

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**MICORREMEDIAÇÃO DE UM SOLO CONTAMINADO COM A
MISTURA DIESEL/BIODIESEL**

Letícia Tramontini
Licenciada em Ciências Biológicas

Porto Alegre
2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

MICORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM A MISTURA DIESEL/BIODIESEL

Letícia Tramontini
Licenciada em Ciências Biológicas

Dissertação de Mestrado apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora: Prof. Dra. Fátima Menezes Bento

Coorientadora: Prof. Dra. Rosane Rech

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, professora Dra. Fátima Menezes Bento pela oportunidade, confiança e principalmente pelos seus ensinamentos.

À professora Dra. Rosane Rech, por toda sua ajuda, paciência e ensinamentos.

Aos professores que contribuíram para meus conhecimentos em microbiologia.

Às colegas que foram minhas professoras durante esses anos, Francielle, Patrícia, e especialmente, à minha amiga querida, Luisa Mercado, que me ensinou e me ajudou mais do que ela imagina.

Aos queridos colegas do laboratório de Biorremediação de Solos, mesmo aqueles que não estão mais lá, Tatiana, Marcela e Vanessa.

Às meninas dos laboratórios 167 e 209, por serem sempre compreensivas e me auxiliarem nos mais diferentes momentos. Agradeço especialmente à Cristiane, pela amizade e parceria nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos queridos, companheiros desde 2006 e parceiros para a vida toda. Em especial à Fernanda e ao Guilherme, por toda ajuda com a biologia molecular e por terem me mostrado que ela também pode ser divertida.

Aos meus pais, por nunca ter deixado de me incentivar ao estudo e à biologia e por sempre apoiar as minhas escolhas.

Ao Pedro, por me ajudar de todas as maneiras possíveis, desde carregar e peneirar solos, a tentar me manter tranquila nos momentos críticos, e, principalmente por seu carinho e por sua paciência.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

MICOREMEDIÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM A MISTURA DIESEL/BIODIESEL¹

Resumo

Autor(a): Letícia Tramontini

Orientador(a): Fátima Menezes Bento

Várias técnicas são indicadas para a remediação de áreas contaminadas por combustíveis, incluindo procedimentos como biorremediação. O objetivo deste estudo foi avaliar a biodegradação da mistura B10 (diesel/biodiesel) em solo artificialmente contaminado através de estratégias de biorremediação como: atenuação natural, bioestimulação, bioaumentação com fungos nativos e exógenos e bioaumentação tardia (adição do inóculo composto por fungos nativos no 14º dia). Foi realizado um ensaio preliminar de biorremediação, a partir do qual foram isolados fungos filamentosos, os quais foram selecionados quanto ao potencial degradador da mistura B10. Fungos isolados de tanques de armazenamento da mistura B5 foram igualmente selecionados. Posteriormente, foram avaliados dentro de um planejamento experimental fatorial 3², o pH e a temperatura ideal para o crescimento de cada isolado e realizadas curvas de crescimento em meio mineral, com 20 % da mistura B10. Avaliou-se por 30 dias o experimento de biorremediação em solo contaminado com B10 (50 g de hidrocarbonetos totais de petróleo.kg⁻¹ solo). Foram estimadas as populações de heterotróficos totais e degradadores, degradação da mistura pela liberação de CO₂ (respirometria) e pela concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) (cromatografia gasosa). O tratamento de bioestimulação, que apenas recebeu nutrientes, reduziu 31 % dos HTPs. Esses resultados demonstram que a microbiota autóctone, mesmo sem ter sido previamente exposta ao contaminante, diante de condições favoráveis, foi capaz de expressar capacidade degradativa. A bioaumentação tardia, apesar de ter apresentado percentual de degradação de HTP similar ao das bioaumentações convencionais foi a estratégia com maior percentual de degradação total de HTP (37 %).

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (125p.), março, 2013.

