2010; Thangarajan et al. 2011).

Alguns estudos em metagenômica tem investigado a relação entre a quantificação de genes funcionais e o potencial biodegradador de ecossistemas impactados (Salminen et al., 2008), através da identificação de genes que codificam alceno hidroxilases (*alkB*), naftaleno dioxigenases (*ndoB*), catecol 2,3-dioxigenases (*C23DO*), tolueno dioxigenases (*todC1*), xileno mono-oxigenases (*xyIM*) e bifenil dioxigenases (*bphA1*) (Higashioka et al., 2009; Panicker et al., 2010; Tuan et al., 2011). Apesar de a utilização de genes funcionais como marcadores ambientais da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo encontrar divergências na literatura, a identificação de genes

envolvidos na degradação de compostos orgânicos em culturas puras é importante, pois informa sobre a genética da rota catabólica dos micro-organismos (Paisse et al., 2011; Salminen et al. 2008; Mehdi & Giti 2008).

O perfil fisiológico da biota também representa um importante parâmetro a ser estudado, podendo ser retratado através da utilização de metodologias baseadas no cultivo de micro-organismos (Kirk et al., 2004; Ellis et al. 2003). O Número Mais Provável (NMP) tem sido utilizado para estimar a população heterotrófica e degradadora de amostras ambientais (Viñas et al., 2002; Lors et al., 2010; Cerqueira et al., 2011), assim como contagens de Unidades Formadoras de Colônias tem sido empregadas no acompanhamento da taxa de crescimento microbiano em estudos de biodegradação (Rahman et al., 2003; Schleicher et al., 2009). A estimativa do NMP em placas de poliestireno de 96 poços apresenta a vantagem de constituir uma metodologia rápida, econômica, além de eficaz. A determinação da produção de proteínas totais também apresenta essas qualificações, prestando-se eficientemente ao monitoramento do crescimento populacional, tanto em ensaios em meio líquido quanto em solo (Rahman et al., 2003; Meyer, 2011; Cerqueira, 2011).

### **2.10 Monitoramento da degradação de compostos orgânicos poluentes**

Entre os métodos de análise de degradação de hidrocarbonetos, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua eficiência em efetuar a separação, a identificação e a quantificação das espécies químicas. Pode ser empregada em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como,

por exemplo, quando colunas cromatográficas são diretamente acopladas a detectores de ultravioleta, infravermelho e à espectrofotometria de massa. Esta técnica tem sido utilizada para a determinação das frações de hidrocarbonetos que são consumidas pelos micro-organismos durante o seu crescimento em combustíveis (DeMello et al., 2007; Molina-Barahona et al., 2004; Owsianiak et al., 2009).

Mais recentemente, a espectroscopia na região do infravermelho vem sendo explorada em estudos de biorremediação (Liao et al., 2009; Wang et al., 2010). A espectroscopia no infravermelho mede a transição entre estados vibracionais que ocorrem quando uma molécula absorve energia na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Trata-se de uma metodologia simples, rápida, de baixo custo e que pode ser utilizada para quantificar misturas biodiesel:diesel (Guariero et al., 2008). Como estes combustíveis apresentam funções químicas distintas, seus espectros de infravermelho contêm bandas inequivocadamente diferenciadas. Os diferentes grupos funcionais e os seus tipos de ligações apresentam frequências e intensidades de absorção distintas no infravermelho (Silverstein & Webster, 1998). Os relatos sobre o uso da técnica para avaliar a adulteração de óleos vegetais são extensos na literatura (Ozen & Mauer, 2002; Fernandes et al., 2011; Dorado et al., 2011). No entanto, considerando suas características e aplicabilidade, pode-se afirmar que a técnica possui potencial uso na avaliação da degradação de misturas binárias diesel:biodiesel.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta das amostras**

A amostra de solo contaminado utilizada para a bioprospecção (localização, avaliação e exploração) de bactérias foi coletada de um posto de abastecimento de combustíveis com histórico de derramamento de óleo diesel e de biodiesel, localizado na Zona Sul do município de Porto Alegre. A coleta foi feita durante o procedimento de substituição dos tanques de armazenamento do estabelecimento e contou com o auxílio de retroescavadeira. A área amostrada estava acerca de 4m de profundidade, localizada sob os antigos tanques removidos.

A amostra, com cerca de 2kg, foi transportada em sacos plásticos até o Laboratório de Biorremediação do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia (UFRGS), onde foi mantida sob refrigeração (4°C), por 48h, até o início do processo de isolamento. Na Tabela 4, consta a caracterização físico-química do solo bioprospectado, realizada pelo Laboratório de Análises de Solo da UFRGS.

**Tabela 4.** Análise físico-química do solo contaminado amostrado.

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultado</b>
argila	28%
matéria orgânica	0,9%
pH	7,2
índice SMP	7,3
C orgânico	0,5%
N	0,046%
P	17 mg/dm <sup>3</sup>
K	209 mg/dm <sup>3</sup>
CTC	10,4 cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>
S	12 mg/dm <sup>3</sup>
Al <sub>troc.</sub>	0,0 cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>
Ca <sub>troc.</sub>	6,2 cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>
Mg <sub>troc.</sub>	2,7 cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>
Al+H	1,0 cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>
Ca/Mg	2,3
Ca/K	12
Mg/K	5
Zn	17 mg/dm <sup>3</sup>
Cu	3,2 mg/dm <sup>3</sup>
B	0,9 mg/dm <sup>3</sup>
Mn	12 mg/dm <sup>3</sup>
HTP	1984 mg/kg solo

CTC: Capacidade de Troca Catiônica; HTP: Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

### 3.2 Combustíveis

#### 3.2.1 Óleo diesel metropolitano

O volume de 3L de óleo diesel metropolitano (B0) com 50 ppm de enxofre foi obtido diretamente da empresa Ipiranga Produtos de Petróleo S.A..

#### 3.2.2 Biodiesel

O volume de 2L de biodiesel (B100), produzido a partir de óleo de soja, foi obtido diretamente da empresa Ipiranga Produtos de Petróleo S.A..

### **3.2.3 Preparação da mistura B10**

A partir dos combustíveis B0 e B100 obtidos, foi preparada, em laboratório, a mistura de diesel/biodiesel 10% (B10). Sua esterilização foi realizada por filtração a vácuo, em frasco *kitassato* esterilizado, com filtro adaptado para colocação de membranas filtrantes, de porosidade de 0,22 $\mu$ m. O armazenamento do combustível, após a filtração, deu-se à temperatura ambiente, em frascos de vidro, envoltos por papel alumínio, a fim de evitar a foto-oxidação da mistura.

### **3.3 Enriquecimento, isolamento e seleção de micro-organismos**

A técnica de isolamento das bactérias foi realizada conforme proposto por Bento et al. (2005). Em frascos de Erlenmeyer, foram inoculados 10g de amostra de solo contaminado e 1% de B0, B10 ou B100 em um volume final de 100mL de meio mineral mínimo - MM1 (Richard & Vogel, 1999). A seleção dos micro-organismos degradadores de diesel/biodiesel é baseada no processo de três transferências, que ocorrem durante três semanas, como uma forma de pressionar seletivamente as bactérias potencialmente capazes de crescer somente às expensas dos combustíveis, como única fonte de carbono fornecida ao sistema. A incubação, em duplicatas, ocorreu sob agitação orbital de 190 rotações por minuto (r.p.m.), em temperatura de 30°C. A cada sete dias, uma alíquota de 10mL da cultura crescida foi transferida para outro frasco contendo o mesmo meio mineral estéril e 1% de combustível.

Transcorridos 21 dias, a cultura crescida passou por diluições seriadas em solução salina (0,85%), com inoculação de 100 $\mu$ L das maiores

diluições em meio enriquecido (*Plate Count Agar* - PCA). As placas foram incubadas a 30°C por 24h. Colônias isoladas de bactérias que apresentaram diferenças morfológicas visuais, tais como aspecto, tamanho, coloração, forma e borda foram purificadas e armazenadas congeladas (-20°C) em microtubos com meio contendo 10% de glicerol. Nessa etapa, os isolados foram também caracterizados pela morfologia celular e coloração de Gram e produção qualitativa de lipase e de esterase.

### **3.4 Preparo do pré-inóculo**

Os micro-organismos isolados e purificados foram transferidos da cultura estoque para frascos Erlenmeyer. A incubação deu-se em meio Caldo Nutriente (20mL) por 24h a 30°C, sob 190 r.p.m. de agitação. As células foram, então, centrifugadas a 9000 r.p.m., por 10min. com duas lavagens sequenciais, em 20mL com solução salina (0,85%) para remoção total do excesso do meio nutritivo. Posteriormente, o extrato celular foi homogeneizado a 20mL de solução salina (0,85%) e incubado a 30°C por 24h sob 190 r.p.m. de agitação. Esse procedimento foi realizado com o objetivo de promover o esgotamento das reservas energéticas celulares dos micro-organismos testados, antes que eles fossem submetidos ao teste preliminar de biodegradação de diesel/biodiesel, para evitar a indução a erros de avaliação (falsos positivos).

A padronização da concentração celular dos isolados utilizada nos ensaios descritos a seguir foi realizada pela determinação da densidade ótica em espectrofotômetro, ajustado em comprimento de onda de 600nm (os valores variaram de 0,1 a 0,4).

### **3.5 Avaliação preliminar do potencial degradador de B0, B10 e B100 pelos isolados bacterianos com indicador-redox**

O princípio da técnica está baseado na redução do indicador redox cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a trifenil formazan (TPF). O fluxo de elétrons é proveniente da oxidação microbiana da fonte de carbono fornecida, e a interpretação dos resultados é feita a partir da visualização da mudança de coloração do meio. O teste possibilita prever a capacidade biodegradadora dos combustíveis pelos isolados, pois um resultado positivo para mudança de coloração indica a ação do aceptor artificial de elétrons (TTC) na cadeia transportadora, informando a respeito da oxidação dos combustíveis adicionados ao meio.

O ensaio preliminar para avaliação do potencial biodegradador foi realizado através da inoculação individual, em triplicata, de cada um dos isolados em 240µL de meio MM1 contendo o indicador redox TTC, 10µL do micro-organismo de interesse, sob concentração de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, e 10µL da concentração do combustível a ser testado, como única fonte de carbono disponível (B0, B10 e B100). O sistema foi montado em placas de poliestireno de 96 poços, protegidas da ação oxidante da luz por papel laminado e incubadas pelo período de 14 dias em temperatura de 30°C. Foi definido como critério de seleção o período máximo de 48h para viragem, sendo escolhidas as bactérias que apresentassem resultado positivo de degradação para pelo menos dois dos três combustíveis testados. Buscou-se dessa forma, compor consórcios microbianos a partir de isolados com potencialidades metabólicas diversas, capazes de degradar combustíveis de diferentes composições. 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 redox.

### **3.6 Identificação molecular dos micro-organismos**

A identificação dos micro-organismos selecionados pelo teste descrito no item 3.5 foi realizada através da amplificação e sequenciamento de um fragmento de DNA que codifica o gene 16S rRNA. Os isolados foram submetidos à amplificação, a partir do DNA genômico, do gene 16S rRNA por PCR, utilizando os *primers* F-C27 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e R-530 (5'-CCG CGG CTG CTG GCA CGT A-3') (Gontang et al., 2007).

As reações foram otimizadas em 25µL de água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore) e continham 2mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 2,5pmol de cada *primer* (IDT), 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1x de tampão (Invitrogen) e 300µM de desoxinucleotídeos (ABgene).

As reações foram amplificadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C; seguido por 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C e 45 segundos a 72°C; e 5 min a 72°C. O produto de PCR esperado de 530pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1%).

### **3.7 Caracterização dos micro-organismos selecionados**

#### **3.7.1 Análise da produção de biossurfactantes pelas culturas puras**

A avaliação da medida de tensão superficial (TS) foi utilizada como parâmetro investigativo para detecção da produção de biossurfactantes. Para tanto, os isolados foram individualmente inoculados, a uma concentração de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, em Erlenmeyers devidamente esterilizados, contendo meio mineral mínimo MM1 (Richard & Vogel, 1999) e 1% de diesel:biodiesel B10. A incubação dos frascos deu-se sob agitação orbital de 190 r.p.m. a 30°C durante o período de 14 dias. As análises foram realizadas ao tempo zero e ao 14º dia do ensaio.

A tensão superficial foi avaliada na ausência de células microbianas, removidas por centrifugação a 9000 r.p.m. por 15min. a 15°C. As leituras foram realizadas em triplicatas em um medidor digital de tensão superficial (Gilbertini, Milão, Itália), utilizando o método da placa de Wilhelmy. Como padrão, empregou-se a água destilada (72,1mN.m<sup>-1</sup>).

#### **3.7.2 Identificação do gene *alkB* nos isolados bacterianos**

A identificação de um fragmento de DNA que codifica o gene *alkB* foi realizada a partir do DNA genômico, utilizando os *primers* Pseuse2 (5'-AYGTSCGYGGCCACCATGT-3') e Pseuas2 (5'-CGACGTAGTTGAYGAYYTCC-3') (Heiss-Blanquet et al., 2005). Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada em trabalhos prévios e pertencente à coleção LabBio/UFRGS.

As reações foram otimizadas em 25µL de água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore) e continham 2mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 2,5pmol de cada primer (IDT), 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1x de tampão (Invitrogen) e 300µM de desoxinucleotídeos (ABgene).

As reações foram amplificadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) sob as condições utilizadas por Heiss-Blanquet et al. (2005). O produto de PCR esperado de 312pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1,5%), com marcador molecular de 50pb e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

### **3.8 Ensaio de biodegradação de B10 em meio líquido por 20 diferentes consórcios microbianos**

A seleção do consórcio que foi utilizado nos ensaios de biorremediação de solo foi realizada em duas etapas. Primeiramente, os isolados selecionados no ensaio preliminar de biodegradação formaram 20 diferentes consórcios com três bactérias cada, cujas combinações foram estabelecidas em cálculo de análise combinatória (Anexo 1). As combinações foram denominadas de A a V, tendo sido testada também a atuação dos seis isolados em conjunto. As combinações eleitas pelos critérios estabelecidos passaram para o teste de seleção descrito no item a seguir (3.9).

Os microcosmos foram montados em duplicatas em frascos de vidro com capacidade para 50mL. Os consórcios microbianos foram inoculados em concentração de 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> em meio estéril MM1 com indicador redox (TTC), contendo 5% de B10, em um volume final de 10mL. Esse ensaio em

meio líquido foi desenvolvido na presença de 5% de combustível, a fim de avaliar o desempenho dos consórcios na mesma percentagem de contaminação que viria a ser adicionada ao solo no experimento de biorremediação. A incubação deu-se à temperatura de 30°C, sob agitação (190 r.p.m.) 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 redox.

Para acompanhar o crescimento celular dos consórcios testados, durante o período de 7 dias, os sistemas foram aliqüotados em 100µL a cada 48h. As amostras passaram por diluições decimais seriadas, e a contagem de unidades formadoras de colônias foi realizada a partir da semeadura de 100µL das três maiores diluições realizadas em meio Ágar Nutriente. Os resultados foram avaliados após 24h de incubação a 30°C. Os microcosmos também foram monitorados diariamente para verificação da viragem da coloração do meio, a fim de identificar as combinações mais eficientes na biodegradação da mistura de diesel/biodiesel fornecida.

### **3.9 Ensaio de biodegradação de B10 em meio líquido por 5 diferentes consórcios microbianos**

#### **3.9.1 Condições de cultivo**

A partir da análise dos resultados obtidos no ensaio de biodegradação para seleção dos consórcios mais eficientes, cinco dentre as 20 combinações foram submetidas ao teste de biodegradação de B10 em meio

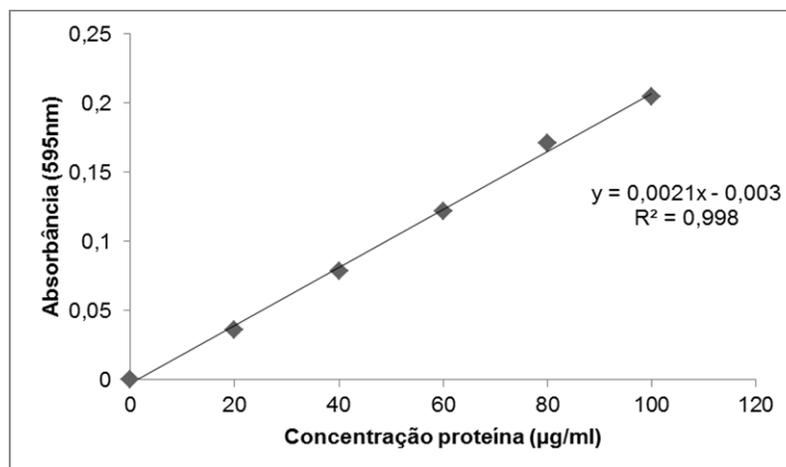
líquido nas concentrações de 10%, 20%, 30% e 40%. O objetivo do ensaio foi avaliar a suscetibilidade dos consórcios eleitos à presença de concentrações crescentes do contaminante, verificando não só as diferentes capacidades degradadoras dos mesmos, mas também o crescimento da população microbiana.

Os microcosmos foram montados em duplicatas em frascos de vidro com capacidade para 50mL. Os inóculos foram adicionados à concentração inicial de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> em meio estéril MM1 com indicador redox (TTC), contendo 10%, 20%, 30% ou 40% de B10, em um volume final de 10mL. A incubação deu-se à temperatura de 30°C, sob agitação (190 r.p.m.) e proteção da ação oxidante da luz.

O crescimento da população microbiana foi acompanhado durante 7 dias, através da estimativa da concentração de proteínas totais (mg.mL<sup>-1</sup>), realizada a cada 48h, de acordo com o método de Bradford (1976). Para a preparação do reagente de proteína, dissolveu-se 100mg de Coomassie Blue BG250 (Merck, Alemanha) em 50mL de etanol 95%. A essa solução, adicionou-se 100mL de ácido fosfórico 85%. A solução final foi diluída com água destilada em volume de 1L e, posteriormente, filtrada. A absorbância foi medida a 595nm em espectrofotômetro. A curva padrão foi construída, tendo como base as seguintes concentrações de Albumina de Soro Bovino (BSA): 20, 40, 60, 80, 100 ug.mL<sup>-1</sup> (Figura 6).

A viabilidade celular também foi monitorada a cada 48h pela inoculação de 20µL da cultura em crescimento em meio enriquecido. Os

resultados, classificados como positivos ou negativos, foram verificados após 24h de incubação das placas a 30°C.



**Figura 6.** Curva padrão elaborada para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976).

### 3.9.2 Estimativa da biodegradação por infravermelho

A biodegradação da fração biodiesel da mistura B10 foi avaliada no tempo final do experimento através de espectroscopia por infravermelho. A preparação das amostras passou pela filtragem do sistema em funil de separação, pois somente a fase oleosa foi encaminhada para análise.

As fases oleosas de cada amostra foram então armazenadas em microtubos de 2mL a 4°C até encaminhamento ao Centro de Combustíveis e Biocombustíveis (CECOM), no Instituto de Química/UFRGS, para processamento. Os espectros de refletância total atenuada no infravermelho médio (ATR/FTIR) foram analisados na faixa de 4.000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 16 varreduras, utilizando um acessório de refletância total atenuada com cristal de seleneto de zinco (ZnSe), acoplado a um espectrofotômetro de infravermelho Perkin Elmer, FT-IR/FT-NIR 400.

Antes de realizar a leitura da primeira amostra, foi realizado o “background” do aparelho, previamente limpo, com seleneto de zinco. Com o auxílio de uma pipeta *pasteur*, a amostra foi então espalhada no cristal, em quantidade de aproximadamente 1mL. A leitura de um espectro dá-se pela relação entre número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) versus  $\log (1/R)$ , o que indica a intensidade do sinal de determinado grupo químico presente na amostra. Para a construção do dendrograma e Análise dos Componentes Principais (PCA), foi utilizado o software PLS\_Toolbox versão 6.0, rodado na plataforma MATLAB versão 7.11.

### **3.10 Experimento de Biorremediação**

#### **3.10.1 Amostra de solo não contaminado**

A amostra de solo nativo, utilizado na montagem dos microcosmos de biorremediação, foi proveniente do município de Mariana Pimentel/RS ( $30^{\circ}21'39''\text{S } 51^{\circ}34'56''\text{O}$ ). A coleta foi realizada em novembro de 2011 em camada de cerca de 0-15cm, em local sem histórico de uso agrícola nem de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. A caracterização de seus parâmetros físico-químicos foi realizada pelo Laboratório de Análises de Solo da UFRGS (Tabela 5). A estimativa do Número Mais Provável (NMP) da população total de micro-organismos heterotróficos foi realizada em caldo nutriente, e a de micro-organismos degradadores em meio mínimo mineral (MM1) (Richard & Vogel, 1999) com indicador redox cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), conforme metodologia descrita por Braddock & Catterall (1999). A verificação dos resultados foi realizada após 48h e 12 dias de incubação a

30°C, respectivamente. O restante da amostra de solo nativo foi secado à temperatura ambiente (20°C±5°C) por dois dias, peneirado em malha de 3mm e armazenado a 4°C até a montagem do experimento.