MYCOREMEDIATION OF SOIL AMENDED WITH DIESEL/BIODIESEL ¹

Abstract

Author: Letícia Tramontini

Advisor: Fátima Menezes Bento

Several techniques are suitable for remediation of areas contaminated by fuel, including procedures as bioremediation. The aim of this study was to evaluate the biodegradation of soil amended with the blend B10 (diesel/biodiesel) by bioremediation strategies such as natural attenuation, biostimulation, bioaugmentation with native fungi, bioaugmentation with exogenous fungi and late bioaugmentation (addition of inoculum composed by native fungi in the 14th day). A preliminary bioremediation assay was carried out in an amended soil, from which filamentous fungi were isolated and selected according to their degrading potential of the blend B10. Isolates from storage tanks of B5 blend were also selected. After the selection, pH and temperature for growth of each isolate were evaluated in a factorial experimental design. Growth curves were performed in mineral medium with 20% of the blend B10. The experiment of bioremediation in amended soil with the B10 blend (50g.kg⁻¹ soil) was evaluated for 30 days. Total heterotrophic populations and degrading populations, degradation of the blend B10 by the release of CO₂ (respirometry) and the concentration of total petroleum hydrocarbons (TPH) (gas chromatography) were monitored. The treatment of biostimulation, which only received nutrients, reduced 31% of HTPs. This result demonstrates that the native microorganisms, even without previously exposition to the contaminant, under favorable conditions, were able to express their degrading potential. The late bioaugmentation, despite having degradation percentage of HTP similar to that of conventional bioaugmentation, was the strategy with the highest percentage of total degradation of HTP (37%).

¹ 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, Brazil. (125p.), march, 2013.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	5
2.1 Óleo diesel – histórico, caracterização, contaminação do solo e legislação vigente.....	5
2.2 Biodiesel – histórico, caracterização e legislação vigente	10
2.3 Técnicas de remediação de ambientes impactados	14
2.4 Biorremediação	18
2.5 Bioaugmentação com fungos filamentosos	23
2.6 Fatores abióticos que influenciam na biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo no solo	27
2.7 Fisiologia da degradação da mistura diesel/biodiesel	29
2.8 Monitoramento da degradação da mistura diesel/biodiesel.....	35
3. Materiais e Métodos	37
3.1 Combustíveis.....	38
3.2 Coleta do solo.....	38
3.3 Ensaio preliminar de biorremediação	39
3.3.1 Contaminação do solo.....	39
3.3.2 Fungos utilizados.....	40
3.3.3 Montagem dos microcosmos.....	40
3.3.4 Avaliação da degradação do contaminante	41
3.3.4.1 Respirometria	41
3.3.4.2 Cromatografia gasosa	42
3.4 Seleção de fungos degradadores para aplicação em processos de biorremediação.....	43
3.4.1 Isolamento dos fungos do solo.....	43
3.4.2. Isolamento dos fungos de tanques de combustível.....	44
3.4.3 Identificação morfológica dos isolados	44
3.4.4 Extração de DNA e identificação do isolado S1.....	45
3.4.5 Avaliação preliminar da capacidade biodegradadora da mistura B10 utilizando o indicador-redox diclorofenol indofenol (DCPIP).....	47
3.4.6 Ensaio em meio líquido- Determinação das condições ótimas para o crescimento pela metodologia de superfície de resposta e curva de crescimento	48
3.4.7 Análises da fase aquosa.....	50
3.4.7.1 Produção de biossurfactantes	50
3.4.7.2 Medidas de pH	50
3.4.7.3 Avaliação da atividade enzimática.....	51
3.4.7.3.1 Determinação da atividade das enzimas C1,20, C2,30, P3,40	51

3.4.7.3.2 Determinação de proteínas totais.....	53
3.4.7.3.3 Determinação da atividade da lipase.....	53
3.4.8 Avaliação do crescimento	54
3.5 Biorremediação	54
3.5.1 Amostra de solo não contaminado	54
3.5.2 Montagem dos microcosmos.....	54
3.5.3 Monitoramento da atividade microbiana.....	56
3.5.3.1 Estimativa de heterotróficos totais.....	56
3.5.3.2 Estimativa de micro-organismos degradadores da mistura B10	57
3.5.4 Avaliação da degradação do contaminante	57
3.6 Análise estatística.....	58
4 Resultados	59
4.1 Ensaio Preliminar de Biorremediação	59
4.1.2 Análise da degradação do contaminante.....	59
4.2 Isolamento dos fungos filamentosos do solo contaminado	63
4.3 Seleção dos micro-organismos quanto ao potencial degradador da mistura B10 e à capacidade de crescer utilizando a mistura como fonte de carbono...	64
4.4 Identificação dos isolados selecionados.....	68
4.5 Determinação das condições ótimas para o crescimento pela metodologia de superfície de resposta	69
4.6 Ensaio de crescimento em meio líquido - Análises da fase aquosa	75
4.6.1 Produção de biossurfactantes	75
4.6.2 pH.....	77
4.6.3 Avaliação enzimática	80
4.6.4 Atividade lipase.....	83
4.7 Crescimento em meio mineral com a mistura B10	85
4.8 Ensaio de Biorremediação	88
4.8.1 Densidade microbiana.....	89
4.8.2 Avaliação da degradação do contaminante.....	93
5. Conclusões.....	101
6. Perspectivas.....	103
7. Referências bibliográficas	104
8. Anexos.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores referenciais para solo, considerando-se um teor de argila de 25,0 % e de matéria orgânica de 10,0 % de acordo com a Lista Holandesa de Valores de Referência para Qualidade do Solo e da Água Subterrânea.....	15
Tabela 2 – Análise físico-química do solo amostrado.....	39
Tabela 3 – Percentual de degradação de HTP nas diferentes estratégias de biorremediação nos tempos inicial (T0) e após 30 dias (T30).....	61
Tabela 4 – Resultados para teste preliminar de biodegradação em meio mineral mínimo, contendo o indicador redox DCPIP e a mistura B10 como fonte de carbono em três concentrações após 96h de incubação.....	65
Tabela 5 – Identificação dos isolados selecionados.....	68
Tabela 6 – Modelo de regressão com os coeficientes significativos obtido para cada um dos isolados (C, D, S1, S3, <i>P. boydii</i> , <i>P.variotti</i>).....	69
Tabela 7 – Coeficientes de regressão dos modelos reduzidos, valores- <i>p</i> , valores de F e de R ² dos isolados C, D e S1.....	70
Tabela 8 – Coeficientes de regressão dos modelos reduzidos, valores- <i>p</i> , valores de F e de R ² dos isolados S3, <i>P.boydii</i> e <i>P.variotti</i>	70
Tabela 9 – Valores temperatura e pH ótimos para o crescimento de cada um dos fungos obtidos a partir da Superfície de Resposta.....	72
Tabela 10 – Medidas de tensão superficial (TS) da fase aquosa proveniente da curva de crescimento com os isolados estudados (C, D, S1, S3, <i>P.boydii</i> e <i>P.variotti</i>) e do controle negativo nos tempos inicial (T0) e final (T21).....	76
Tabela 11 – Avaliação de pH da fase aquosa dos isolados C, D, S1, S3, <i>P. boydii</i> (Pb) e <i>P.variotti</i> (Pv) e do controle negativo (CN) em meio mineral mínimo e a mistura B10 nos tempos 0 (condição inicial), 7, 14 e 21 dias durante curva de crescimento.....	78
Tabela 12 – Valores de atividade de catecol 1,2-dioxigenase (C1,2O), catecol	

2,3-dioxigenase (C2,3O), protocatecol 3,4-dioxigenase (P3,4O) dos isolados estudados na presença de B10 nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias durante curva de crescimento.....80

Tabela 13 – Valores de atividade da lipase dos isolados estudados na presença de B10 nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias durante curva de crescimento.....83

Tabela 14 – Percentual de degradação das diferentes frações de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) por diferentes tratamentos de biorremediação após 30 dias de incubação.....95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho ilustrando a formação da pluma de contaminação no solo em decorrência de vazamentos nos tanques.....	9
Figura 2 – Rota de degradação de n-alcanos.....	31
Figura 3 – Rota de degradação de compostos aromáticos.....	33
Figura 4 – Produção acumulada de C-CO ₂ do solo contaminado por B10 durante o ensaio de biorremediação por 30 dias.....	59
Figura 5 – Aspecto do microcosmo montado com o indicador DCPIP (azul no controle) após 96 h de incubação contendo 20 % da mistura B10.....	64
Figura 6 – Valores de biomassa de cada fungo filamentoso após 14 dias de incubação em meio mineral mínimo nas diferentes concentrações da mistura B10.....	67
Figura 7 – Superfícies de resposta de crescimento (biomassa) para cada fungo, variando temperatura e pH.....	72
Figura 8 – Valores de biomassa dos fungos filamentosos formada na interface óleo-água durante o ensaio da curva de crescimento nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias.....	86
Figura 9 – Estimativa do Número Mais Provável de micro-organismos heterotróficos em 30 dias de experimento de biorremediação de solo contaminado por B10.....	89
Figura 10 – Estimativa do Número Mais Provável de micro-organismos degradadores em 30 dias de experimento de biorremediação de solo contaminado por B10.....	90
Figura 11 – Produção cumulativa de C-CO ₂ do solo contaminado por B10 durante o ensaio de biorremediação por 30 dias.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANP Agência Nacional do Petróleo
BSA Bovine Serum Albumin
°C Grau Celsius
CETESB Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente
DCPIP 2,6 diclorofenol indofenol
g grama
HAP Hidrocarboneto aromático policíclico
kg quilograma
M molar
m³ Metro Cúbico
mg miligrama
mL mililitro
mm milímetro
MME Ministério de Minas e Energia
MM1 Meio Mínimo Mineral
mN.m⁻¹ miliNewton por metro
NAD Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
nm nanômetro
NMP Número Mais Provável
rpm rotações por minuto
s segundo
TPF Trifenilformazan
HTP Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
TTC 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio
W Watt
µL microlitro
µm micrometro

1. INTRODUÇÃO

O consumo de combustíveis fósseis durante os últimos anos tem levado ao esgotamento das reservas de petróleo e à contaminação ambiental devido à combustão dos hidrocarbonetos derivados de petróleo e aos derrames acidentais. Um dos grandes desafios deste século é o desenvolvimento de fontes energéticas limpas, obtidas a partir de fontes renováveis, viáveis aos meios de produção, acessíveis em relação aos custos, e que não comprometam os ecossistemas, bem como a saúde humana.