**Tabela 5.** Análise físico-química do solo não contaminado amostrado.

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultado</b>
matéria orgânica	1,5%
pH	4,7
índice SMP	5,8
P	3,5mg/dm <sup>3</sup>
K	34mg/dm <sup>3</sup>
N	0,07%
C orgânico	0,87%
CTC	6,1cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>
Al <sub>troc.</sub>	0,8cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>
Ca <sub>troc.</sub>	0,4cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>
Mg <sub>troc.</sub>	0,1cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>
Al+H	5,5cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>
Ca/Mg	4,0
Ca/K	4,6
Mg/K	1,1
S	4,3 mg/dm <sup>3</sup>
Zn	1,6 mg/dm <sup>3</sup>
Cu	0,7 mg/dm <sup>3</sup>
B	0,2 mg/dm <sup>3</sup>
Mn	38 mg/dm <sup>3</sup>
argila	16%
areia grossa + areia fina	61%
silte	23%
heterotróficos totais	4,6x10 <sup>4</sup> NMP/mL
micro-organismos degradadores	2,4x10 <sup>3</sup> NMP/mL

CTC: Capacidade de Troca Catiônica

### 3.10.2 Montagem dos microcosmos

Os microcosmos foram montados em quadruplicatas em frascos de vidro, com fechamento hermético e capacidade de armazenamento de 1,5L. Foram distribuídos 150g de solo em cada um, a fim de garantir que o oxigênio não fosse fator limitante para ocorrência do processo de degradação. Durante

os 32 dias de análise experimental, os sistemas foram mantidos sob temperatura controlada ( $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e protegidos da incidência luminosa.

Primeiramente, a quantidade total de solo referente aos tratamentos de bioestimulação, bioaumentação convencional e bioaumentação sucessiva foi incubada por dois dias à temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) após incorporação de  $\text{CaCO}_3$ , na quantidade recomendada por Bissani et al. (2008) para aumento do pH para 6,5. Através desse procedimento de incubação prévio, buscou-se evitar a superestimativa na quantificação de  $\text{CO}_2$  liberado que poderia ser observada nos primeiros dias do experimento de respirometria, devido à adição do corretivo calcário.

Quatro estratégias de biorremediação foram analisadas quanto à biodegradação de B10 em solo contaminado com 5% do combustível, além do controle negativo.

**Controle negativo** (C) – solo sem contaminação, com correção da umidade;

**Atenuação natural** (AN) – solo contaminado, com correção da umidade;

**Bioestimulação** (BS) – solo contaminado, com correção da umidade, do pH e ajuste da proporção C:N:P para 100:10:1 pela adição de uma solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;

**Bioaumentação convencional** (BA CO) – solo contaminado, com correção da umidade e do pH, ajuste da proporção C:N:P e inoculação do consórcio selecionado em etapa anterior do trabalho (item 3.9), no tempo zero do experimento;

**Bioaugmentação sucessiva** (BA SC) – solo contaminado, com correção da umidade e do pH, ajuste da proporção C:N:P e inoculação do consórcio selecionado no item 3.9, nos tempos zero e 11 do período experimental.

Os volumes de inóculo e de solução de nutrientes adicionados aos tratamentos descritos foram ajustados para que se mantivesse em 80% a capacidade de campo do solo. Já a correção da umidade para o controle e atenuação natural deu-se pela incorporação de água estéril. O preparo do pré-inóculo foi realizado de acordo com o descrito no item 3.4, e a suspensão celular foi adicionada ao solo à concentração de  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> solo.

Para avaliar a atividade microbiológica durante a degradação, estimativas do número mais provável da população total de heterotróficos e da população microbiana degradadora foram realizadas. As alterações estruturais da comunidade bacteriana foram avaliadas através de um método cultivo-independente, a desnaturação em gradiente de gel de eletroforese (DGGE) de fragmentos do gene 16S rRNA. A degradação do combustível foi caracterizada pela quantificação da liberação acumulada de CO<sub>2</sub> (respirometria) e pela análise de cromatografia gasosa (CG) de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP).

### **3.10.3 Monitoramento da população microbiana**

#### **3.10.3.1 Estimativa da população total de micro-organismos heterotróficos**

A partir da coleta de 1g de solo úmido de cada um dos frascos respirométricos, foi realizado o acompanhamento do crescimento da população microbiana de heterotróficos, nos tempos 0, 6, 12, 18, 24 e 30. Após a amostra passar por diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ), 20 $\mu$ L de cada diluição foram inoculados em 250 $\mu$ L de caldo nutriente em placas de poliestireno de 96 poços estéreis. A análise das placas deu-se após 48h de incubação a 30°C, e foram considerados positivos para crescimento os poços que apresentaram turbidez do meio. O NMP das amostras foi determinado a partir do confronto dos resultados obtidos em relação a uma tabela-referência (APHA, 1995).

#### **3.10.3.2 Estimativa da população de micro-organismos degradadores**

O método baseia-se na utilização do indicador redox TTC para determinação do NMP. Após preparo da solução de MM1 com TTC, conforme indicado por Braddock & Catterall (1999), 240 $\mu$ l foram distribuídos em placa de poliestireno de 96 poços. Foram então adicionados a cada um dos poços 20 $\mu$ L das amostras de solo, previamente diluídas em série (conforme descrito no item 3.10.3.1), e 20 $\mu$ L da mistura diesel:biodiesel B10. A análise foi realizada a cada seis dias, iniciando no tempo 0 e finalizando no tempo 30. As placas foram incubadas, sob proteção da luz, durante 12 dias a 30°C. Foram considerados positivos para degradação os poços que apresentaram mudança

da coloração do meio de incolor para rosado ao final do período de incubação. A determinação do NMP foi obtida pela mesma metodologia descrita no item anterior.

#### **3.10.4 Leitura de pH e monitoramento do teor de umidade**

A determinação dos valores de pH foi realizada nos tempos 0, 10 e 32, de acordo com metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). A umidade gravimétrica foi monitorada ao longo do período de incubação e o ajuste do conteúdo de água foi feito sempre que necessário para a manutenção da capacidade de campo em 80%, através da adição de água destilada estéril (Tedesco et al., 1995).

#### **3.10.5 Avaliação da biodegradação do contaminante**

##### **3.10.5.1 Respirometria**

Os frascos de respirometria (1,5L), contendo 150g de solo, foram equipados com um aparato de captação de CO<sub>2</sub>, composto por copos plásticos com 20mL de solução de NaOH 0,5M, suspensos por um tripé de metal. Os sistemas foram mantidos incubados durante 32 dias a 28°C±1°C, com aberturas periódicas para amostragens e para substituição da solução de NaOH. Nesse momento, era adicionado ao hidróxido de sódio 1mL de solução de BaCl<sub>2</sub> 30% para precipitação do CO<sub>2</sub> em solução. Em seguida, quatro gotas do indicador fenolftaleína 1% eram pipetados para titulação com HCl 1M. Antes do fechamento dos frascos, o solo era mecanicamente revirado para promover

sua aeração. A produção de C-CO<sub>2</sub> (mg.Kg<sup>-1</sup> solo) foi determinada segundo cálculo descrito por Stotzki (1965).

$$C-CO_2 = \frac{[(B - T) \times eq \times M_{HCl} \times FC]}{Mc}$$

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)

### 3.10.5.2 Cromatografia Gasosa (CG)

Para realização da análise cromatográfica de HTP, amostragens compostas dos microcosmos, perfazendo 30g, foram encaminhadas à empresa Innolab do Brasil S.A., localizada no município do Rio de Janeiro. As amostras foram enviadas, nos tempos 0, 11 e 32, de acordo com as determinações da própria empresa, que, dentre outras, impõe o envio das amostras à temperatura de refrigeração em frascos de vidro. Os procedimentos de análise empregados seguiram o disposto pela International Standard Organisation, método ISSO/DIS 16703:2004.

De acordo com informações da empresa prestadora de serviços, 20g da amostra in natura foram adicionados a 20mL de acetona e 10mL de

solvente de extração. Em seguida, a suspensão foi levada ao banho ultrassônico por 30 minutos a 45°C. Depois de resfriada, foram colocados 30mL de água destilada e homogeneizado por 1 minuto. A fase orgânica foi transferida para tubo de ensaio e lavada com água destilada para eliminação de interferentes. Alíquotas de 5mL do extrato foram concentradas até volume de 0,8mL. A leitura da amostra foi realizada em um cromatógrafo em fase gasosa, equipado com detector de ionização de chama (FID) modelo CP-3800 (Varian). Uma alíquota do extrato foi injetada diretamente na coluna CP-SIL8CB do cromatógrafo com programação de temperatura. A quantificação de HTP foi feita através da técnica de padronização externa, utilizando-se como padrão de referência o óleo diesel e óleo lubrificante.

O cálculo do percentual de degradação foi realizado de acordo com a fórmula a seguir:

$$\% = \frac{DTi - DTf}{DTi} \times 100$$

DTf = valor de HTP no tempo final

DTi = valor de HTP no tempo inicial

### **3.10.6 Diversidade da comunidade microbiana**

#### **3.10.6.1 Extração de DNA e amplificação por PCR**

A extração de DNA dos micro-organismos presentes no solo submetido ao processo de biorremediação foi realizada com PowerSoil DNA

Isolation Kit (MO BIO Inc., Laboratories, USA) a partir de 300mg de solo, de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação da região V3 do gene 16S rRNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os oligonucleotídeos iniciadores universais BA 338F-GC (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') e UN518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Ovreas et al., 1997). A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada em solução tampão para DNA Taq Polimerase contendo 20ng.  $\mu\text{l}^{-1}$  de DNA molde, 1U Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 3mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2mM dNTP; 5pmol de cada *primer*, em um volume final de 25 $\mu\text{l}$ . As condições da amplificação da PCR foram 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final a 72 °C por 10 minutos. A amplificação foi conduzida em um termociclador TX96 Plus (AMPLITHERM).

### 3.10.6.2 Análise por DGGE

Os amplicons obtidos foram analisados em eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) como descrito por Ovreas et al. (1997). Os géis continham 8% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1 mm) e apresentavam um gradiente desnaturante de 15% a 55% de formamida e uréia (Ovreas et al., 1997) . A eletroforese foi realizada a 200 V, durante 3h e 30min. no DCode TM System (Bio-Rad Inc.,Hercules, USA) em tampão de corrida 1X TAE. O gel foi corado com 3 $\mu\text{l}$  de Syber Green I (Invitrogen, São Paulo, Brasil) em 300mL de

água Mili-Q durante 30 minutos. A aquisição das imagens foi feita por fotodocumentador GL2200 (KODAK).

Os perfis de bandas gerados por DGGE foram comparados utilizando-se o software Gel Compar, seguida pela análise visual dos mesmos. Os padrões de bandeamento resultantes foram utilizados para estimar-se a diversidade pelo índice de Shannon-Weaver ( $H'$ ). Cada banda foi tratada como uma unidade taxonômica operacional (OTU). A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa DivEs - Diversidade de espécies, versão 2.0. Os dendrogramas foram delineados pela avaliação de uma matriz binária gerada a partir do perfil de bandas, submetida à análise estatística utilizando-se o coeficiente de DICE.

### **3.11 Análise estatística**

Os dados de tensão superficial, pH e liberação de  $\text{CO}_2$  foram interpretados a partir da análise de variância (ANOVA) e pelo teste  $t$  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 Isolamento bacteriano**

A seleção inicial, empregando a técnica de enriquecimento em presença de processo de transferência, possibilitou o isolamento de 15 bactérias. O processo de biodegradação de combustíveis pode ser realizado por diversos micro-organismos presentes no solo, mas, em números relativos, poucos deles são capazes de utilizar esses compostos como fonte de carbono e energia (Lebkowska et al., 1995). A bioprospecção de bactérias em uma amostra de solo exposto à contaminação crônica por combustíveis aumenta a possibilidade de seleção de organismos com capacidade para metabolização de poluentes dessa espécie. Isso porque a exposição prolongada da comunidade microbiana ao contaminante realiza uma pressão seletiva sobre a mesma, selecionando os micro-organismos com capacidade para sobreviver nesse meio impactado.

#### **4.2 Seleção de micro-organismos potencialmente degradadores**

A seleção dos micro-organismos com potencial biodegradador de poluente orgânico baseou-se na técnica que utiliza um indicador-redox (TTC) no meio mínimo mineral com o contaminante. A interpretação do teste é baseada na mudança de coloração do meio de cultura, de incolor para cor-de-rosa, devido à redução do TTC para TPF.

Seis das 15 bactérias previamente purificadas demonstraram capacidade de crescimento às expensas de pelo menos duas das fontes de carbono fornecidas e estão destacadas em negrito na Tabela 6. Elas foram capazes de virar a coloração do meio de cultura no período de até 48h de incubação. Os seis isolados de melhor desempenho (UFRGS 2, UFRGS 3, UFRGS 4, UFRGS 8, UFRGS 9 e UFRGS 14), de acordo com os critérios determinados, foram utilizados nas etapas seguintes para composição e seleção de consórcio microbiano.

**Tabela 6.** Resultados para teste preliminar de biodegradação em meio de cultura MM1, contendo o indicador redox TTC e a fonte de carbono (B0, B10 ou B100).

<b>Isolados</b>	<b>B0</b>	<b>B10</b>	<b>B100</b>
UFRGS 1	+	-	-
<b>UFRGS 2</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>UFRGS 3</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>UFRGS 4</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>
UFRGS 5	+	-	-
UFRGS 6	-	-	+
UFRGS 7	-	-	-
<b>UFRGS 8</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>UFRGS 9</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
UFRGS 10	-	-	+
UFRGS 11	-	-	+
UFRGS 12	+	-	-
UFRGS 13	-	-	-
<b>UFRGS 14</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>
UFRGS 15	-	-	-

+: bactérias que viraram a coloração do meio em 48h para a fonte de carbono testada.  
 -: bactérias que não viraram a coloração do meio em 48h para a fonte de carbono testada.  
 As bactérias selecionadas pelo teste estão destacadas em negrito.

Os resultados obtidos a partir do teste preliminar de biodegradabilidade sugerem não só a existência de uma comunidade microbiana apta à degradação dos óleos empregados, como também a ocorrência de capacidades de degradação diferenciadas entre os microorganismos estudados. Essa característica pode estar relacionada ao padrão de contaminação a que a microbiota esteve sujeita ao longo dos anos em seu habitat natural. Aparatos enzimáticos diferentes podem ter sido desenvolvidos, mas a ocorrência de outras interações, envolvendo a composição do contaminante-alvo e as relações que podem se estabelecer na mistura dos dois

combustíveis, também pode estar relacionada aos perfis de degradação que as culturas apresentaram durante o ensaio.

Como pode ser observado, dentre os micro-organismos selecionados, os isolados UFRGS 4 e UFRGS 14 consumiram B10, mas não metabolizaram B0. Culturas puras podem prover a biodegradação de misturas diesel/biodiesel quando o biodiesel está presente em baixas concentrações de forma mais eficiente que consórcios microbianos (Mariano et al., 2008a). No entanto, diante de uma fonte de carbono mais complexa, como o diesel, a condição mais favorável à degradação seria o uso de consórcios, por apresentarem maior diversidade metabólica (Mariano et al., 2008a). A biodegradabilidade de B10 pelos isolados supramencionados também poderia refletir a ação do biodiesel como elemento facilitador da biodegradação do diesel quando presente em uma mistura. Como fonte de carbono mais suscetível, o biodiesel aumentaria as taxas de degradação do diesel, através do cometabolismo. Dessa forma, a microbiota utilizaria um segundo substrato (mais acessível) como fonte de carbono, e, após, o primeiro composto (mais recalcitrante), que seria atacado somente quando representasse a única fonte de carbono disponível (Zhang et al., 1998). Cabe ressaltar, no entanto, que o teste não possibilita afirmarmos se o fenômeno do cometabolismo ocorreu, uma vez que não é possível identificarmos por essa metodologia que fração da mistura do combustível foi consumida nessas 48h iniciais.

### 4.3 Identificação dos isolados

A análise da sequência parcial do gene 16S rRNA mostrou que dentre os seis micro-organismos selecionados pelo teste preliminar de biodegradação com indicador TTC, três deles pertencem à espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Os demais foram identificados como pertencentes às espécies *Achromobacter xylosoxidans*, *Ochrobactrum intermedium* e *Enterococcus* sp, conforme arrolado na Tabela 7. Através da coloração de Gram, observou-se que à exceção do isolado UFRGS 8 (coco gram-positivo), todos os demais eram bastonetes gram-negativos. Para os testes de lipase e esterase, apresentaram resultado positivo as bactérias UFRGS 2, UFRGS 3 e UFRGS 9.

**Tabela 7.** Identificação das bactérias isoladas de solo contaminando com combustível e selecionadas em teste preliminar de biodegradação.

Isolado	Identificação	Identidade
UFRGS 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2	99%
UFRGS 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3	99%
UFRGS 4	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99%
UFRGS 8	<i>Enterococcus</i> sp	89%
UFRGS 9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9	89%
UFRGS 14	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	99%

O gênero *Pseudomonas* tem sido frequentemente isolado e empregado em ensaios de biorremediação de xenobióticos. Sua capacidade de degradação tem sido comprovada tanto para linhagens obtidas de ambientes impactados por hidrocarbonetos de petróleo (Kaczorek & Olszanowski, 2011) quanto para isolados sem prévia exposição aos poluentes (Zanaroli et al., 2010). Trata-se de uma espécie ubíqua, encontrada em solos, em sedimentos,

em águas subterrâneas e em ecossistemas marinhos contaminados (Vieira et al., 2007; Hosokawa et al., 2009; Ciric et al., 2010; Zhang et al., 2010). O gênero destacou-se como o representante com maior frequência de clones na biblioteca formada a partir da extração de DNA metagenômico de um consórcio degradador de óleo diesel, proveniente de solo contaminado (Paixão et al., 2010). A predominância do gênero também foi reportada por Ma et al. (2006), em isolamento conduzido em solo antártico impactado por naftaleno e fenantreno, em que dos 22 micro-organismos degradadores de HPA isolados, 21 foram identificados como *Pseudomonas* sp..

Ghazali et al. (2004) observaram o crescimento de *Pseudomonas* em diversos substratos testados, dentre os quais estiveram óleo cru, tolueno, etil-benzeno e n-tetradecano, demonstrando sua diversidade metabólica, também verificada no presente estudo pelos testes de biodegradação de combustíveis utilizando TTC. Em estudos envolvendo a degradação de diesel, o potencial de utilização do gênero *Pseudomonas* em ensaios de biorremediação é demonstrado tanto em consórcios mono- quanto multiespecíficos (Lawniczak et al., 2011; Taccari et al., 2012).

Dados publicados relatam a capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, incluindo compostos mono- e poliaromáticos, também por *Achromobacter xylosoxidans* (Viñas et al., 2005; Nielsen et al., 2006). O isolamento já foi realizado a partir de amostras de óleo de tanques armazenadores de petróleo por Vasconcellos et al. (2009), que verificaram, em ensaios laboratoriais, que a degradação de hidrocarbonetos pela espécie ocorreu preferencialmente na presença de ácidos graxos, provavelmente

resultantes da produção de surfactantes ou da rota de metabolização dos compostos poluentes. O potencial degradativo da espécie já foi demonstrado utilizando o aditivo da gasolina éter metil terc-butílico (MTBE) (Eixarch & Constanti, 2010) e pireno (Tiwari et al., 2010).

Em trabalhos que avaliam a biorremediação de solo contaminado, o uso de micro-organismos pertencentes ao gênero *Achromobacter* aparece associado à composição de consórcios, muitas vezes juntamente com *Pseudomonas* (Gojgic-Cvijovic et al., 2012), assim como realizado no presente estudo. Foi demonstrado que a performance de *Pseudomonas* e *Achromobacter*, compondo consórcios com outras espécies, pode ser positiva para tratamentos de biorremediação de solo contaminado por misturas diesel:biodiesel, uma vez que são capazes de metabolizar tanto a fração de hidrocarbonetos quanto a de ácidos graxos (Cyplik et al., 2011).

Linhagens do gênero *Ochrobactrum* já foram descritas como resistentes e redutoras de metais (Branco et al., 2004; He et al., 2009) e como degradadoras de agrotóxicos (Ermakova et al., 2010). Há relatos de seu isolamento e degradação em meios impactados por derivados de petróleo, incluindo diesel fóssil (Mariano et al., 2008b). Trabalhos têm sugerido sua potencial aplicação na biorremediação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de baixo e alto peso molecular (Arulazhagan & Vasudevan, 2009; Wu et al., 2009), tendo sido caracterizada como produtora de biosurfactantes (Calvo et al., 2008). Em ensaio de biodegradação de águas residuais provenientes de indústrias petroquímicas, *Ochrobactrum intermedium*, associado a outras cinco linhagens bacterianas, dentre as quais

*Achromobacter* sp., foi capaz de reduzir o teor de HTP do efluente de 320 mg.L<sup>-1</sup> para 8 mg.L<sup>-1</sup>, em biorreator (Gargouri et al., 2011).

São escassos os relatos do potencial degradador de combustíveis derivados de petróleo por *Enterococcus*. Idise & Ameh (2010) isolaram a espécie de solo contaminado por óleo e caracterizaram a cepa como potencial degradadora de produtos de petróleo. No entanto, a maioria dos estudos envolvendo a utilização do micro-organismo avalia sua capacidade de metabolização de corantes sintéticos (Chan et al, 2012; Mate & Pathade, 2012) e redução de cromo hexavalente (Desai et al., 2009). Boontawan & Boontawan (2011) revelaram a habilidade da espécie bacteriana, isolada de solo contaminado por óleo de *Jatropha*, em utilizar a fonte de carbono em condições anaeróbias. No entanto, por se tratar de uma enterobacteria, sua utilização em experimentos de bioaumentação deve ser avaliada com parcimônia.

#### **4.4 Caracterização dos isolados**

##### **4.4.1 Produção de biossurfactantes em meio líquido**

As análises das medidas de tensão superficial (TS) foram conduzidas durante 14 dias e revelaram que todos os isolados, à exceção de *Enterococcus* sp, foram capazes de produzir biossurfactantes em meio líquido contendo 1% da mistura diesel:biodiesel B10, uma vez que, no tempo final, os níveis de redução da TS diferiram em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Esses dados estão exibidos na Tabela 8.

**Tabela 8.** Tensão superficial analisada nos tempos 0 e 14 em meio líquido MM1 com 1% de B10 para os isolados *Pseudomonas aeruginosa2*, *Pseudomonas aeruginosa3*, *Achromobacter xylooxidans*, *Enterococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa9* e *Ochrobactrum intermedium*.

Isolados	Tensão superficial (mN.m <sup>-1</sup> )	
	T0	T14
<i>Pseudomonas aeruginosa2</i>	55,20	36,23
<i>Pseudomonas aeruginosa3</i>	56,10	32,13
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	56,96	45,50
<i>Enterococcus</i> sp	55,76	52,43
<i>Pseudomonas aeruginosa9</i>	56,90	47,03
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	56,93	49,56
CN	57,20	53,86

T: tempo; CN: controle negativo

A partir das medidas de tensão superficial, observa-se que o isolado *P. aeruginosa3* reduziu 42,72% do valor da medida inicial de TS. O isolado *P. aeruginosa2* promoveu a redução da TS em 34,36%. Ambos podem ser classificados como bons produtores de biossurfactantes por conduzirem a tensão superficial a valores inferiores a 40mN.m<sup>-1</sup> (Cooper & Zajic, 1980). O gênero é reconhecido como efetivo produtor de biossurfactantes, principalmente da classe dos ramnolipídeos (Calvo et al., 2008). Em estudos desenvolvidos por Pirôllo et al. (2008), em que o potencial produtor de biossurfactantes de uma cepa de *P. aeruginosa*, isolada de um ambiente contaminado por hidrocarbonetos de petróleo, foi avaliado, os autores verificaram que a tensão superficial obtida foi de 36mN.m<sup>-1</sup>, representando uma redução de 27,4% no valor. O ensaio foi desenvolvido durante 168h em meio mineral mínimo contendo 30% de diesel. Para Mnif et al. (2011) um isolado pertencente à espécie representou não só os resultados mais eficientes de degradação de óleo cru, em 1% de concentração, bem como foi considerado o

melhor produtor de biossurfactantes dentre oito micro-organismos avaliados, por reduzir a TS de 68 para 35,1mN.m<sup>-1</sup>.

A capacidade de produção de biossurfactantes também é reportada para os gêneros *Achromobacter* e *Ochrobactrum*. Selecionado a partir de uma amostra de água contaminada por derivados de petróleo, *A. xylosoxidans* foi capaz de reduzir os níveis de tensão superficial para 39,4mN.m<sup>-1</sup> em meio contendo 1% de óleo cru (Mnif et al., 2011). Dentre 14 isolados testados, *O. intermedium* foi identificado por Ferhat et al. (2011) como um dos dois micro-organismos que produziram os maiores teores de biossurfactantes, diminuindo a TS para 31mN.m<sup>-1</sup> em meio mineral com 2% de hexano. No presente trabalho, os micro-organismos representantes de ambos os gêneros não apresentaram um comportamento tão eficiente para produção de biossurfactantes quanto os registros da literatura trazem. No entanto, ainda assim, a redução dos valores das medidas de TS percebida pelos isolados diferiu do tratamento controle.

Nesse estudo, o isolado pertencente ao gênero *Enterococcus*, não foi considerado produtor de biossurfactantes, pois a redução da tensão superficial do meio não atingiu valores significativos (55,76 para 52,43mN m<sup>-1</sup>).

O crescimento dos micro-organismos em ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo geralmente é acompanhado pela emulsificação da fonte de carbono. Muitas vezes isso decorre da produção de agentes surfactantes, durante a metabolização dos hidrocarbonetos. Os biossurfactantes atuam como moléculas superfície-ativas, que podem incrementar a capacidade de degradação ao aumentar a hidrofobicidade da

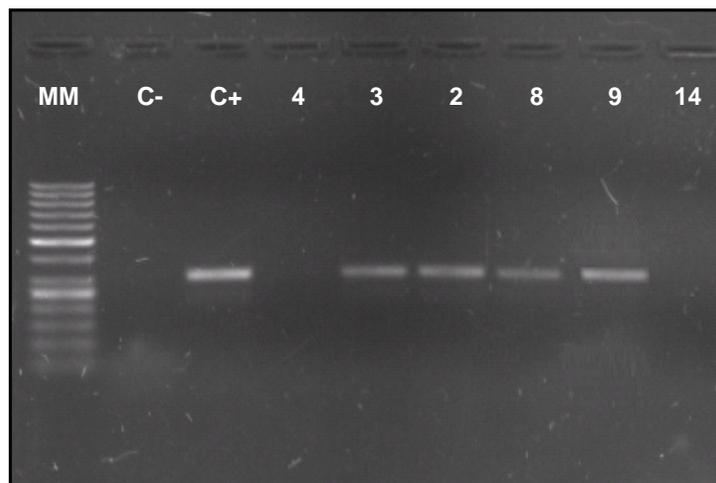
superfície celular, permitindo o contato direto entre a célula microbiana e o hidrocarboneto. São também agentes da redução da tensão superficial e interfacial de compostos de diferentes naturezas (Mehdi & Giti 2008). De maneira geral, os resultados observados pelo presente estudo revelam que os micro-organismos testados são potenciais produtores de biossurfactantes. A presença de tal característica, dentre outras requeridas, enquadra-os dentro do perfil adequado para aplicação em meios impactados por combustíveis, já que a biodegradação de hidrocarbonetos pode ser incrementada na presença de surfactantes (Mnif et al., 2011).

#### **4.4.2 Identificação da presença do gene *alkB***

Para a avaliação do potencial genético dos micro-organismos isolados, foi realizada a detecção do gene *alkB*, um dentre os muitos genes envolvidos nas rotas metabólicas de degradação de hidrocarbonetos. O gene *alkB* codifica a enzima alcano mono-oxigenase, catalisadora da primeira etapa de metabolização de alcanos, que são os constituintes majoritários de combustíveis fósseis (Hamamura et al., 2008). O conjunto de *primers* empregado nesse experimento foi desenhado para identificar genótipos degradadores de alcanos com cadeias carbônicas na faixa de C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> (Heiss-Blanquet et al., 2005).

Dentre os seis micro-organismos selecionados no presente trabalho, quatro deles apresentaram produto de amplificação de 312pb para o gene *alkB*, conforme pode ser visualizado na Figura 7. Os resultados positivos foram

observados para os isolados *P. aeruginosa*2, *P. aeruginosa*3, *P. aeruginosa*9 e *Enterococcus* sp.



**Figura 7.** Gel de agarose 1,5%, mostrando a amplificação de fragmento de 312pb do gene *alk* *B*. MM: marcador molecular 50pb; C- : controle negativo; C+ : controle positivo (*Pseudomonas aeruginosa*), 4: *A. xylosoxidans*; 3: *P. aeruginosa*3; 2: *P. aeruginosa*2; 8: *Enterococcus* sp; 9: *P. aeruginosa*9; 14: *O. intermedium*.

Estudos descrevem a presença, a dispersão e a diversidade de genes *alkB* em ambientes naturais ou em isolados bacterianos degradadores de óleo como forma de avaliar o potencial de degradação de hidrocarbonetos por comunidades microbianas (Kuhn et al., 2009; Heiss-Blanquet et al., 2005).

Já foram descritas a detecção de *alkB* e o crescimento de *P. aeruginosa* às expensas de fontes de carbono exclusivamente compostas por alcanos, como hexano, heptano, octano e decano, a partir de ensaios envolvendo linhagens isoladas de água e de solo de refinarias de petróleo (Belhaj et al., 2002). Além disso, a detecção do gene para a espécie foi relacionada também por Hamamura et al. (2008) no uso de *alkB* como

marcador do potencial de degradação de uma comunidade microbiana impactada pela contaminação de óleo cru.

Não foram registrados trabalhos anteriores descrevendo a amplificação do gene que codifica alcano hidroxilases para *Enterococcus*. Considerando que se trata de um gênero pouco relacionado a estudos de degradação, a presença de *alkB* poderia estar vinculada à ocorrência de transferência gênica horizontal (van Beilen et al., 2003). Outra possibilidade para o observado seria a habilidade intrínseca do consumo de alcanos pelo micro-organismo, uma vez que esses compostos estão naturalmente presentes em meios naturais (Schirmer et al., 2010).

Os resultados negativos para amplificação do fragmento de *alkB* para *Ochrobactrum intermedium* e *Achromobacter xylosoxidans* confirmam os dados da literatura, que não relatam a presença do gene para essas espécies. Apesar de esses isolados demonstrarem capacidade de metabolizar combustíveis, conforme exibiu o teste que utilizou o indicador TTC (Tabela 6), a habilidade de degradação do substrato pode ter ocorrer através de outras alcano hidroxilases, como as enzimas do complexo citocromo P450 (Wang et al., 2010).

Ainda que alguns autores tenham questionado a utilização de *alkB* como marcador funcional no monitoramento do potencial endógeno de biorremediação de ecossistemas impactados (Paisse et al., 2011), os resultados observados no presente estudo mostram que a detecção de sua presença em culturas puras pode contribuir para caracterização do perfil de degradação dos isolados, informando sobre a genética de suas rotas

catabólicas. Contudo, a utilização de *primers* que codifiquem para outras alcanos mono-oxigenases ou para enzimas catalisadoras da degradação de alcanos com cadeias carbônicas curtas e longas poderia retratar ainda mais o potencial da comunidade testada, já que desde a descrição do sistema de metabolização de alcanos para *Pseudomonas putida* GPo1, uma série de outros mecanismos de degradação já foram elucidados (van Beilen et al., 2003; van Beilen & Funhoff, 2007). Sabe-se ainda que o gene *alkB* apresenta uma alta diversidade em sua sequência, que pode variar tanto inter- quanto intraespecificamente, e essas sequências seriam dependentes do substrato utilizado pelo micro-organismo (van Beilen & Funhoff, 2007; Panicker et al., 2010).

#### **4.5 Seleção do consórcio microbiano**

A avaliação da capacidade degradadora das culturas em consórcio visa à simulação de uma condição natural de ocorrência dos micro-organismos no meio. No entanto, o uso de um consórcio composto por micro-organismos com requerimentos desconhecidos de substrato pode comprometer os resultados do processo de bioaumentação (Simon et al., 2004; Hesselsoe et al., 2008; Lebkowska et al., 2011). Em sítios degradados, os poluentes podem ser formados por moléculas complexas ou por uma mistura de compostos que poderão ser metabolizados somente por uma combinação muito específica de micro-organismos (El Fantroussi & Agathos, 2005). Assim, além de comprovado potencial para degradar determinado composto orgânico poluente, os micro-organismos que fazem parte do consórcio precisam ainda

apresentar propriedades metabólicas sinérgicas (Mukred et al., 2008). Dessa forma, ao invés de testarmos somente a viabilidade e o desempenho do consórcio formado a partir dos seis isolados selecionados, buscou-se investigar se diferentes combinações entre eles poderiam resultar em consórcios com potencialidades de degradação diferenciadas para o combustível B10. Para tanto, as seis culturas puras foram combinadas três a três, totalizando 20 diferentes associações (Tabela 9). O desempenho de cada um deles foi comparado entre si e ao do consórcio contendo todos os seis micro-organismos.

**Tabela 9.** Composição dos cinco consórcios integrantes do ensaio, a partir de diferentes combinações entre os isolados bacterianos *P. aeruginosa*2, *P. aeruginosa*3, *A. xylosoxidans*, UFRGS 8, *P. aeruginosa*9 e *O. intermedium*.

Consórcios	Combinação de isolados
A	2-3-4
B	2-3-8
C	2-3-9
D	2-3-14
E	2-4-8
F	2-4-9
G	2-4-14
H	2-8-9
I	2-8-14
J	2-9-14
L	3-4-8
M	3-4-9
N	3-4-14
O	3-8-9
P	3-8-14
Q	3-9-14
R	4-8-9
S	4-8-14
T	4-9-14
U	8-9-14
V	2-3-4-8-9-14

2: *P. aeruginosa*2; 3: *P. aeruginosa*3; 4: *A. xylosoxidans*; 8: *Enterococcus* sp; 9: *P. aeruginosa*9; 14: *O. intermedium*.

A cinética de degradação foi avaliada por 7 dias a partir da combinação dos resultados obtidos pela contagem de UFC.mL<sup>-1</sup> e viragem da coloração do meio de cultura. De acordo com esse critério, cinco consórcios (destacados em negrito na Tabela 10) foram selecionados por apresentarem maior crescimento populacional (ao fim do período) e por serem os sistemas capazes de alterar a cor do meio em menor espaço de tempo. A Tabela 10 relaciona as contagens realizadas para todos os sistemas.

**Tabela 10.** Crescimento populacional dos consórcios bacterianos de A a V em contagens de UFC.mL<sup>-1</sup>, nos tempos 0, 1, 3, 5 e 7.

Consórcios	Crescimento celular (UFC.mL <sup>-1</sup> )				
	T0	T1	T3	T5	T7
A	1,2 x10 <sup>5</sup>	1,1 x10 <sup>7</sup>	6,0 x10 <sup>7</sup>	5,0 x10 <sup>7</sup>	4,3 x10 <sup>6</sup>
B	1,0 x10 <sup>5</sup>	2,2 x10 <sup>7</sup>	2,5 x10 <sup>7</sup>	4,3 x10 <sup>7</sup>	4,0 x10 <sup>7</sup>
<b>C</b>	<b>1,1 x10<sup>5</sup></b>	<b>4,4 x10<sup>7</sup></b>	<b>1,0 x10<sup>8</sup></b>	<b>3,0 x10<sup>7</sup></b>	<b>9,9 x10<sup>7</sup></b>
D	1,0 x10 <sup>5</sup>	2,0 x10 <sup>7</sup>	2,7 x10 <sup>7</sup>	3,0 x10 <sup>7</sup>	3,0 x10 <sup>7</sup>
E	1,3 x10 <sup>5</sup>	1,07 x10 <sup>6</sup>	4,7 x10 <sup>6</sup>	3,0 x10 <sup>6</sup>	1,7 x10 <sup>6</sup>
F	1,0 x10 <sup>5</sup>	2,08 x10 <sup>7</sup>	1,1 x10 <sup>7</sup>	3,0 x10 <sup>6</sup>	1,0 x10 <sup>6</sup>
G	1,0 x10 <sup>5</sup>	1,48 x10 <sup>7</sup>	5,6 x10 <sup>7</sup>	3,2 x10 <sup>6</sup>	6,0 x10 <sup>6</sup>
H	1,5 x10 <sup>5</sup>	4,0 x10 <sup>6</sup>	5,0 x10 <sup>7</sup>	5,2 x10 <sup>7</sup>	6,7 x10 <sup>6</sup>
I	2,0 x10 <sup>5</sup>	1,5 x10 <sup>7</sup>	7,3 x10 <sup>7</sup>	3,8 x10 <sup>7</sup>	3,8 x10 <sup>7</sup>
J	1,0 x10 <sup>5</sup>	2,2 x10 <sup>7</sup>	5,8 x10 <sup>7</sup>	1,8 x10 <sup>7</sup>	1,0 x10 <sup>7</sup>
<b>L</b>	<b>1,7 x10<sup>5</sup></b>	<b>6,0 x10<sup>7</sup></b>	<b>8,0 x10<sup>7</sup></b>	<b>5,0 x10<sup>7</sup></b>	<b>7,0 x10<sup>7</sup></b>
M	1,5 x10 <sup>5</sup>	3,0 x10 <sup>6</sup>	6,0 x10 <sup>7</sup>	5,2 x10 <sup>7</sup>	1,8 x10 <sup>7</sup>
N	2,2 x10 <sup>5</sup>	1,05 x10 <sup>7</sup>	2,15 x10 <sup>7</sup>	5,9 x10 <sup>7</sup>	1,2 x10 <sup>7</sup>
<b>O</b>	<b>1,0 x10<sup>5</sup></b>	<b>4,7 x10<sup>7</sup></b>	<b>1,9 x10<sup>8</sup></b>	<b>2,0 x10<sup>8</sup></b>	<b>2,6 x10<sup>8</sup></b>
P	1,4 x10 <sup>5</sup>	2,0 x10 <sup>7</sup>	4,0 x10 <sup>7</sup>	9,0 x10 <sup>7</sup>	2,7 x10 <sup>7</sup>
Q	1,8 x10 <sup>5</sup>	2,5 x10 <sup>7</sup>	2,05 x10 <sup>7</sup>	1,7 x10 <sup>7</sup>	9,0 x10 <sup>6</sup>
<b>R</b>	<b>1,0 x10<sup>5</sup></b>	<b>4,8 x10<sup>7</sup></b>	<b>1,2 x10<sup>8</sup></b>	<b>3,8 x10<sup>7</sup></b>	<b>9,7 x10<sup>7</sup></b>
S	1,2 x10 <sup>5</sup>	3,0 x10 <sup>6</sup>	3,0 x10 <sup>7</sup>	1,4 x10 <sup>7</sup>	1,1 x10 <sup>7</sup>
<b>T</b>	<b>1,4 x10<sup>5</sup></b>	<b>5,0 x10<sup>7</sup></b>	<b>1,0 x10<sup>8</sup></b>	<b>2,8 x10<sup>7</sup></b>	<b>5,6 x10<sup>7</sup></b>
U	2,1 x10 <sup>5</sup>	2,5 x10 <sup>7</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>	3,0 x10 <sup>7</sup>	4,2 x10 <sup>6</sup>
V	1,0 x10 <sup>5</sup>	2,7 x10 <sup>7</sup>	6,0 x10 <sup>7</sup>	5,2 x10 <sup>7</sup>	1,1 x10 <sup>7</sup>

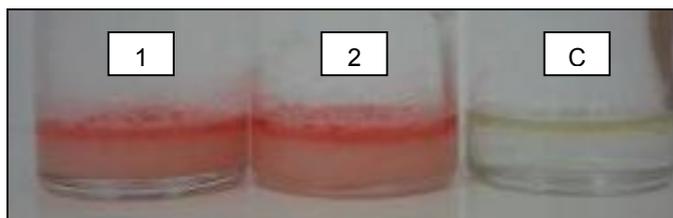
T= tempo (dias)

O perfil geral de crescimento observado para esses cinco consórcios foi semelhante ao dos demais. Apesar de eles terem apresentado uma relativa preponderância nas contagens realizadas no tempo 1, a população de C, L, O, R e T, bem como da maioria dos sistemas, aumentou em duas ordens de grandeza (de  $10^5$  para  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>). As exceções foram os consórcios E ( $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>), H ( $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>), M ( $3 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e S ( $3 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>). No entanto, ainda que todas as populações tenham sido capazes de crescer a partir das fontes de carbono e nutrientes minerais fornecidas, em nenhum dos microcosmos foi observada mudança de coloração do meio nas primeiras 24h do ensaio.

A exposição ao B10 não gerou uma fase de adaptação dos microorganismos para nenhum dos microcosmos ou sua duração foi inferior a 24h. Conforme verificado por Cerqueira et al. (2011), em estudos de biodegradação de borra oleosa, a inclusão da etapa de esgotamento de reservas energéticas previamente à inoculação dos consórcios pode eliminar a fase lag de crescimento bacteriano, propiciando o rápido crescimento e metabolização do contaminante.

Na avaliação de crescimento celular realizada no tempo 3, foram registradas as contagens mais altas para a maioria dos sistemas. Somente houve redução na concentração populacional dos consórcios F e Q, que seguiram essa tendência nos outros dois pontos de amostragem, chegando à concentração de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> no tempo 7. As populações que atingiram os maiores valores em crescimento no tempo 3 foram as dos consórcios C, L, O,

R e T, que promoveram também os primeiros resultados positivos para a viragem do meio, após 36h de incubação (Figura 8).



**Figura 8.** Viragem da coloração do meio de cultura do consórcio O após 36h de incubação a 30°C, em meio MM1, com TTC e 5% de B10. 1 e 2: replicatas do microcosmo contendo o consórcio O; C: controle negativo.

Após um declínio percebido para a maioria das populações, pela contagem no tempo 5, a concentração celular voltou a aumentar ao sétimo dia. As contagens mais altas foram novamente verificadas para os consórcios C ( $9,9 \times 10^7$ ), L ( $7 \times 10^7$ ), O ( $2,6 \times 10^8$ ), R ( $9,7 \times 10^7$ ) e T ( $5,6 \times 10^7$ ). Ao final, foram esses os capazes de assumir as maiores taxas de crescimento populacional em relação à concentração inicial de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>. A contagem para o consórcio V, estabelecido a partir dos seis isolados, atingiu  $1,1 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Assim, a metodologia empregada para avaliar o crescimento microbiano e a biodegradação de B10 indicou que cinco das combinações testadas apresentaram melhor desempenho não só em relação aos demais consórcios formados, mas também em comparação ao consórcio que continha todos os seis micro-organismos degradadores. Apesar de a cinética de crescimento ter sido semelhante entre todas as combinações propostas, o tempo de viragem

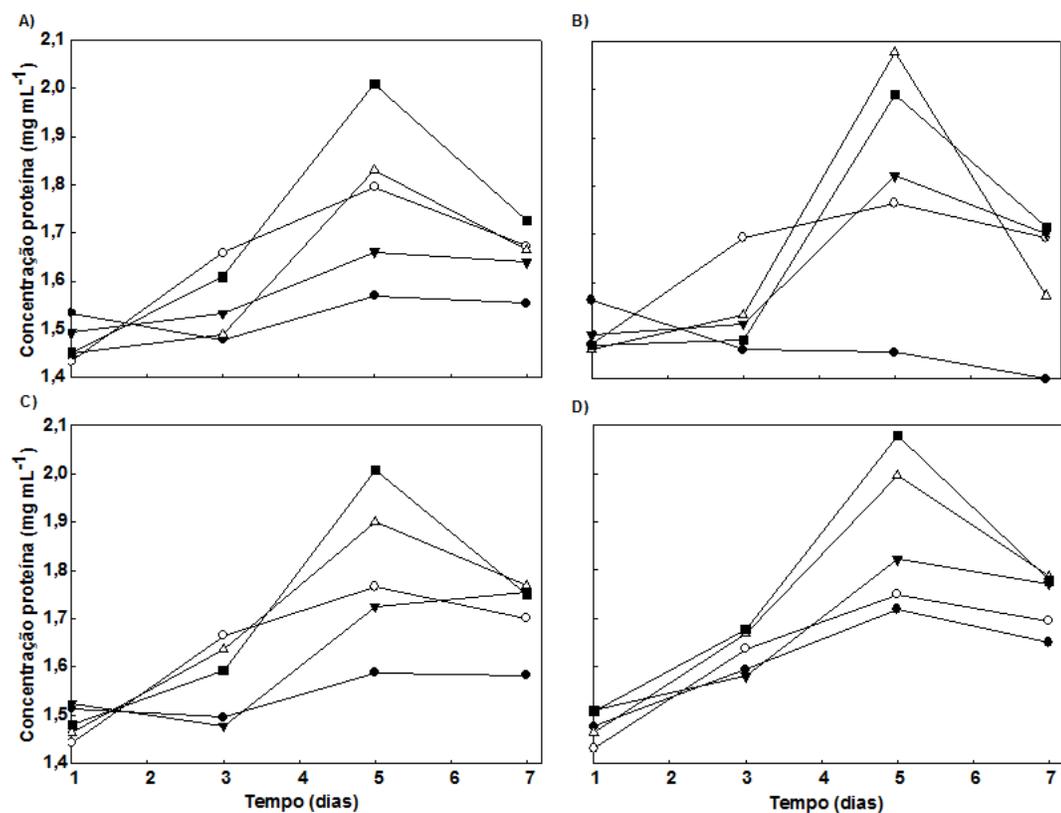
do indicador diferiu entre os consórcios, informando sobre uma maior potencialidade de degradação dos selecionados.

Testes com indicadores redox têm sido utilizados como ferramentas de investigação da capacidade de metabolização de poluentes por microorganismos em diversos trabalhos (Hanson et al., 1993; Roy et al., 2002; Mariano et al., 2010). Cerqueira (2011) utilizou a metodologia como um dos instrumentos de pré-seleção de bactérias degradadoras de borra oleosa para aplicação em biorremediação. A investigação da biodegradabilidade de misturas diesel:biodiesel por *Candida viswanathii* com indicador redox também foi realizada por Júnior et al. (2009). A capacidade intrínseca do inóculo, primeiramente avaliada em meio líquido, foi posteriormente confirmada na biorremediação de solo contaminado com combustível, demonstrando ser uma técnica simples, que fornece resultados rápidos e confiáveis.

A etapa seguinte consistiu na submissão dos consórcios C, L, O, R e T a concentrações superiores a 5% de B10, a fim de avaliar o desempenho e a sobrevivência das populações em meio líquido na presença de 10%, 20%, 30% e 40% do combustível. O crescimento das populações foi acompanhado pela determinação da concentração de proteínas totais, e a biodegradação, pela viragem da coloração do meio, indicada pela redução do TTC. A cada 48h, a presença de células viáveis também foi verificada. A melhor combinação desses resultados funcionou como critério de seleção do consórcio a ser empregado na biorremediação do solo.

A partir dos resultados mostrados na Figura 9, pode-se verificar que os consórcios foram capazes de crescer em todas as concentrações testadas,

demonstrando capacidade de adaptar-se e de metabolizar o combustível entre 10% e 40% de concentração. O crescimento foi mais expressivo no período inicial do experimento, que compreendeu os primeiros 5 dias de incubação.



**Figura 9.** Produção de proteínas totais pelos consórcios C, L, O, R e T em meio de cultura contendo MM1 e TTC, com (A) 10%, (B) 20%, (C) 30% e (D) 40% de B10, durante 7 dias. C: ●; L: ○; O: ▼; R: △; T: ■.

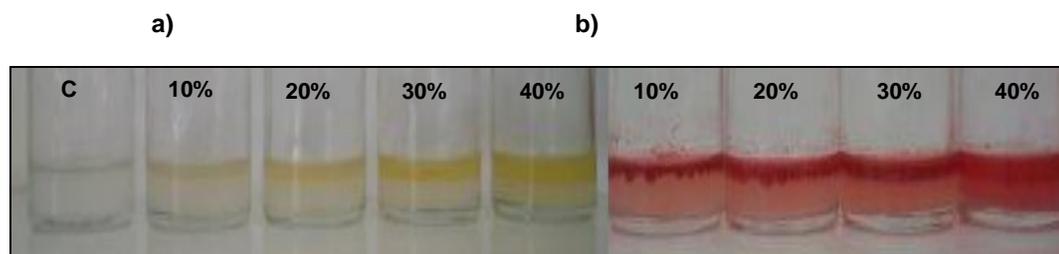
À exceção do sistema em que havia 20% de B10, nos demais, as maiores concentrações de proteínas totais foram atingidas pelo consórcio T, que na presença de 40% do combustível, percebeu sua mais alta taxa de produção protéica. A redução observada entre o quinto e sétimo dias pode estar relacionada ao esgotamento do sistema, uma vez que ocorreu em praticamente todos os microcosmos.

Por representar uma fonte de carbono disponível, o aumento da proporção de combustível no meio poderia levar a uma maior taxa de crescimento microbiano. No entanto, no geral, essa relação direta não foi percebida. As maiores taxas de produção de proteínas não estiveram sempre associadas às maiores concentrações de combustível. Para o consórcio R, por exemplo, a produção de proteínas ao tempo 5 foi de 2,08 mg.mL<sup>-1</sup> com 20% de B10 e de 1,99 mg.mL<sup>-1</sup> com 40% da mistura. Ainda assim, cabe ressaltar que todos os consórcios foram capazes de sobreviver na presença de todas as concentrações do combustível, inclusive na maior delas, de 40%. Dessa forma, nenhuma das concentrações propostas mostrou-se totalmente inibitória ao desenvolvimento dos micro-organismos, visto que os sistemas 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.

À exceção dos consórcios C e T, que apresentaram suas maiores taxas de crescimento com 40% de diesel:biodiesel, o consumo da fonte de carbono nos sistemas com maior concentração do combustível pode ter sido limitado por alguns fatores, uma vez que para os demais consórcios a produção de proteínas foi maior em microcosmos com menor presença de B10. Ao contrário da maioria dos compostos orgânicos, cuja taxa de mineralização em meio líquido aumenta conforme sua concentração, para hidrocarbonetos com alto peso molecular essa taxa varia de acordo com sua solubilidade. Altas concentrações de hidrocarbonetos, associadas a manchas de óleo não dispersas, podem ocasionar a inibição da biodegradação por limitação de

nutrientes e oxigênio ou pelos efeitos tóxicos promovidos por compostos voláteis (Leahy & Colwell, 1990).

O teste de biodegradabilidade mostrou um perfil bastante semelhante entre os consórcios. Somente o consórcio L não promoveu a viragem da coloração do meio nas primeiras 24h de incubação para nenhum dos sistemas. A intensidade de cor assumida pelo meio de cultura demonstrou estar diretamente relacionada à concentração do combustível. Assim, vermelhos mais intensos foram observados para os microcosmos que continham as mais altas concentrações de B10, conforme pode ser visualizado na Figura 10.



**Figura 10.** Viragem da coloração do meio de cultura do consórcio T, nos tempos (a) inicial, após 24h de incubação, e (b) final, após 7 dias de incubação em meio MM1, com TTC e 10%, 20%, 30% e 40% de B10. C: controle negativo.

Considerando que os resultados de biodegradabilidade com o indicador redox TTC e do teste de viabilidade celular mostraram padrões semelhantes para os diferentes consórcios, a produção de proteínas totais foi determinante para seleção do consórcio que atuaria na bioaugmentação do solo a ser tratado. O consórcio T foi o que demonstrou maior capacidade de crescimento na maioria das concentrações de combustível empregadas. Além

de apresentar tolerância à presença de B10 nas concentrações de 10%, 20%, 30% e 40%, também se mostrou mais eficiente em utilizá-lo como fonte de carbono e energia para seu crescimento, tendo sido, portanto, selecionado para os testes de biorremediação em solo, a partir dos critérios estabelecidos.

A eficiência do tratamento de um local impactado exige a coexistência e a cooperação de micro-organismos especializados, que apresentem complementaridade substrato-específica (Zanaroli et al., 2010). Nesse sentido, há um número cada vez maior de estudos envolvendo a utilização de consórcios microbianos em biorremediação, 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 et al., 2011). No entanto, pesquisas direcionadas ao entendimento da influência que o papel de cada membro do consórcio exerce para a efetividade degradativa do mesmo são escassas.

Sabe-se que o potencial degradador de um consórcio não é necessariamente resultado de um somatório das capacidades individuais de cada um dos isolados que participam dele, uma vez que a ação de determinado micro-organismo pode estar condicionada à presença de outras espécies (Ghazali et al., 2004; Cerqueira et al., 2011). Apesar de Mukred et al. (2008) não apontarem para diferenças significativas no desempenho de degradação de três consórcios, combinados diferentemente, sugere-se, pelos resultados do estudo ora apresentado, que os efeitos sinérgicos positivos entre os membros de uma associação podem variar dependendo da combinação proposta, refletindo potenciais de degradação diferentes para os consórcios.

#### **4.5.1 Avaliação da degradação de ésteres por espectroscopia no infravermelho**

O consumo da fração biodiesel durante o ensaio de seleção com os consórcios C, L, O, R e T foi avaliado por espectroscopia de infravermelho. No entanto, não foi considerado fator de seleção, pois não reflete a capacidade de degradação do restante da mistura, que envolve os componentes derivados de petróleo.

Os resultados obtidos para cada um dos consórcios, em ordem crescente de degradação, para os sistemas contendo as quatro concentrações de B10 propostas (10%, 20%, 30% e 40%), estão resumidamente apresentados na Tabela 11. Pode ser observado que o consórcio L demonstrou o melhor desempenho na degradação de biodiesel para todas as concentrações testadas. Os espectros, ilustrados nas Figuras 11 e 12, mostram o perfil degradativo dos consórcios nos microcosmos com 20% e 40% de combustível, respectivamente. O conjunto de bandas que surge na faixa de onda de  $1745\text{cm}^{-1}$  indica a deformação axial do grupo carbonila (C=O), e na faixa de  $1168\text{cm}^{-1}$ , do grupo C-O dos ésteres. Por serem dois grupos característicos da constituição química do biodiesel são apropriados para detectar sua degradação.

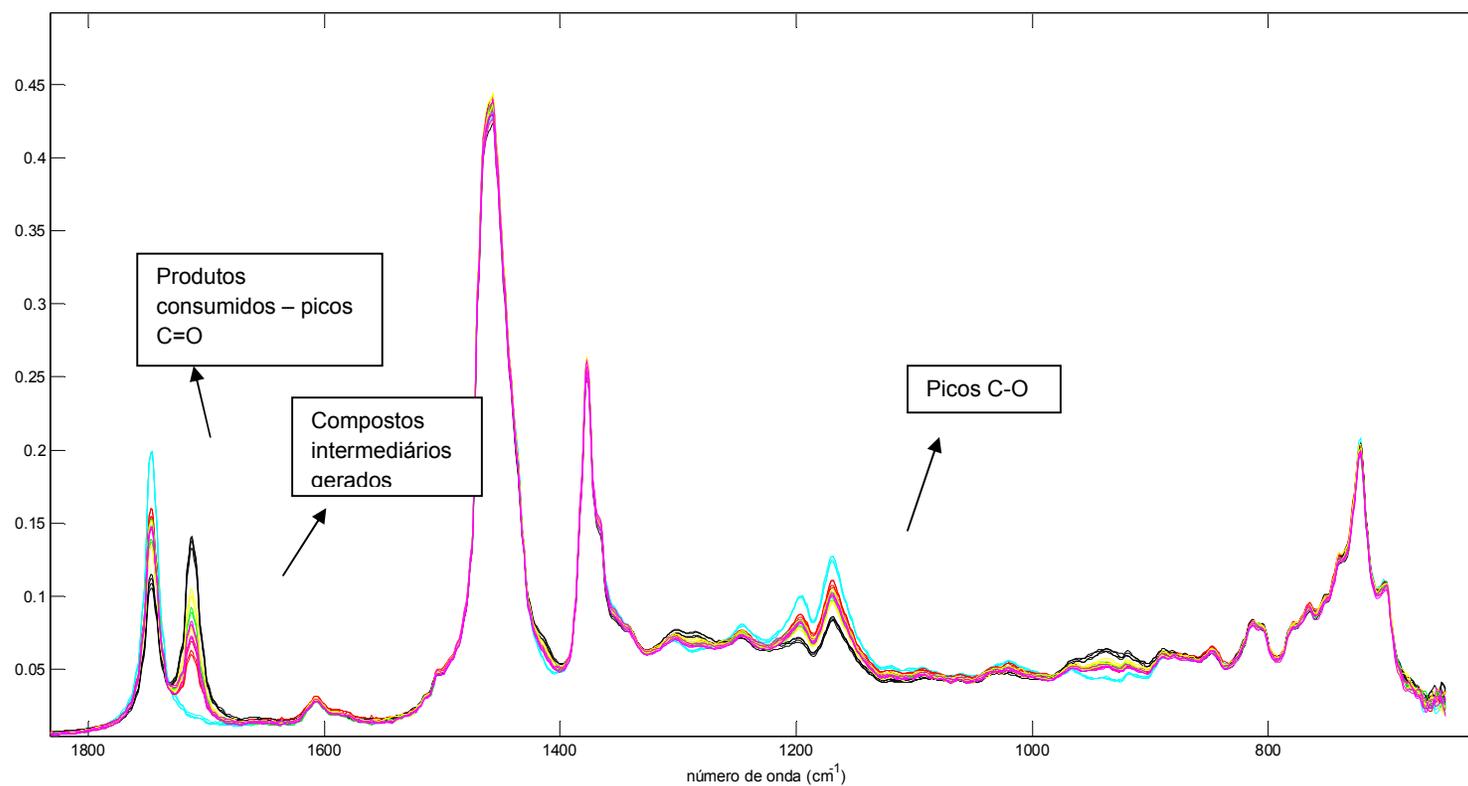
Os sinais da carbonila e do grupo C-O foram mais fracos para o consórcio L, tanto em relação ao controle quanto em relação aos demais consórcios. Esse resultado sugere que sua ação foi mais efetiva na degradação da porção biodiesel da mistura B10. Os espectros permitem ainda verificar que não houve a degradação total dos compostos ésteres presentes

na mistura por nenhum dos sistemas bacterianos, e que a geração de intermediários da degradação (indicados pelo conjunto de picos subsequentes, à direita do da carbonila) foi proporcional ao consumo de biodiesel. Assim, a maior intensidade dos sinais referentes aos intermediários foi observada para o consórcio que apresentou maior atividade de degradação.

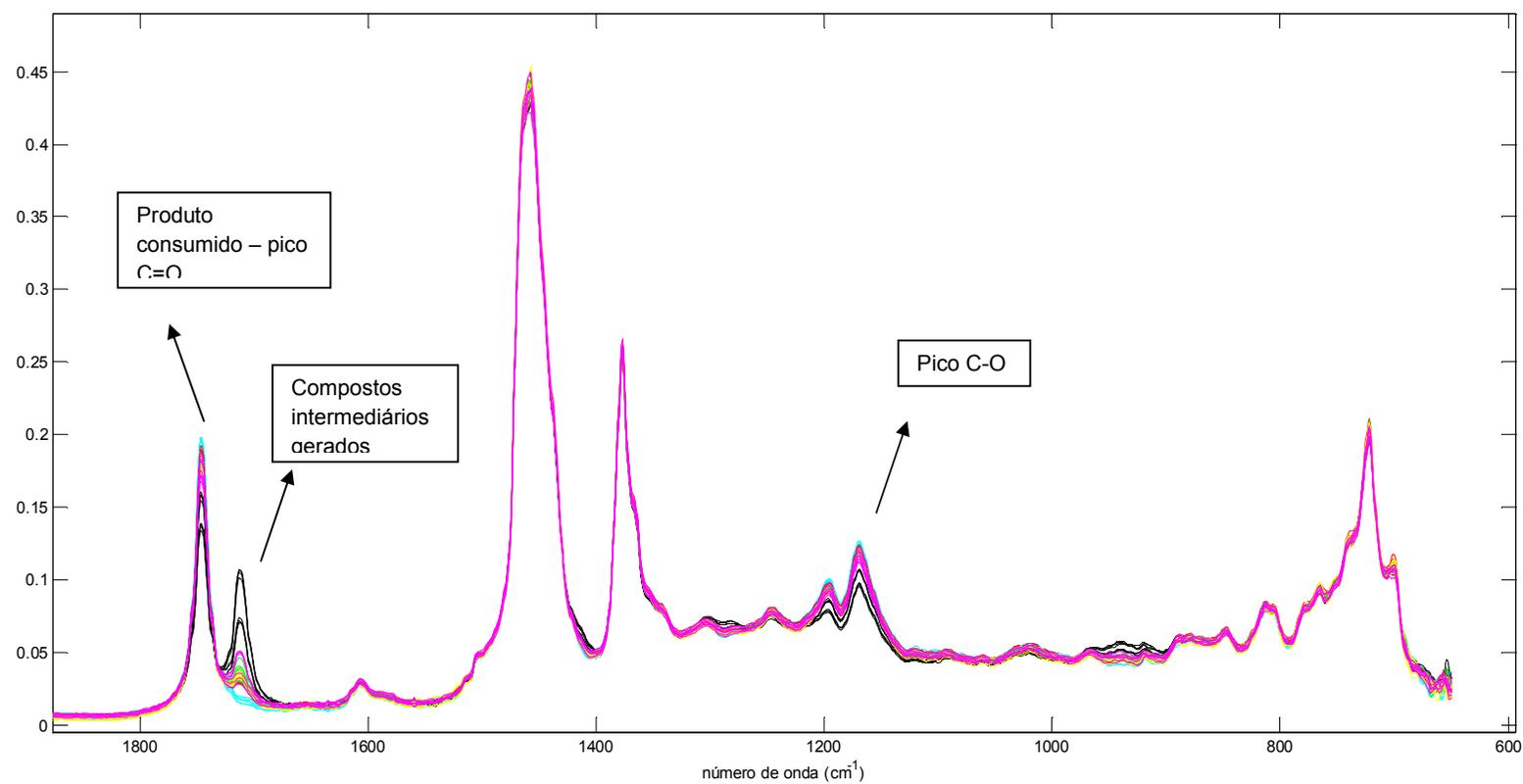
A Análise de Componentes Principais (PCA), reportada na Figura 13, exibe a distribuição dos consórcios C, L, O, R e T de acordo com a performance degradadora de cada um no plano PC1-PC2 para os sistemas com 20% de contaminação. A variação ao longo dos eixos representa 91,6% da variação total. Os consórcios são classificados ao longo de PC1 a partir das mais baixas atividades de degradação (valores negativos) até as mais elevadas (valores positivos). Dessa forma, percebe-se que pela posição assumida pelo consórcio L, ele configura o sistema microbiológico mais ativo. O dendrograma, apresentado na Figura 14, também referente aos sistemas com 20% de combustível, confirma esse perfil, pois agrupa em clusters de mesma coloração os consórcios com capacidades similares de biodegradação. Percebe-se que, à exceção do consórcio L, todos os demais estão reunidos em um mesmo cluster (de coloração verde), indicando que apresentaram comportamentos semelhantes durante o período experimental.

**Tabela 11.** Ordem crescente de desempenho dos consórcios C, L, O, R e T na biodegradação da fração biodiesel de B10, obtida a partir dos espectros no infravermelho, em sistemas contendo 10%, 20%, 30% e 40% da mistura.

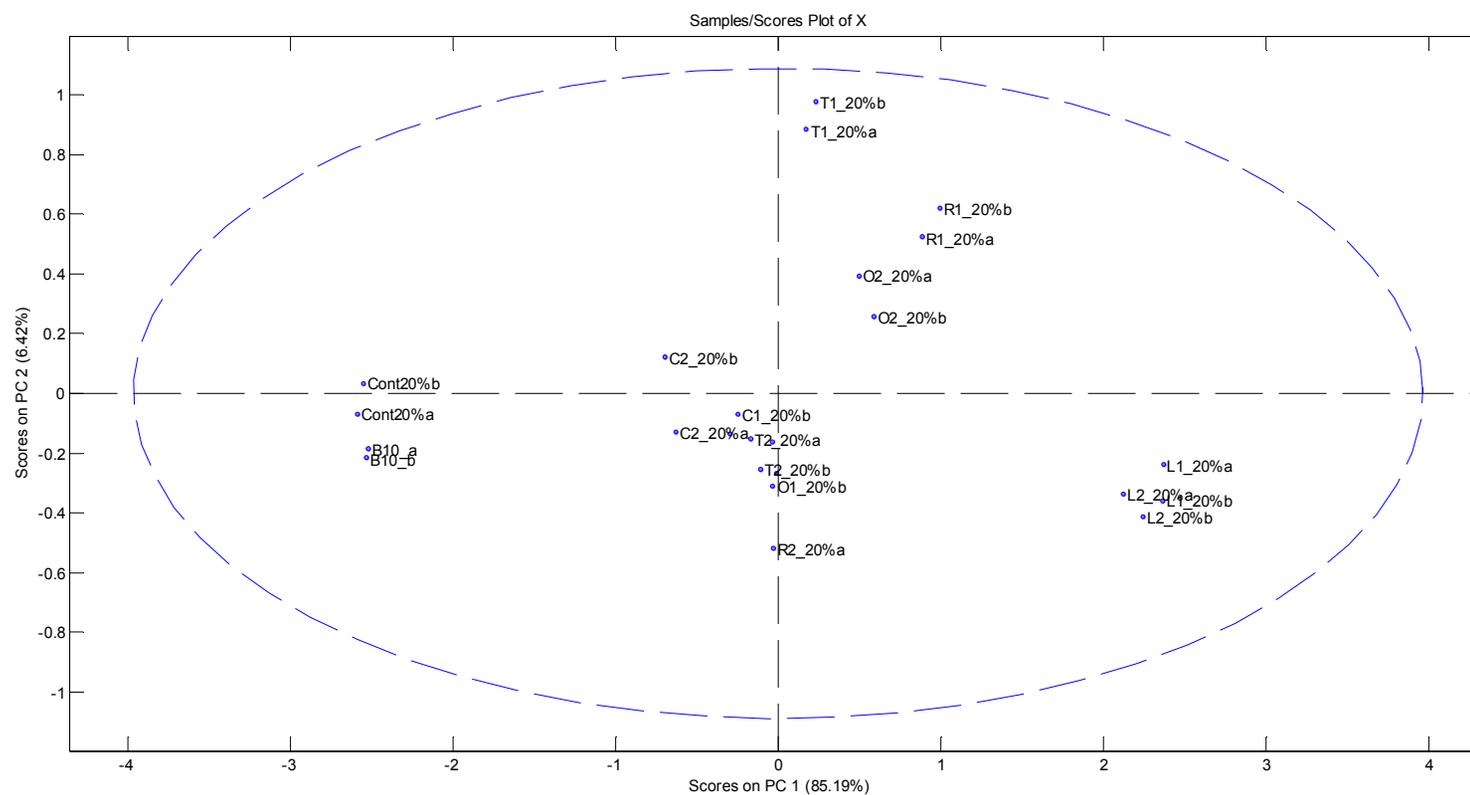
<b>Percentagem de B10 nos sistemas</b>	<b>Desempenho na degradação</b>
10%	L>O>R>C>T
20%	L>R>O>T>C
30%	L>T>O>C>R
40%	L>T>O>R>C



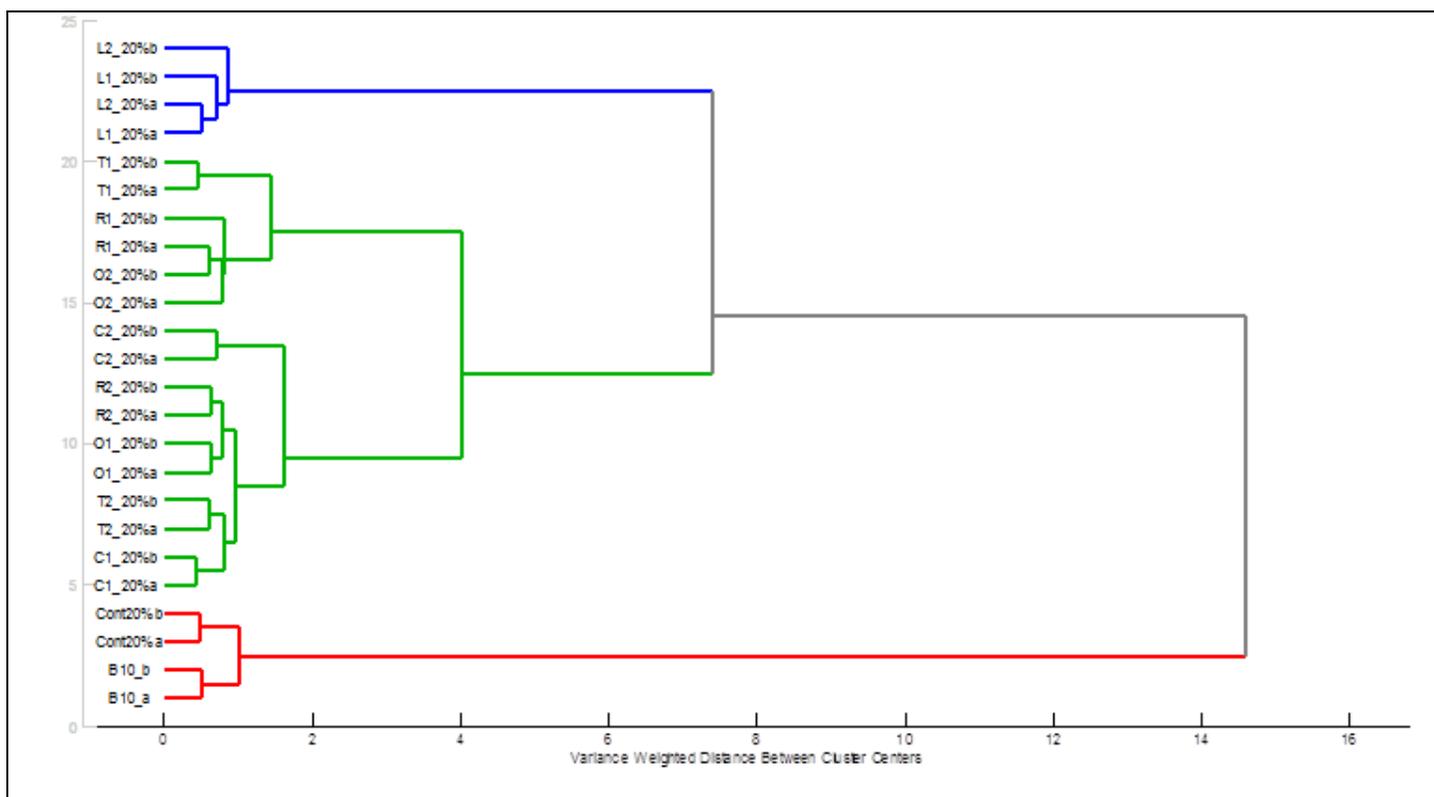
**Figura 11.** Espectro no infravermelho de degradação de biodiesel em microcosmos contendo MM1, com o indicador TTC e 20% de B10 pelos consórcios C, L, O, R e T após 7 dias de incubação. Cian: controle; vermelho: consórcio C; preto: consórcio L; verde: consórcio O; amarelo: consórcio R; cor-de-rosa: consórcio T.



**Figura 12.** Espectro no infravermelho de degradação de biodiesel em microcosmos contendo MM1, com o indicador TTC e 40% de B10 pelos consórcios C, L, O, R e T após 7 dias de incubação. Cian: controle; vermelho: consórcio C; preto: consórcio L; verde: consórcio O; amarelo: consórcio R; cor-de-rosa: consórcio T.



**Figura 13.** Correlação da biodegradação de biodiesel na mistura B10 com os consórcios degradadores C, L, O, R e T em microcosmos com 20% de contaminação, após 7 dias de incubação em MM1 com indicador TTC. a, b: replicatas das amostras.



**Figura 14.** Dendrograma obtido pelo método aglomerativo do software MatLab. Clusters de mesma cor indicam consórcios com perfis semelhantes de degradação de biodiesel em sistemas contendo 20% de B10. a, b: replicatas das amostras.

Diversas características próprias do biodiesel contribuem para sua degradabilidade, tais como a ausência de compostos aromáticos, a presença de ligações éster de alta energia e o seu caráter higroscópico (Passman et al., 2005; Sorensen et al., 2011). Além de ser um produto natural, a composição química dos ésteres de ácidos graxos garante reatividade à molécula (Zhang et al., 1998). O ataque ao grupo carboxil pelos micro-organismos permite que, a partir de uma única etapa enzimática, ácidos graxos livres sejam liberados, para formação de estruturas de membrana ou de derivados da via de  $\beta$ -oxidação (Owsianiak et al. 2009). Relatos de DeMello et al. (2007) e Prince et al. (2008), estudando o comportamento de misturas diesel:biodiesel no meio marinho, indicam que metil-ésteres de ácidos graxos são metabolizados aproximadamente à mesma taxa de n-alcanos. À medida que diversos trabalhos sugerem que a biodegradabilidade das misturas de biodiesel e diesel fóssil aumenta de acordo com concentrações crescentes de biodiesel (Pasqualino et al., 2006), outros autores discordam da existência dessa relação direta. Mariano et al. (2008a) verificaram que, dentre as blendas testadas (B2, B5 e B20), somente a biodegradabilidade da mistura que continha a maior concentração de biodiesel diferiu estatisticamente da do diesel de petróleo. Owsianiak et al. (2009) observaram resultados semelhantes. O incremento da biodegradação das misturas em relação à do petrodiesel somente ocorreu quando a concentração de biodiesel na blenda foi superior a 30%, sendo que a adição de apenas 10% de biodiesel reduziu a biodegradação nessa mesma proporção. No entanto, verificou uma relação linear entre produção de

biomassa e conteúdo de biodiesel, indicando que ele pode favorecer o crescimento microbiano.

A metodologia de análise de degradação de biodiesel por infravermelho apresenta vantagens, dentre as quais pode-se citar acurácia, rapidez na liberação de resultados, custos reduzidos e baixa carência na preparação das amostras. Ainda assim, seu uso com essa finalidade é pouco disseminado nos trabalhos científicos. Comumente a técnica vem sendo empregada na determinação da qualidade de misturas diesel:biodiesel, seja para quantificar seu teor de biodiesel ou para detectar a presença de elementos traços, como glicerol e álcool, buscando verificar adulteração ou contaminação do combustível (Fernandes et al., 2011; Pontes et al., 2011; Dorado et al., 2011).

Em estudos de biodegradação, Akdogan & Pazarlioglu (2011) utilizaram a análise de infravermelho para rastrear a geração de produtos derivados da degradação de fluoreno durante ensaio experimental de 30 dias. Gargouri et al. (2011) monitoraram através de infravermelho a redução da contaminação de águas residuais impactadas por hidrocarbonetos de petróleo ao longo de um tratamento de bioaumentação, identificando as frações do poluente que foram consumidas. Outros trabalhos conduzidos na área inserem a metodologia como ferramenta de avaliação complementar (Pietroletti et al., 2010).

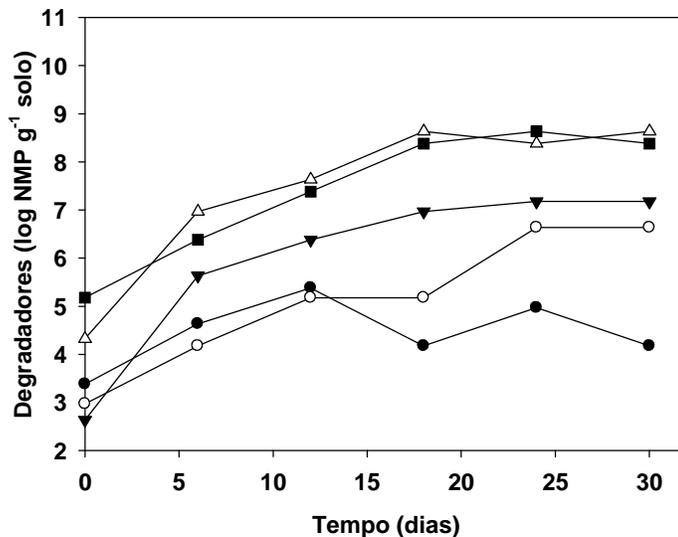
Embora possa ser considerada uma tecnologia emergente, a utilização de análises por infravermelho é promissora, dadas as qualificações já mencionadas. Nesse sentido, os resultados obtidos pelo presente trabalho

podem encorajar a ampliação do uso da técnica, pois demonstram que se trata de uma ferramenta útil, capaz de monitorar variações na concentração de compostos orgânicos durante ensaios de biodegradação.

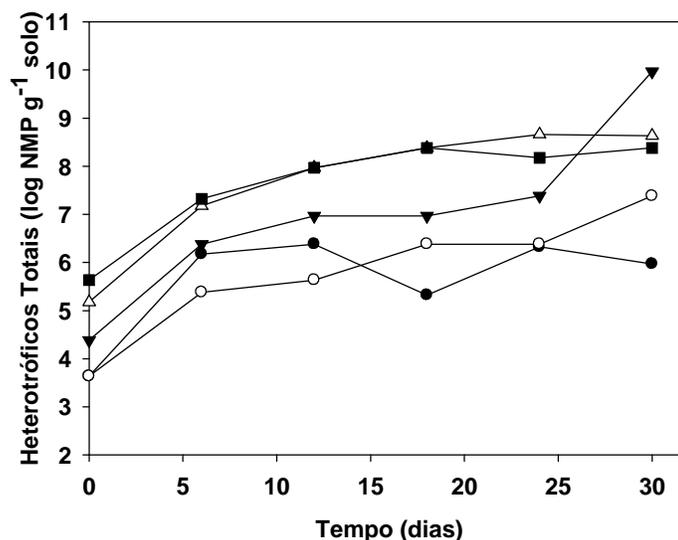
## 4.6 Biorremediação de solo contaminado com B10

### 4.6.1 Avaliação do crescimento microbiano

O desenvolvimento da microbiota nos diferentes sistemas de biorremediação de solo foi avaliado através da estimativa do Número Mais Provável (NMP) das populações de degradadores e de heterotróficos totais. As taxas de crescimento podem ser visualizadas nas Figuras 15 e 16, respectivamente.



**Figura 15.** Estimativa do Número Mais Provável de micro-organismos degradadores em 32 dias de experimento de biorremediação de solo contaminado por B10 (●: controle; ○: atenuação natural; ▼: bioestimulação; △: bioaumentação convencional; ■: bioaumentação sucessiva).



**Figura 16.** Estimativa do Número Mais Provável de micro-organismos heterotróficos totais em 32 dias de experimento de biorremediação de solo contaminado por B10. (●: controle; ○: atenuação natural; ▼: bioestimulação; △: bioaumentação convencional; ■: bioaumentação sucessiva).

Pode ser observado que todos os tratamentos exibiram um aumento em suas populações de micro-organismos degradadores e heterotróficos ao longo dos 30 dias em que foram amostrados. O crescimento foi percebido inclusive para a população do controle, principalmente nos estágios iniciais do ensaio (0 a 12 dias), que pode ter sido decorrente da adição de água destilada para correção da umidade.

O aumento populacional verificado para todos os microcosmos em que foi adicionado B10 permite inferir que a concentração inicial de HTP ( $30.000\text{mg.kg}^{-1}\text{ solo} \pm 2.000\text{mg.kg}^{-1}\text{ solo}$ ) não pareceu causar um efeito inibitório à microbiota tanto nativa quanto exógena.

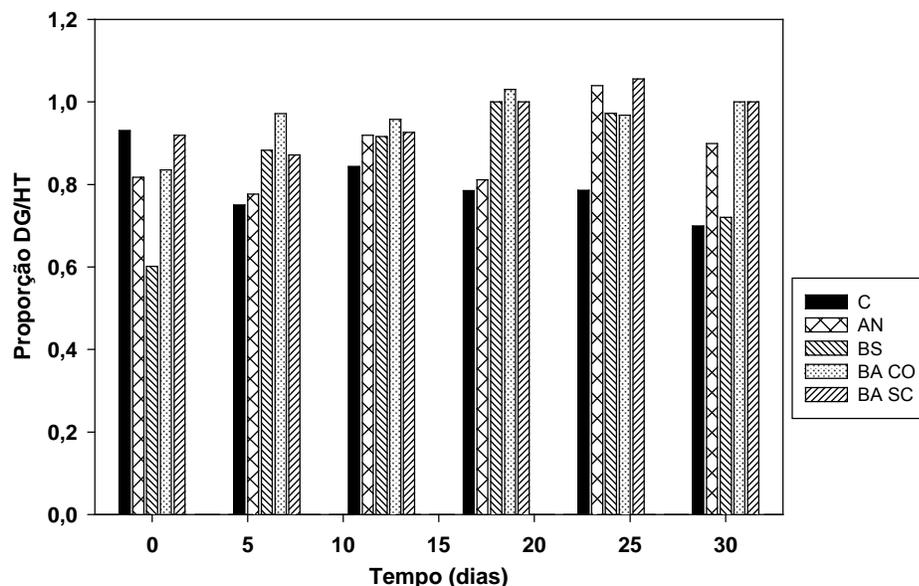
Os resultados obtidos para atenuação natural indicam que a presença do combustível foi capaz de estimular o desenvolvimento da população degradadora residente, provavelmente por ter representado a ela uma fonte adicional de carbono. A concentração de micro-organismos capazes de metabolizar o óleo passou dos níveis iniciais de  $10^3$  para  $10^6$  NMP.g<sup>-1</sup> solo ao longo dos 30 dias. Em um cenário de contaminação recente, como um derramamento decorrente do transporte de óleo, esse perfil é interessante, pois retrata a capacidade de sobrevivência e adaptação dos micro-organismos endógenos a condições adversas. Lembrando que essa população edáfica não apresentava histórico de exposição a combustíveis. Contudo, alguns autores apontam que essa concentração celular inicial não daria suporte a um tratamento de biorremediação dentro de taxas significativas, implicando a inoculação de consórcio degradador (Mishra et al, 2001).

A incorporação de nutrientes ao meio mostrou-se benéfica tanto para o crescimento da população de heterotróficos quanto de degradadores. Pôde ser percebido um aumento populacional considerável pelos tratamentos BA CO e BA SC, que combinaram adição de nutrientes e de inóculo. A associação de bioaumentação e bioestimulação é uma estratégia promissora para acelerar o processo de biorremediação, pois tanto os micro-organismos indígenas quanto os exógenos são beneficiados pela regulação de alguns fatores do meio (El Fantroussi & Agathos, 2005).

As contagens celulares de degradadores nos solos inoculados foram maiores em relação aos microcosmos que não receberam bioaumento em todos os tempos amostrais, indicando que o consórcio bacteriano foi eficiente

em estabelecer-se e manter-se nos sistemas. Apesar de receber uma inoculação adicional no tempo 11, a microbiota degradadora de BA SC apresentou taxas semelhantes de crescimento que a de BA CO. Esse resultado pode ser consequência da ação de fatores limitantes, como disponibilidade de nutrientes minerais ou orgânicos.

Quando a proporção entre as populações de degradadores e heterotróficos (DG/HT) é analisada (Figura 17), observa-se que a partir do tempo 18 a microbiota degradadora passa a representar uma porção maior dentro da população de heterotróficos para os tratamentos de bioestimulação (BS) e de bioaumentação (BA CO e BA SC). Ao final do período amostral, a proporção DG/HT, tanto para o tratamento BA CO quanto para o BA SC, foi de 1, indicando que ao 30° dia ambas as populações apresentavam a mesma concentração de NMP.g<sup>-1</sup> solo.



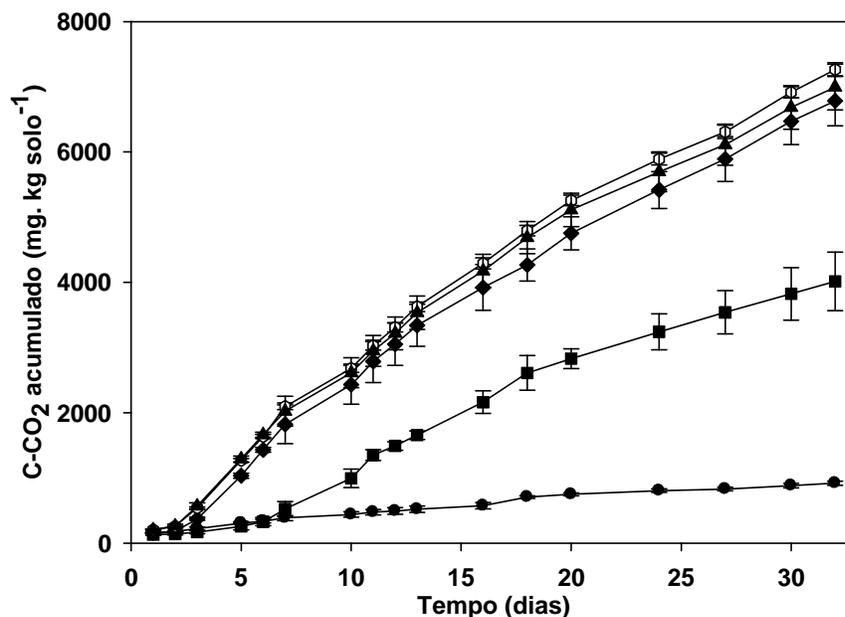
**Figura 17.** Proporção entre as populações microbianas de degradadores (DG) e heterotróficos (HT) estimadas pela contagem do Número Mais Provável durante 32 dias de ensaio de biorremediação de solo contaminado com B10. C: controle; AN: atenuação natural; BS: bioestimulação; BA CO: bioaugmentação convencional; BA SC: bioaugmentação sucessiva.

Considerando que os micro-organismos degradadores são heterotróficos, eles deveriam representar um percentual dentro do total dessa população. No entanto, surpreendentemente, em algumas contagens, a razão DG/HT excedeu a 100%. A razão para essa aparente discrepância pode estar relacionada ao período de incubação estabelecido para cada um dos cultivos. Enquanto que a população de degradadores permaneceu a 30°C por 12 dias, os resultados de crescimento da população de heterotróficos eram avaliados após 48h de incubação. Observações semelhantes derivaram de um estudo de biorremediação de solo contaminado por borra oleosa, conduzido por Tahhan & Abu-Ateih (2009).

#### **4.6.2 Atividade respiratória microbiana**

Os estudos de mineralização envolvendo a quantificação da liberação de CO<sub>2</sub> como indicador da respiração basal microbiana podem fornecer informações sobre a biodegradabilidade dos hidrocarbonetos em solos contaminados (Silva et al., 2009). A quantidade de CO<sub>2</sub> emitida seria proporcional à biodegradabilidade do substrato (Sendzikiene et al., 2007).

Ao considerar a produção acumulada de C-CO<sub>2</sub> durante o transcorrer de 32 dias (Figura 18), verifica-se que todos os microcosmos que foram contaminados por B10 apresentaram atividade respiratória em níveis superiores ao do controle negativo ( $p < 0,05$ ), dando indícios da capacidade microbiana de metabolizar o combustível. A quantificação acumulada de C-CO<sub>2</sub> passou a diferir significativamente do controle no tempo 5 para os tratamentos BS, BA CO e BA SC, e a partir do 11º dia para AN.



**Figura 18.** Produção acumulada de C-CO<sub>2</sub> gerada pela população edáfica de solo contaminado por B10 durante ensaio de biorremediação ao longo de 32 dias. Controle: —●—; Atenuação natural: —■—; Bioestimulação: —◆—; Bioaumentação convencional: —▲—; Bioaumentação sucessiva: —○—.

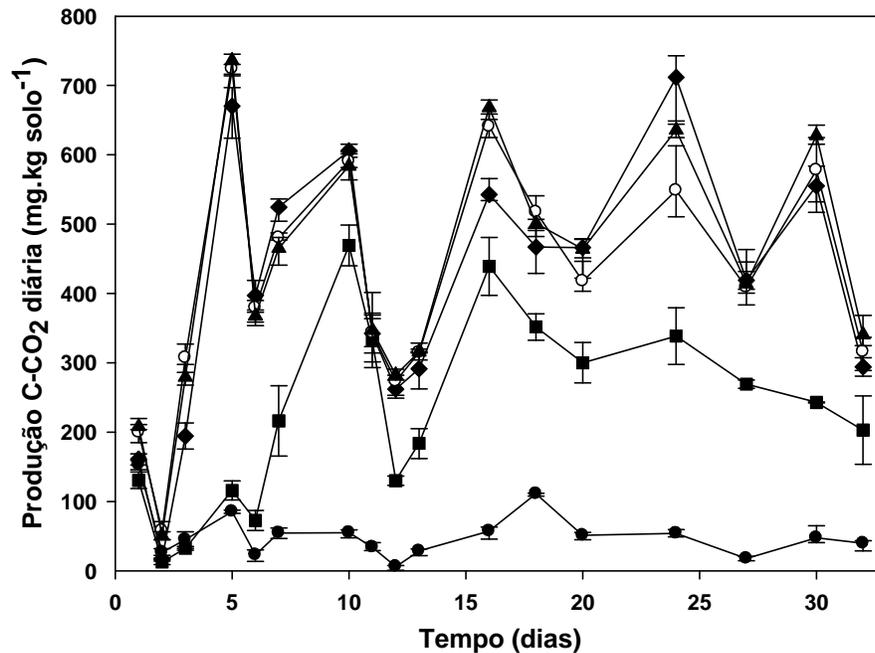
O comportamento entre as comunidades dos solos tratados por BS, BA CO e BA SC não exibiu diferença para a produção de C-CO<sub>2</sub> ( $p > 0,05$ ). No entanto, mostraram-se metabolicamente mais ativos do que o tratado por AN ( $p < 0,05$ ). Isso sugere que diante de condições abióticas adequadas, a microbiota residente teve seu metabolismo e crescimento estimulados, ao ponto de atingir níveis similares de emissão de C-CO<sub>2</sub> que os solos submetidos à adição de inóculo (BA CO e BA SC). Conforme já demonstrado, o crescimento microbiano nesses solos foi superior ao da atenuação natural e ao do controle, indicando que os resultados obtidos permitem que se estabeleça,

em linhas gerais, uma relação direta entre a densidade populacional e a emissão de C-CO<sub>2</sub>.

A Figura 19 traz a produção diária, nos tempos amostrados, do C-CO<sub>2</sub> gerado pelas comunidades microbianas. É possível perceber que os tratamentos BS, BA CO e BA SC apresentaram um perfil semelhante na oscilação dos valores e que foram esses os sistemas que atingiram as taxas produtivas mais elevadas. Ainda é possível verificar que todos os microcosmos passaram por uma fase adaptativa no período inicial do experimento, entre os dias 1 e 3, quando a partir de então a produção de C-CO<sub>2</sub> começou a crescer. Esse período de adaptação não foi verificado na contagem das populações heterotrófica e degradadora, pois a estimativa do NMP, inicialmente, foi realizada na montagem dos microcosmos e no 6° dia, quando a microbiota já estava se recompondo.

A produção máxima percebida foi ao dia 5. No entanto, picos elevados de geração de C-CO<sub>2</sub> (acima de 500mg.kg<sup>-1</sup> solo) continuaram sendo registrados ao longo do período experimental para BS, BA CO e BA SC. O fato pode estar relacionado às características do contaminante, já que Cerqueira (2011), estudando a biorremediação de borra oleosa em solo, observou que a máxima produção de C-CO<sub>2</sub> deu-se em 10 dias de processo, com substancial diminuição nas medições posteriores. No entanto, Silva et al. (2012) verificaram taxas de liberação de C-CO<sub>2</sub> em biorremediação de solo contaminado por B20 variando em torno de 30mg.kg<sup>-1</sup> solo, com máxima produção ao 25° dia de ensaio. Portanto, não só o contaminante, mas outros fatores, como o

metabolismo microbiano e o perfil físico-químico do solo podem ter conduzido ao padrão observado no presente trabalho.



**Figura 19.** Produção diária de C-CO<sub>2</sub> gerada pela população edáfica de solo contaminado por B10 durante ensaio de biorremediação ao longo de 32 dias. Controle: —●—; Atenuação natural: —■—; Bioestimulação: —◆—; Bioaumentação convencional: —○—; Bioaumentação sucessiva: —▲—.

A produção de C-CO<sub>2</sub>, bem como as taxas de crescimento populacional, não permitiram que fossem percebidas diferenças acentuadas entre os tratamentos de bioaumentação convencional (com somente uma inoculação) e bioaumentação sucessiva (com inoculações nos tempos 0 e 11). Ao contrário do que alguns autores registraram (Tahhan et al., 2011) não observou-se uma segunda fase exponencial na emissão de C-CO<sub>2</sub> após a inoculação adicional do consórcio. No entanto, para as duas situações foi

possível verificar que a microbiota desses solos permaneceu ativa durante todo o período experimental.

A quantificação do CO<sub>2</sub> liberado é uma das formas de avaliar a atividade metabólica microbiana nos solos em condições aeróbicas (Atlas, 1991). A técnica provê importante informação acerca da biodegradação dos hidrocarbonetos, pois é indicativa do grau de mineralização dos compostos presentes no substrato (Horel & Schiewer, 2009), e, portanto, da completa degradação dos mesmos (Mariano et al., 2008a). No entanto, a quantidade do combustível degradado pode ser subestimada, caso parte da matéria orgânica degradada seja utilizada na produção de biomassa, ou superestimada, se o CO<sub>2</sub> produzido provir da degradação de uma fonte de carbono disponível no solo que não o contaminante (Horel & Schiewer, 2009). Para fornecer maior acurácia aos dados, a degradação dos hidrocarbonetos foi também avaliada por cromatografia gasosa.

#### **4.6.3 Degradação de hidrocarbonetos de petróleo**

Muitos estudos têm questionado a utilização de bactérias cultivadas em laboratório em ensaios de bioaugmentação. Geralmente a estratégia mostra melhores resultados em sistemas confinados do que em ambientes naturais. Essa ineficiência pode estar relacionada à baixa taxa de sobrevivência do inóculo e à baixa disponibilidade dos contaminantes (El Fantroussi & Agathos, 2005; Smith et al., 2005; Hesselsoe et al., 2008). Como consequência, a bioaugmentação acaba por demonstrar-se eficiente somente nos estágios iniciais do tratamento (Hosokawa et al., 2009). Para tanto, estabeleceu-se que,

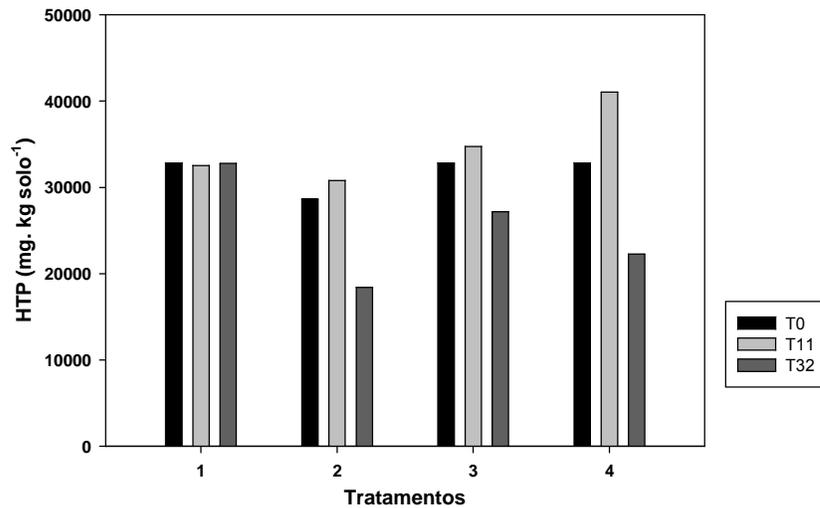
além da inoculação realizada na montagem dos microcosmos, uma segunda seria procedida ao tempo 11, no intuito de incrementar a eficiência da estratégia para redução dos teores de HTP em solo contaminado pela mistura diesel:biodiesel B10.

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 12, que mostra o percentual de biodegradação de HTP verificado para cada tratamento, e na Figura 20, que expõe as variações quantitativas dos teores de HTP nos tempos 0, 11 e 32, mensuradas por cromatografia gasosa.

**Tabela 12.** Biodegradação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) por diferentes tratamentos de biorremediação.

Tratamentos	Biodegradação (%)		
	T0 – T11	T11 – T32	T0 – T32
AN	0,89	*	0,16
BS	*	40,17	35,7
BA CO	*	21,75	17,1
BA SC	*	45,77	32,2

AN = atenuação natural; BS = bioestimulação; BA CO = bioaugmentação convencional; BA SC = bioaugmentação sucessiva; T = tempo; \* = não houve decréscimo nos níveis de HTP nesse período amostral.



**Figura 20.** Hidrocarbonetos Totais de Petróleo ( $\text{mg.kg}^{-1}$  solo) quantificados por cromatografia gasosa em ensaio de biorremediação de solo contaminado por B10. As leituras foram realizadas aos tempos 0, 11 e 32, para os tratamentos de 1 – atenuação natural; 2 – bioestimulação; 3 – bioaugmentação convencional e 4 – bioaugmentação sucessiva.

É possível perceber que os solos em que as estratégias de bioestimulação e bioaugmentação foram aplicadas apresentaram percentuais de degradação superiores ao da atenuação natural (Tabela 12). Em alguns períodos, especialmente durante os 11 dias iniciais de incubação, houve um incremento de HTP no solo, possivelmente decorrente da liberação de compostos orgânicos intermediários, derivados do processo de degradação (Figura 20).

Dentre os percentuais de redução de HTP percebidos pelos solos, destacam-se os tratamentos BS e BA SC, com 35,7% e 32,2%, respectivamente. Esse resultado sugere que o consórcio bacteriano contribuiu para a degradação de hidrocarbonetos somente quando foi adicionado ao solo

em dois momentos. No entanto, a atividade degradadora exibida pelo consórcio introduzido foi similar a da microbiota nativa, que respondeu satisfatoriamente ao estímulo gerado pela correção de alguns parâmetros abióticos do meio, como pH, relação C:N e umidade.

Geralmente, a bioaugmentação é conduzida através de uma única aplicação do consórcio no início do tratamento (Bento et al., 2005; Karamalidis et al., 2010; Kauppi et al., 2011). São poucos os dados referentes à eficiência da biorremediação de solo contaminado por derivados de petróleo em relação a inoculações sucessivas. No entanto, trabalhos recentes envolvendo mais de uma inoculação têm obtido resultados satisfatórios no tratamento de solos impactados, chegando a uma eficiência 30% superior à bioaugmentação convencional na biorremediação de solo contaminado com óleo diesel (Lebkowska et al., 2011) e com borra oleosa (Tahhan et al., 2011).

Ainda que no presente trabalho os níveis de degradação obtidos para a estratégia BA SC tenham sido similares aos observados para BS, a inoculação realizada ao tempo 11 gerou um efeito positivo para a biodegradação em relação à bioaugmentação convencional. Ao ponderar os níveis de redução de hidrocarbonetos no período entre 11 e 32 dias, fica claro que enquanto BA SC percebeu um percentual de biodegradação de 45,77%, o solo tratado com apenas uma inoculação atingiu somente 21,75% de eficiência. Sugere-se assim que a introdução do consórcio no tempo inicial poderia ter gerado um impacto negativo sobre as taxas de degradação, recuperadas após a segunda inoculação. Esse aparente efeito negativo é relatado por alguns autores como consequência do uso de consórcios alóctones (El Fantroussi &

Agathos 2005; Xu & Lu, 2010). Ruberto et al. (2009) testaram a capacidade metabólica de degradação de três consórcios bacterianos. Verificaram que os micro-organismos de procedência exógena foram os que promoveram as maiores perturbações no sistema, causando um impacto negativo na biorremediação.

Comparado a alguns estudos envolvendo biorremediação de solo, o nível de redução de hidrocarbonetos exibido nesse trabalho foi relativamente baixo. No entanto, considerando que na metade final do processo houve um incremento na degradação, é possível que a população microbiana requeresse um período mais longo do que 32 dias para reduzir os teores de HTP até valores menores. Silva et al. (2012) analisaram a biodegradabilidade de B5, B20 e B50 em solo contaminado. Após 60 dias de incubação, as taxas de degradação atingidas foram de 51%, 80% e 62%, respectivamente. Contudo, além do tempo, o fator concentração do contaminante pode também ter influenciado. Li et al. (2007) avaliaram a biodegradação de óleo diesel nas concentrações de 500, 1000, 5000, 10000, 30000 e 50000mg.kg<sup>-1</sup> solo durante 110 dias. As menores taxas de remoção biótica de HTP foram assumidas pelos sistemas com as duas maiores concentrações testadas, atingindo 49,5% e 36,8%, respectivamente. Os autores concluíram que a degradação de hidrocarbonetos de petróleo procede mais rapidamente quando submetida a contaminações mais baixas, verificando percentagens próximas às do presente estudo, quando concentrações do combustível similares as aqui empregadas foram investigadas.

A taxa de degradação de hidrocarbonetos é comumente limitada pela carência de nutrientes (N, P). Solos com alta carga de contaminação apresentam um excesso de carbono, que tende a desequilibrar sua razão C:N:P (Ruberto et al., 2009; Kauppi et al., 2011). Considerando que é possível otimizar a relação C:N:P através da adição de doses e de fontes de nutrientes adequadas (Peltola et al., 2006), a estratégia de bioestimulação tem-se mostrado eficiente em muitos casos, ainda que nem sempre sejam observadas diferenças significativas nas taxas de remoção de HTP entre solos bioestimulados e bioaumentados (Ruberto et al., 2009; Kauppi et al., 2011). No entanto, geralmente esse resultado está associado à biorremediação de solos naturalmente contaminados, que apresentam uma biota adaptada à presença do poluente. Assim, o inusitado nos resultados deste estudo é que embora as populações microbianas do solo tratado não tenham sido previamente expostas a contaminantes derivados de petróleo, diante de estímulos apropriados, foram capazes de expressar seu potencial degradador de maneira eficiente e em níveis discretamente maiores que o solo tratado com inóculo adaptado. Contudo, considerando o debate que a literatura apresenta em relação ao uso da bioaumentação, o emprego da estratégia por inoculações sucessivas deve ser melhor investigado. Por se tratar de uma tecnologia ainda emergente, exige aprimoramento para que seus resultados sejam otimizados, antes do estabelecimento de conclusões definitivas.

#### 4.6.4 pH

A importância de condições adequadas do meio físico para a ação microbiana é bem documentada pela literatura (Chang et al., 2011; Powell et al., 2010; Horel & Schiewer, 2009). Especificamente em relação ao pH e à umidade, estudos de biorremediação de solo contaminado por antraceno, conduzidos por Jacques et al. (2010), demonstraram que a umidade do solo foi fator limitante para o processo de mineralização do composto e que as maiores taxas de biodegradação foram atingidas na condição do maior valor de pH (7,5) testado.

Os valores de pH do solo nos tempos 0, 10 e 32 constam na Tabela 13. Percebe-se que a incorporação de calcário corretivo, realizada nos tratamentos BS, BA CO e BA SC, foi eficiente no provimento das condições adequadas para o crescimento da população edáfica, ao elevar o pH para valores em torno de 6,0.

**Tabela 13.** Valores de pH monitorados nos tempos 0, 10 e 32 de ensaio de biorremediação de solo contaminado por B10.

Tratamentos	pH		
	T0	T10	T32
Controle	4,9	5,2	5,5
Atenuação Natural	5,0	4,7	5,3
Bioestimulação	6,1	6,4	6,9
Bioaumentação Convencional	6,1	6,5	6,7
Bioaumentação Sucessiva	6,0	6,4	6,6

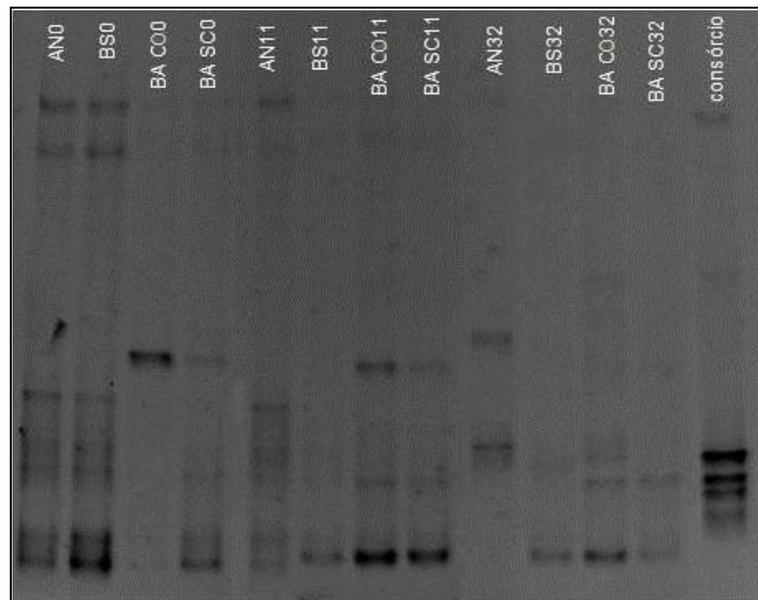
O pH dos solos bioestimulados e bioaumentados manteve-se estatisticamente diferente do solo controle durante todo o período de incubação ( $p < 0,05$ ). As leituras dentro do mesmo tratamento, considerando BS, BA CO e

BA SC, não diferiram ao longo do tempo ( $p > 0,05$ ), provavelmente pela ação prolongada do  $\text{CaCO}_3$ , combinada às propriedades tamponantes do solo. Por aproximar-se da neutralidade, condição apropriada ao crescimento bacteriano, a variação do pH não representou um fator de efeito negativo sobre o desenvolvimento da biota edáfica nesses solos. A composição da comunidade bacteriana, em riqueza e diversidade, está estritamente relacionada ao pH do solo, como evidenciaram os estudos, em escala continental, de Lauber et al. (2009) e Fierer & Jackson (2006). O pH afeta diretamente a atividade dos micro-organismos por meio dos efeitos dos íons  $\text{H}^+$  na permeabilidade celular e na atividade enzimática, assim como, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade de metais (Caldwell, 2000).

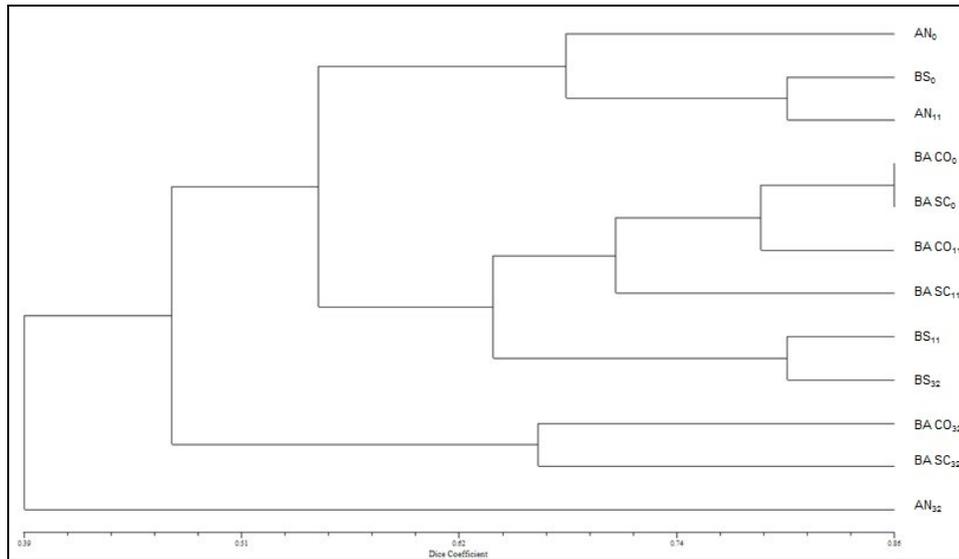
#### **4.6.5 Dinâmica e estrutura da comunidade bacteriana**

A degradação de hidrocarbonetos é resultado da estrutura da comunidade microbiana, bem como de seu potencial genético e do dinamismo das interações entre seus componentes (Taccari et al., 2012). Para compreender melhor como a biorremediação influencia a biodiversidade das populações edáficas, as alterações ocorrentes ao longo do período de incubação foram acompanhadas por análise de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). O perfil gerado representa a estrutura da comunidade microbiana e o acompanhamento durante diferentes tempos do processo de biorremediação reflete a dinâmica da mesma em resposta aos diferentes tratamentos empregados.

Os efeitos dos tratamentos de biorremediação sobre a estrutura e dinâmica da comunidade bacteriana dos solos foram investigados por DGGE nos dias 0, 11 e 32, sendo que a amostragem realizada ao tempo 11 deu-se anteriormente à segunda inoculação do consórcio em BA SC. O perfil de bandas obtido pode ser visualizado na Figura 21, e o dendrograma derivado dele consta na Figura 22. A comunidade bacteriana do solo controle não foi submetida à análise, pois a ausência do combustível confere uma situação diferenciada na extração de DNA, com relação à extração das demais amostras.



**Figura 21.** Perfis de bandejamento obtidos por DGGE a partir da amplificação da região V3 do gene 16S rRNA em resposta aos tratamentos de atenuação natural (AN), bioestimulação (BS), bioaumentação convencional (BA CO) e bioaumentação sucessiva (BA SC), em amostragens realizadas nos tempos 0, 11 e 32.



**Figura 22.** Dendrograma de comparação das comunidades microbianas baseado no padrão de bandas do DGGE, gerado a partir de amostras dos solos tratados por atenuação natural (AN), bioestimulação (BS), bioaumentação convencional (BA CO) e bioaumentação sucessiva (BA SC), nos tempos 0, 11 e 32. O eixo X representa a similaridade entre as comunidades, baseada no coeficiente Dice.

As amostras iniciais dos tratamentos atenuação natural e bioestimulação (AN<sub>0</sub>, BS<sub>0</sub> e AN<sub>11</sub>) apresentaram-se reunidas em um mesmo cluster, cujo padrão de bandeamento exibiu um perfil uniforme, com cerca de 68% de similaridade. Neste caso, pode-se inferir que os perfis gerados por DGGE (Figura 21) a partir das amostras AN e BS refletem a população nativa do solo. A amostra relativa ao tratamento de AN, do tempo 11, agrupada com AN<sub>0</sub> e BS<sub>0</sub>, indica que a biota nativa, mostrou-se tolerante ao contaminante, ou seja, a contaminação do solo com B10 não demonstrou efeitos tóxicos sobre a população indígena.

O perfil e a dinâmica estrutural diferenciadas da comunidade de AN ficaram mais evidentes ao longo do período, já que ao 32° dia ela foi agrupada

separadamente de todas as demais. A bibliografia consultada não indica um resultado semelhante em trabalhos já realizados. Para Taccari et al. (2012), por exemplo, o tratamento de atenuação natural, aos 40 dias de ensaio, foi agrupado com cerca de 75% de similaridade ao solo tratado pela combinação de composto nutricional, consórcio microbiano e biossurfactante. Contudo, há relatos de que o acúmulo de metabólitos derivados da oxidação do contaminante pode reduzir a viabilidade de diversos grupos degradadores de hidrocarbonetos ao longo do processo (Reddy et al., 2011). O fato, associado ao crescimento de grupos específicos presentes no solo, capazes de utilizar mais eficientemente o combustível adicionado, pode constituir uma justificativa para o distanciamento da comunidade de AN<sub>32</sub> em relação a dos demais solos (Evans et al., 2004). A Figura 21 indica o aparecimento de duas bandas com destacada intensidade, não visualizadas nos tempos 0 e 11.

Os efeitos promovidos pela adição de nutrientes, no tratamento de bioestimulação, refletiram alterações na estrutura da comunidade entre os tempos 0 e 11. No entanto, não foram detectadas diferenças no período final do experimento, já que as comunidades de BS<sub>11</sub> e de BS<sub>32</sub> foram reunidas em um mesmo agrupamento, demonstrando similaridade. Assim pode-se sugerir que o tratamento de bioestimulação, conduziu a modificações estruturais nas populações edáficas, principalmente, durante os primeiros 11 dias após a adição dos nutrientes. No entanto, esta adição não levou a significativas alterações na população ao final do experimento, pois as avaliações realizadas nos dias 11 e 32 mostram que BS<sub>11</sub> e BS<sub>32</sub> estão em um agrupamento com cerca de 80% de similaridade, ou seja, a comunidade se manteve estável

durante a metade final do processo. Resultados semelhantes foram obtidos por Evans et al. (2004), que relataram um distúrbio na estabilidade das populações depois de 15 dias de experimento, comparando perfis de comunidades edáficas bioestimuladas pela adição de nutrientes, na presença e na ausência de óleo. Concluíram que as mudanças detectadas foram predominantemente induzidas pela introdução de nutrientes do que pela do óleo.

O cluster formado por BA CO<sub>0</sub>, BA SC<sub>0</sub>, BA CO<sub>11</sub> e BA SC<sub>11</sub> indica que no período inicial do experimento a estrutura da comunidade bacteriana manteve-se semelhante para esses diferentes tratamentos, permanecendo os tempos 0 e 11 agrupados com cerca de 70% de similaridade. As comunidades dos microcosmos responderam de forma similar à adição do consórcio alóctone. Uma mudança na composição das populações foi percebida somente durante os dias 11 e 32 do ensaio em ambos os tratamentos. A estrutura e dinâmica das mesmas distanciaram-se da condição inicial, mas entre os dois tratamentos permaneceram semelhantes. Esse resultado permite-nos inferir que a introdução adicional do inóculo no tratamento BA SC, realizada no tempo 11, não promoveu uma modificação significativa da comunidade em relação ao tratamento bioaumentado somente no tempo 0 (BA CO), pois BA SC<sub>32</sub> e BA CO<sub>32</sub> foram reunidos em um mesmo cluster no tempo 32, com cerca de 65% de similaridade. Viñas et al. (2005) conduziram um experimento de biorremediação em solo contaminado com cresoato. Dentre as estratégias de tratamento empregadas, foram utilizadas a bioestimulação e a bioaumentação, com inoculação do consórcio microbiano em 5 momentos diferentes do período experimental (200 dias). Ao contrário do observado pelos autores, que

verificaram similaridade entre as comunidades do solo inoculado e do estimulado pela adição de nutrientes durante os 45 dias iniciais de ensaio, no presente trabalho as comunidades bioestimuladas (BS) e bioaumentadas (BA CO e BA SC) distanciaram-se entre si ainda no tempo 0. O fato indica que a presença do consórcio pode ter interferido na dinâmica estrutural da biota autóctone, caso contrário os tratamentos de bioaumentação estariam relacionados mais intimamente ao tratamento BS (Ciric et al., 2010), apesar de as bandas representantes do consórcio não serem claramente observadas ao longo do período de incubação (Figura 21). Autores reportam que a não detecção do consórcio no perfil de bandeamento do DGGE não implica a ausência de contribuições do mesmo ao processo de biorremediação. Mesmo que não se possa evidenciar, durante o tratamento, a presença dos micro-organismos degradadores adicionados, eles podem incrementar a capacidade de degradação da microbiota nativa, liberando elementos genéticos móveis e plasmídeos conjugativos aos micro-organismos residentes (Sarand et al., 2000).

Assim, de maneira geral, os resultados gerados permitiram que fossem identificadas alterações na comunidade bacteriana do solo biorremediado sob as diferentes estratégias ao longo dos 32 dias. De acordo com Li et al. (2007), concentrações de óleo  $\geq 10000 \text{ mg.kg}^{-1}$  solo podem afetar significativamente tanto a atividade microbiana do solo quanto a estrutura da comunidade. Conforme revelam os dados da Tabela 14, à exceção de BA CO, todos os demais microcosmos apresentaram uma redução em sua diversidade de espécies.

**Tabela 14.** Índice de diversidade Shannon-Weaver ( $H'$ ) dos solos biorremediados pelos tratamentos de atenuação natural (AN), bioestimulação (BS), bioaumentação convencional (BA CO) e bioaumentação sucessiva (BA SC) nos tempos 0, 11 e 32.

Tratamentos	$H'$		
	T0	T11	T32
AN	2,48	2,30	2,08
BS	2,30	1,39	1,79
BA CO	1,94	1,79	2,19
BA SC	1,94	2,08	1,39

Efeito semelhante também foi verificado por Taccari et al. (2012). Aos 40 dias do processo, os autores observaram uma perda de biodiversidade tanto para os solos bioestimulados quanto para os bioaumentados, resultante da ação tóxica do combustível. No entanto, o inverso ocorreu em ensaio de biorremediação de solo conduzido por Aleer et al. (2011). Os autores revelaram que, no primeiro mês de incubação, a diversidade populacional bacteriana aumentou, percebendo uma queda somente na etapa final do processo (entre a 4<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas). Essas variações nos dados apresentados pela literatura podem estar relacionadas a diversos fatores. Dentre eles, pode estar o tipo de solo utilizado em cada experimento. Enquanto Aleer et al. (2011) investigaram os efeitos da biorremediação sobre a comunidade microbiana de um solo com prévia contaminação por hidrocarbonetos, Taccari et al. (2012) e Li et al. (2007) realizaram seus ensaios de biodegradação em um solo sem histórico de contaminação, assim como o foi no presente trabalho. Assim, o fato de o solo naturalmente contaminado dispor de micro-organismos adaptados, poderia excluir uma fase de adaptação da comunidade, e conseqüentemente a diminuição da biodiversidade no período inicial do processo não seria evidenciada.

## 5. CONCLUSÕES

A amostra de solo com contaminação com óleo diesel apresenta micro-organismos potencialmente degradadores de diesel:biodiesel.

As combinações propostas para os isolados, na formação de consórcios bacterianos, refletem diferentes comportamentos de biodegradação, evidenciados pela cinética de crescimento celular e pela assimilação da fase éster de B10.

A dinâmica estrutural das comunidades edáficas evolui diferentemente de acordo com a estratégia de biorremediação empregada.

As percentagens de remoção de HTP do solo são mais expressivas quando as estratégias bioestimulação e bioaugmentação sucessiva são aplicadas.

Comunidades microbianas edáficas, sem prévia exposição a contaminantes derivados de petróleo, são capazes de expressarem seu potencial degradador diante de estímulos apropriados.

A inoculação adicional do consórcio em bioaugmentação sucessiva produz efeitos positivos para a biodegradação superiores aos obtidos pela bioaugmentação convencional.

## 6. PERSPECTIVAS

Identificar as frações de hidrocarbonetos assimiladas durante o processo de biorremediação de solo, bem como quantificar a degradação da fase éster da mistura diesel:biodiesel.

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

Avaliar a eficiência da bioaugmentação sucessiva através da inoculação de consórcio autóctone.

Aprimorar os métodos de inoculações sucessivas, propondo diferentes tempos para a adição do consórcio.

Investigar a aplicabilidade da estratégia de bioaugmentação em escala de campo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKDOGAN, H.A. & PAZARLIOGLU, N.K.. Fluorene biodegradation by *P. ostreatus* - Part I: Biodegradation by free cells. **Process Biochemistry**, Reino Unido, v. 46, p. 834–839, 2011.

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, p. 121–130, 2011.

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

ANTIZAR-LADISLAO, B.. Bioremediation: working with bacteria. **Elements**, Canadá, v. 6, p. 389–94, 2010.

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

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

ATLAS, R.M. Microbial hydrocarbon degradation: bioremediation of spills. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Reino Unido, v. 52, p. 149-156, 1991.

ATTEIA, O. & GUILLOT, C. Factors controlling BTEX and chlorinated solvents plume length under natural attenuation conditions. **Journal of Contaminant Hydrology**, Holanda, v. 90, p. 81–104, 2007.

BELHAJ, A.; DESNOUES, N.; ELMERICH, C.. Alkane biodegradation in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a polluted zone: identification of *alkB* and *alkB* -related genes. **Research in Microbiology**, Holanda, v. 153, p. 339–344, 2002.

BENTO, F. M.. **Biocorrosão do aço ASTM A283-93-C em sistemas diesel/água e o efeito de um biocida**. Tese (Doutorado em Engenharia) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e dos Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 192f., 2001.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER, W.T. Bioremediation approaches for soil contaminated with diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v.34, p 65-68, 2003.

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

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.

BOONTAWAN, A. & BOONTAWAN, P.. Isolation and characterization of *Jatropha* oil degradation by *Enterococcus faecalis* and *Burkholderia cenocepacia* W-1 under anaerobic condition. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 63, p. 13841-13851, 2011.

BRADDOCK, J.F. & CATTERALL, P.H..A simple method of enumerating gasoline- and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, USA, 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**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANCO, R.; ALPOIM, M.C.; MORAIS, P.V.. *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.

CALDWELL, D.R.. **Microbial physiology and metabolism**. 2.ed. Belmont: Star, 403p., 2000.

CALVO, C.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; FANDIÑO, C.G.; LAGUNA, J.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.. Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropic* in different hydrocarbon bioremediation assays. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1493–1501, 2008.

CARVALHO, C.C.C.R.; WICK, L.Y.; HEIPIEPER, H.J. Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus ery-thropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Alemanha, v. 82, p. 311–320, 2009.

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

CERQUEIRA, V.S.; HOLLENBACH 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**, Holanda, v. 102, p. 11003–11010, 2011.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>, acessado em 28 de fevereiro de 2012.

CHAN, G.F.; RASHID, N.A.A.; CHUA, L.S.; AB LLAH, N.; NASIRI, R.; IKUBAR, M.R.M.. Communal microaerophilic-aerobic biodegradation of Amaranth by novel NAR-2 bacterial consortium. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 105, p. 48-59, 2012.

CHANG, W.; WHYTE, L.; GHOSHAL, S.. Comparison of the effects of variable site temperatures and constant incubation temperatures on the biodegradation of petroleum hydrocarbons in pilot-scale experiments with field-aged contaminated soils from a cold regions site. **Chemosphere**, Reino Unido, v. 82, p. 872–878, 2011.

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

CIRIC, L.; PHILP, J.C.; WHITELEY, A.S. Hydrocarbon utilization within a diesel-degrading bacterial consortium. **FEMS Microbiology Letters**, Reino Unido, v. 303, p. 116–122, 2010.

COOPER, D.G. & ZAJIC, J.E.. Surface-active compounds from microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, USA, v. 26, p. 229-253, 1980.

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**. 2006.

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, p. 4347–4352, 2011.

DAS, N. & CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1-13, 2010.

DEMELLO, J.A.; 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**, Reino Unido, v. 54, p. 894–904, 2007.

DEMIRBAS, A.. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, Reino Unido, v. 50, p. 14-34, 2009.

DESAI, C.; JAIN, K.; PATEL, B.; MADAMWAR, D.. Efficacy of bacterial consortium-AIE2 for contemporaneous Cr(VI) and azo dye bioremediation in batch and continuous bioreactor systems, monitoring steady-state bacterial dynamics using qPCR assays. **Biodegradation**, Holanda, v. 20, p. 813–826, 2009.

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.

DORADO, M.P.; DE HARO, A.; FONT, R.; GARCIA-OLMO, J.. Visible and NIR Spectroscopy to assess biodiesel quality: Determination of alcohol and glycerol traces. **Fuel**, Reino Unido, v. 90, n. 6, p. 2321-2325, 2011.

EIXARCH, H. & CONSTANTÌN, M.. Biodegradation of MTBE by *Achromobacter xylosoxidans* MCM1/1 induces synthesis of proteins that may be related to cell survival. **Process Biochemistry**, Reino Unido, v. 45, p. 794–798, 2010.

EL FANTROUSSI, S. & AGATHOS, S.N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? **Current Opinion in Microbiology**, Reino Unido, v. 8, p. 268–275, 2005.

ELLIS, R.J.; MORGAN, P.; WEIGHTMAN, A.J.; FRY, J.C.. Cultivation-dependent and-independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 69, p. 3223–3230, 2003.

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**, Alemanha, v. 88, n. 2, p. 585-594, 2010.

EVANS, F.F.; ROSADO, A.S.; SEBASTIÁN, G.V.; CASELLA, R.; MACHADO, P.L.O.A.; HOLMSTRÖM, C.; KJELLEBERG, S.; VAN ELSAS, J.D.; SELDIN, L. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. **FEMS Microbiology Ecology**, Reino Unido, v. 49, p. 295–305, 2004.

FEPAM. Fundação Estadual de Proteção Ambiental. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br>, acessado em 28 de fevereiro de 2012.

FERHAT, S.; MNIF, S.; BADIS, A.; EDDOUAOUA, 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**, Reino Unido, v. 65, p. 1182-1188, 2011.

FERNANDES, D.D.S.; GOMES, A.A.; DA COSTA, G.B.; DA SILVA, G.W.B.; VERAS, G.. Determination of biodiesel content in biodiesel/ diesel blends using NIR and visible spectroscopy with variable selection. **Talanta**, Reino Unido, v. 87, p. 30-34, 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**, Holanda, v. 147, 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, n. 1, p. 19-23, 2005.

FIERER, N. & JACKSON, R.B.. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA, v. 103, p. 626-631, 2006.

FOUNTOULAKIS, M.S.; TERZAKIS, S.; KALOGERAKIS, N.; MANIOS, T.. Removal of poly-cyclic aromatic hydrocarbons and linear alkylbenzene sulfonates from domestic wastewater in pilot constructed wetlands and a gravel filter. **Ecological Engineering**, Holanda, v. 35, p. 1702–1709, 2009.

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

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**, Holanda, v. 189, p. 427–434, 2011.

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

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

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. **Química Nova**, Brasil, v. 30, n. 5, p. 1369-1373, 2007.

GOGOI, B.K.; DUTTA, N.N.; GOSWAMI, P.; MOHAN, T.R.K.. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 767-782, 2003.

GOJGIC-CVIJOVIC, G. D.; MILIC, J. S.; SOLEVIC, T. M.; BESKOSKI, V. P.; ILIC, M. V.; DJOKIC, L. S.; NARANCIC, T. M.; VRVIC, M. M.. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. **Biodegradation**, Holanda, v. 23, p. 1–14, 2012.

GOLDSTEIN, R.M.; MALLORY, L.M.; ALEXANDER, M. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 50, p. 977–983, 1985.

GONTANG, E.A.; FENICAL, W.; JENSEN, P.R. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 73, n. 10, p. 3272–3282, 2007.

GUARIEIRO, L.; PINTO, A.; AGUIAR, P. Metodologia analítica para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel:diesel utilizando espectroscopia na região do infravermelho. **Química Nova**, Brasil, v. 31, n. 2, p. 421-426, 2008.

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**, USA, v. 42, 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. **Biotechnol. Technol.**, v. 7, p. 745-748, 1993.

HEISS-BLANQUET, S.; BENOIT, Y.; MARÉCHAUX, C.; MONOT, F. Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. **Journal of Applied Microbiology**, Reino Unido, v. 99, p. 1392–1403, 2005.

HESSELSON, M.; BJERRING, M.L.; HENRIKSEN, K.; LOLL, P.; NIELSEN, J.L. Method for measuring substrate preferences by individual members of microbial consortia proposed for bioaugmentation. **Biodegradation**, Holanda, v. 19, p. 621–633, 2008.

HE, Z.G.; GAO, F.L.; SHA, T.; HU, Y.H.; HE, C.. Isolation and characterization of a Cr(VI)-reduction *Ochrobactrum* sp strain CSCr-3 from chromium landfill. **Journal of Hazardous Materials**, Holanda, v. 163, n. 2-3, p. 869-873, 2009.

HIGASHIOKA, Y.; KOJIMA, H.; SATO, S.; FUKUI, M.. Microbial community analysis at crude oil-contaminated soils targeting the 16S ribosomal RNA, *xyIM*, *C23O*, and *bcr* genes. **Journal of Applied Microbiology**, Reino Unido, v. 107, p. 126–135, 2009.

HOREL, A. & SCHIEWER, S.. Investigation of the physical and chemical parameters affecting biodegradation of diesel and synthetic diesel fuel contaminating Alaskan soils. **Cold Regions Science and Technology**, Holanda, v. 58, p. 113–119, 2009.

HOSOKAWA, R.; NAGAI, M.; MORIKAWA, M.; OKUYAMA, H. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Holanda, v. 25, p. 1519–1528, 2009.

IDISE, O. E. & AMEH, J. B.. Studies on petroleum-degrading potentials of wild and mutant strains of *Bacillus* sp isolated from an oil-contaminated soil in Abraka, Delta State, Nigeria. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 176–179, 2010.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O.. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. In: **Ciência Rural**, Brasil, v.37, n.4, p.1192-1201, 2007.

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, p. 310-317, 2010.

JORGENSEN, K. S. In situ bioremediation. **Advances in Applied Microbiology**, Reino Unido, v. 61, p. 285–305, 2007.

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

KACZOREK, E. & OLSZANOWSKI, A.. Uptake of Hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) Strains in the Presence of Surfactants: A Cell Surface Modification. **Water, Air & Soil Pollution**, Holanda, v. 214, p. 451–459, 2011.

KARAMALIDIS, A.K.; EVANGELOU, A.C.; KARABIKA, E.; KOUKKOU, A.I.; DRAINAS, C.; VOUDRIAS, E.A. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 101, p. 6545–6552, 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**, Reino Unido, v. 65, p. 359-368, 2011.

KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T.. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Holanda, v. 58, p. 169–188, 2004.

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

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**, Reino Unido, v. 36, p. 364–373, 2010.

KUHN, E.; BELLICANTA, G.S.; PELLIZARI, V.H.. New *alk* genes detected in Antarctic marine sediments. **Environmental Microbiology**, Reino Unido, v. 11, n. 3, p. 669–673, 2009.

LAHA, S.; TANSEL, B.; USSAWARUJIKULCHAI, A.. Surfactant – soil interactions during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: a review. **Journal of Environmental Management**, Reino Unido, v. 90, p. 95–100, 2009.

LAUBER, C.L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N.. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 75, p. 5111-5120, 2009.

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**, Holanda, v. 27, p. 1183–1188, 2011.

LEAHY, J. G. & COLWELL, R. R.. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 305–315, 1990.

LEBKOWSKA, M.; KARWOWSKA, E.; MIASKIEWICZ, E. Isolation and identification of bacteria from petroleum derivatives contaminated soil. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 44, p. 297–303, 1995.

LEBKOWSKA, M.; ZBOROWSKA, E.; KARWOWSKA, E.; MIASKIEWICZ, E.; MUSZYNSKI, A.; TABERNACKA, A.; NAUMCZYK, J.; JECZALIK, M. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. **Ecological Engineering**, Holanda, v. 37, p. 1895–1900, 2011.

LEE, M.; KIM, M. K.; KWON, M.-J.; PARK, B. D.; KIM, M. H.; GOODFELLOW, M.; LEE, S. T.. Effect of the synthesized mycolic acid on the biodegradation of diesel oil by *Gordonia nitida* strain LE31. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Japão, v. 100, p. 429–436, 2005.

LEITE, R.C.C & LEAL, M.R.L.V. O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos-CEBRAP**, Brasil, v. 78, p. 15-21, 2007.

LI, H.; ZHANG, Y.; KRAVCHENKO, I.; XU, H.; ZHANG, C-G.. Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 1003–1013, 2007.

LIAO, Y.; GENG, A.; HUANG, H.. The influence of biodegradation on resins and asphaltenes in the Liaohe Basin. **Organic Geochemistry**, Reino Unido, v. 40, p. 312–320, 2009.

LIN, L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. **Applied Energy**, Reino Unido, v. 88, p. 1020–1031, 2011a.

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, 2011b.

LIN, T.-C.; PAN, P.-T.; CHENG, S.-S. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, Holanda, v. 176, p. 27–34, 2010.

LORS, C.; RYNGAERT, A.; PÉRIÉ, F.; DIELS, L.; DAMIDOT, D.. Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. **Chemosphere**, Reino Unido, v. 81, p. 1263–1271, 2010.

MA, Y.; WANG, L.; SHAO, Z.. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. **Environmental Microbiology**, Reino Unido, v. 8, p. 455–465, 2006.

MADSEN, E.L. Determining in situ biodegradation – Facts and challenges. **Environmental Science & Technology**, USA, v. 25, n. 10, p. 1662-1673, 1991.

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R.. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. **Environment International**, USA, v. 34, p. 265–276, 2008.

MARCANO, V.; BENITEZ, P.; PALACIOS-PRU, E. Acyclic hydrocarbon environments > n-C18 on the early terrestrial planets. **Planetary and Space Science**, USA, v. 51, p. 159–166, 2003.

MARIANO, A.P., ANGELIS, D.F.; PIRÔLLO, M.P.S.; CONTIERO, J.; BONOTTO, D.M. Investigation about the efficiency of the bioaugmentation technique when applied to diesel oil contaminated soils. **Brazilian archives of biology and technology**, Brasil, v. 52, p. 1297-1312, 2009.

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

MARIANO, A.P.; BONOTTO, D.M.; ANGELIS, D.F.; PIRÔLLO, M.P.S.; CONTIERO, J.. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 39, p. 133-142, 2008b.

MARIANO, A.P.; TOMASELLA, R.C.; DI MARTINO, C.; MORAIS, E.B.; FILHO, R.M.; SELEGHIM, M.H.R; CONTIERO, J.; TORNISIELO, S.M.T; ANGELIS, D.F. Aerobic biodegradation of butanol and diesel oil blends. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 42, p. 7094-7101, 2010.

MATE, M.S. & PATHADE, G.. Biodegradation of C.I. Reactive Red 195 by *Enterococcus faecalis* strain YZ66. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Holanda, v. 28, p. 815-826, 2012.

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

MEHDI, H. & GITI, E.. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Reino Unido, v. 62, p. 170–178, 2008.

MEYER, D. **Avaliação da Biodegradabilidade de Misturas de Diesel e Biodiesel (B0, B20 e B100) em Dois Solos com Diferentes Granulometrias**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 161 f., 2011.

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**, USA, v. 67, n. 4, p. 1675–1681, 2001.

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

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A.. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, Holanda, v. 27, p. 165–175 2004.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O.. Capítulo 6 Xenobióticos no Solo. In: **Microbiologia e Bioquímica do Solo**, Ed. UFLA, p. 263-311, 2006.

MOTHE, C.G.; DE CASTRO, B.C.S.; MOTHE, M.G.. Characterization by TG/DTG/DSC and FTIR of frying and fish oil residues to obtain biodiesel. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Hungria, v. 106, n. 3, p. 811-817, 2011.

MUDGE, S.M. & PEREIRA, G. Stimulating the Biodegradation of Crude Oil with Biodiesel Preliminary Results. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 5, n. 5-6, p. 353-355, 1999.

MUKRED, A.M.; HAMID, A.A.; HAMZAH, A.; YUSOFF, W.M.W.. Development of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation of Crude Petroleum-oil in Contaminated Water. **OnLine Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 73-79, 2008.

MURUGESAN, A.; UMARANI, C.; SUBRAMANIAN, R.; NEDUNCHEZHIAN, N. Bio-diesel as an alternative fuel for diesel engines – A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, USA, v. 13, p. 653–662, 2009.

NIELSEN, D.R.; MCLELLAN, P.J.; DAUGULIS, A.J.. Direct estimation of the oxygen requirements of *Achromobacter xylosoxidans* for aerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in abioscrubber. **Biotechnology Letters**, Holanda, v. 28, p. 1293–1298, 2006.

OLSON, J. J.; MILLS, G. L.; HERBERT, B. E.; MORRIS, P. J.. Biodegradation rates of separated diesel oil components. **Environmental Toxicology and Chemistry**, USA, v. 18, p. 2448–2453, 1999.

OVREAS, L., FORNEY, L., DAAE, F.L., TORSVIK, V.. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

OZEN, B. F. & MAUER, L. J. Detection of Hazelnut Oil Adulteration Using FT-IR Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, USA, v. 50, p. 3898-3901, 2002.

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**, Holanda, v. 100, p. 1497-1500, 2009.

PAISSE, S.; DURAN, R.; COUL, F.; GOÑI-URRIZA, M.. Are alkane hydroxylase genes (*alkB*) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Alemanha, v. 92, p. 835– 844, 2011.

PAIXÃO, D.A.A.; DIMITROV, M.R.; PEREIRA, R.M.; ACCORSINI, F.R.; VIDOTTI, M.B.; LEMOS, E.G.M.. Molecular analysis of the bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Brasil, v. 34, p. 773-781, 2010.

PALIWAL, V.; PURANIK.; PUROHIT, H.J.. Integrated Perspective for Effective Bioremediation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, USA, v. 166, p. 903–924, 2012.

PANICKER, G.; MOJIB, N.; AISLABIE, J.; BEJ, A.K.. Detection, expression and quantitation of the biodegradative genes in Antarctic microorganisms using PCR. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 275–287, 2010.

PASSMAN, F.; DOBRANIC, J. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: **IASH 2005 9th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, p.18-22, 2005.

PASQUALINO, J.C.; MONTANÉ, D.; SALVADO, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass & Bioenergy**, Reio Unido, v. 30, p. 874–879, 2006.

PAZMIÑO, D.E.T.; WINKLER, M.; GLIEDER, A.; FRAAIJE, M.W.. Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. **Journal of Biotechnology**, Holanda, v. 146, p. 9–24, 2010.

PELTOLA, R.; SALKINOJA-SALONEN, M.; PULKKINEN, J.; KOIVUNEN, M.; TURPEINEN, A.R.; AARNIO, T.; ROMANSCHUK, M.. Nitrification in polluted soil fertilized with fast – and slow-releasing nitrogen – a case study at a refinery land farming site. **Environmental Pollution**, Reino Unido, v. 143, p. 247-253, 2006.

PIETROLETTI, M.; CAPOBIANCHI, A.; RAGOSTA, E.; MECOZZI, M.. Preliminary evaluation of hydrocarbon removal power of *Caulerpa racemosa* in seawater by means of infrared and visible spectroscopic measurements. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 77, p. 673–679, 2010.

PIRÔLLO, M.P.S.; MARIANO, A.P.; LOVAGLIO, R.B.; COSTA, S.G.V.A.O.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J.. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. **Journal of Applied Microbiology**, Reino Unido, v. 105, p. 1484–1490, 2008.

PONTES, M.J.C.; PEREIRA, C.F.; PIMENTEL, M.F.; VASCONCELOS, F.V.C.; SILVA, A.G.B.. Screening analysis to detect adulteration in diesel/biodiesel blends using near infrared spectrometry and multivariate classification. **Talanta**, Reino Unido, v. 85, n. 4, p. 2159-2165, 2011.

POWELL, S.M.; BOWMAN, J.P.; FERGUSON, S.H; SNAPE, I.. The importance of soil characteristics to the structure of alkane-degrading bacterial communities on sub-Antarctic Macquarie Island. **Soil Biology & Biochemistry**, Reino Unido, v. 42, p. 2012-2021, 2010.

PRINCE, R.C.; HAITMANEK, C.; LEE, C.C.. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere**, Reino Unido, v. 71, p. 1446–1451, 2008.

RAHMAN, K.S.M., RAHMAN, T.J., KOURKOUTAS, Y., PETSAS, I., MARCHANT, R., BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 90, p. 159-168, 2003.

REDDY, M.V.; DEVI, M.P.; CHANDRASEKHAR, K.; GOUD, R.K.; MOHAN, S.V. Aerobic remediation of petroleum sludge through soil supplementation: Microbial community analysis. **Journal of Hazardous Materials**, Holanda, v. 197, p. 80–87, 2011.

RICHARD, J.Y. & VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Reino Unido, v. 44, p. 93-100, 1999.

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, n. 5, p. 1062-1066, 2008.

ROY, S.; HENS, D.; BISWAS, D.; KUMAR, R.. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Holanda, v. 18, p. 575-581, 2002.

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**, Reino Unido, v. 106, p. 1101–1110, 2009.

RUBERTO, L.; VAZQUEZ, S.C.; DIAS, R.L.; HERNÁNDEZ, E.A.; CORIA, S.H.; LEVIN, G.; LO BALBO, A.; MAC CORMACK, W.P.. Small-scale studies towards a rational use of bioaugmentation in an Antarctic hydrocarbon-contaminated soil. **Antarctic Science**, Reino Unido, v. 22, p. 463-469, 2010.

SALMINEN, J.M.; TUOMI, P.M.; JØRGENSEN, K.S.. Functional Gene Abundances (*nahAc*, *alkB*, *xylE*) in the Assessment of the Efficacy of Bioremediation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, USA, v. 151, p. 638–652, 2008.

SARAND, I.; HAARIO, H.; JORGENSEN, K.S.; ROMANTSCHUK, M.. Effect of inoculation of a TOL plasmid containing mycorrhizosphere bacterium on development of Scots pine seedlings, their mycorrhizosphere and the microbialflora in *m*-toluate amended soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Reino Unido, v. 31, p. 127-141, 2000.

SCHLEICHER, T.; WERKMEISTER, R.; RUSS, W.; MEYER-PITTRUFF, R. Microbiological stability of biodiesel–diesel-mixtures. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 100, 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**, Reino Unido, v. 91, p. 2075–2078, 2010.

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

SEABRA, P. N.. Capítulo 24 Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: **Microbiologia Ambiental**, 2ª ed. rev. ampl. – Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 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**, Alemanha, v. 109, p. 493–497, 2007.

SERRANO, M.; TEJADA, M.; GALLEGOS, J.; GONZALEZ, L.. Evaluation of soil biological activity after a diesel fuel spill. **Science of the Total Environment**, Holanda, v. 407, p. 4056–4061, 2009.

SHARMA, Y.C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S.N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. **Fuel**, Reino Unido, v. 87, p. 2355–2373, 2008.

SCHIRMER, A.; RUDE, M.A.; LI, X.; POPOVA, E.; DEL CARDAYRE, S.B.. Microbial Biosynthesis of Alkanes. **Science**, USA, v. 329, p. 559-562, 2010.

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**, Holanda, 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**, Holanda, v. 100, p. 4669–4675, 2009.

SILVERSTEIN, R. M. & WEBSTER, F. X.. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6ª ed, LTC: Rio de Janeiro, 1998.

SIMON, M.A.; BONNER, J.S.; PAGE, C.A.; TOWNSEND, R.T.; MUELLER, D.C.; FULLER, C.B.; AUT-ENRIETH, R.L. Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland. **Ecological Engineering**, Holanda, v. 22, p. 263–277, 2004.

SMITH, A.E.; HRISTOVA, K.; WOOD, I.; MACKAY, D.; LORY, E.; LORENZANA, D.; SCOW, K.M.. Comparison of biostimulation versus bioaugmentation with bacterial strain PM1 for treatment of groundwater contaminated with methyl tertiary butyl ether (MTBE). **Environmental Health Perspectives**, USA, v. 113, p. 1–9, 2005.

SORENSEN, G.; PEDERSEN, D.V.; NORGAARD, A.K.; SORENSEN, K.B.; NYGAARD, S.D.. Microbial growth studies in biodiesel blends. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 102, p. 5259–5264, 2011.

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

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

TAHHAN, R.A. & ABU ATIEH, R.Y. Biodegradation of petroleum industry oily-sludge using Jordanian oil refinery contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Reino Unido, v. 63, p. 1054-1060, 2009.

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**, Reino Unido, v. 65, p. 130-134, 2011.

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

THANGARAJAN, R.; ADETUTU, E.M.; MOORE, R.B.; OGUNBANWO, S.T.; BALL, A.S.. Comparison between different bio-treatments of a hydrocarbon contaminated soil from a landfill site. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 67, p. 15151-15162, 2011.

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, 174 p, 1995.

TIWARI, J.N.; REDDY, M.M.K.; PATEL, D.K.; JAIN, S.K.; MURTHY, R.C.; MANICKAM, N.. Isolation of pyrene degrading *Achromobacter xylooxidans* and characterization of metabolic product. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Holanda, v. 26, p. 1727–1733, 2010.

TUAN, N.N.; HSIEH, H-C.; LIN, Y-W.; HUANG, S-L.. Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 102, p. 4232–4240, 2011.

TYAGI, M.; FONSECA, M.M.R.; CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation process. **Biodegradation**, Holanda, v. 22, p. 231-241, 2011.

VAN BEILEN, J.B & FUNHOFF, E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Alemanha, v. 74, 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**, 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**, Reino Unido, v. 278, p. 206–221, 2011.

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

VASCONCELLOS, S.P.; CRESPIM, E.; CRUZ, G.F.; SENATORE, D.B.; SIMIONI, K.C.M.; NETO, E.V.S.; MARSAIOLI, A.J.; OLIVEIRA, V.M.. Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. **Organic Geochemistry**, Reino Unido, v. 40, p. 574–588, 2009.

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**, Holanda, v. 140, 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**, Alemanha, v. 28, p. 252 – 260, 2002.

VIÑAS, M.; SABATÉ, J.; ESPUNY, M.J.; SOLANAS, A.M.. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v. 71, p. 7008–7018, 2005.

WANG, H.; XU, R.; LI, F.; QIAO, J.; ZHANG, B.. Efficient degradation of lube oil by a mixed bacterial consortium. **Journal of Environmental Sciences-China**, China, v. 22, n. 3, p. 381–388, 2010.

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**, 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**, Holanda, v. 183, p. 395–401, 2010.

ZANAROLI, G.; DI TORO, S.; TODARO, D.; VARESE, G.C; BERTOLOTTO, A.; FAVA, F.. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. **Microbial Cell Factories**, Reino Unido, v. 9, n. 10, p. 1-13, 2010.

ZHANG, X.; PETERSON, C.L.; REECE, D.; MÖLLER, G.; HAWS, R. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of American Society of Agricultural Engineers**, 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**, Holanda, v. 101, p. 8452–8456, 2010.

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.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Análise Combinatória

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

Nesse caso,  $n = 6$  (isolados) e  $s = 3$  (número de micro-organismos desejado para compor cada um dos consórcios), gerando 20 combinações diferentes.

### 8.2 Meio Mineral Mínimo (Richard & Vogel, 1999)

#### Macronutrientes

KCl	0,7g/L		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0g/L	ou KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,55g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0g/L	ou NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,9g/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,0g/L		

#### Micronutrientes

MgSO <sub>4</sub>	4,0g/L	ou MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,2g/L
FeSO <sub>4</sub>	2,0g/L	ou FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,36g/L
MnCl <sub>2</sub>	0,2g/L	ou MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,31g/L
CaCl <sub>2</sub>	0,2g/L		

pH 7,2

**8.3 Meio Esterase (Sierra, 1957)**

peptona	5,0g/L
NaCl	5,0g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01g/L
extrato de levedura	1,0g/L
extrato de carne	1,0g/L
Tween 80	1%
ágar	15,0g/L
pH 7,4	

**8.4 Meio Lipase**

peptona	5,0g/L
NaCl	4,0g/L
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,01g/L
extrato de levedura	1,0g/L
extrato de carne	1,0g/L
solução de rodamina	0,001%
óleo de oliva	2,5%
ágar	15,0g/L