O óleo diesel representa o combustível derivado de petróleo comercializado em maior escala no Brasil, constituindo o principal combustível dentro da matriz energética nacional. Sua estrutura molecular é composta por alcanos alifáticos, ramificados, cíclicos, além de compostos aromáticos. Dentre os componentes do óleo, alguns são de fácil degradação, como os hidrocarbonetos alifáticos, enquanto outros podem ser considerados recalcitrantes. A partir do ano de 2008, tornou-se obrigatória a comercialização de misturas de óleo diesel e biodiesel com o intuito de reduzir o consumo de combustíveis fósseis e os danos ambientais.

O biodiesel é um biocombustível obtido a partir de óleos de diversos vegetais, mas pode também ser produzido a partir da gordura animal.

Os biocombustíveis representam uma fonte de energia renovável, obtidos a partir de culturas que estimulam o agronegócio e a geração de empregos, e, conseqüentemente, levam à redução das importações de petróleo e de óleo diesel refinado. Em termos ambientais, seu uso se torna atrativo por sua queima emitir menor quantidade de material particulado e de outros poluentes.

Um dos problemas ambientais relacionado aos combustíveis refere-se aos processos de transporte e armazenamento devido às possibilidades de derrames que podem provocar a contaminação do solo, de águas superficiais e subterrâneas. Considerando um acidente ambiental, a abordagem inicial deve considerar um estudo de Análise de Risco, ferramenta necessária à tomada de decisões envolvidas na descontaminação de um dado local. Após essa etapa, a remediação pode ser indicada, configurando como uma tentativa de se reduzir a concentração do contaminante, priorizando áreas em função do risco admissível para o local.

Em abril de 2010, o órgão ambiental do estado do Rio Grande do Sul (FEPAM), publicou a Portaria nº 016/2010, onde consta que resíduos com características de inflamabilidade devem ser encaminhados para unidades licenciadas de tratamento, não devendo mais ser destinados a sistemas de destinação final de resíduos denominados “aterro de classe I”. Portanto, deve se considerar que uma das alternativas aos métodos físico-químicos de limpeza destas áreas impactadas é a biorremediação, envolvendo diferentes estratégias que estimulam a biodegradação em solos contaminados.

A biorremediação é caracterizada por ser um conjunto de técnicas biotecnológicas com o uso de microrganismos que utilizam o

combustível como fonte de carbono, ou ainda, que produzam enzimas capazes de levar à degradação ou à mineralização dos compostos. A biodegradação pelas populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários pelos quais poluentes como petróleo e outros hidrocarbonetos podem ser eliminados do ambiente.

Dentre os organismos usados na biorremediação, os fungos apresentam um potencial enzimático diverso e diferenciado e são adaptáveis a ambientes que não favorecem o crescimento de outros organismos. Além do mais, o crescimento radial dos fungos filamentosos e de leveduras que formam pseudo-hifas possibilita um maior contato com o poluente, podendo acelerar a degradação.

A pesquisa na área de biorremediação vem se intensificando pois essa técnica é de grande auxílio na redução dos impactos ocasionados por hidrocarbonetos no ambiente envolvendo baixos custos e facilidades operacionais, sendo, portanto, de grande aceitação por parte da comunidade.

Neste sentido, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a biodegradação da mistura B10 (diesel/biodiesel) em solo artificialmente contaminado através das estratégias de biorremediação, como: atenuação natural, bioestimulação, bioaumentação com fungos nativos, bioaumentação com fungos exógenos e bioaumentação tardia (adição do inóculo composto por fungos nativos no 14º dia). Os objetivos específicos foram: 1) isolamento e seleção de fungos degradadores presentes em uma área contaminada com a mistura diesel/biodiesel; 2) avaliação do crescimento, da atividade de enzimas relacionadas aos processos de degradação de hidrocarbonetos e ésteres

constituintes do biodiesel por fungos isolados do solo e de tanques de combustível quando inoculados em meio de cultura mínimo com mistura B10;

3) avaliar a estratégia de bioaugmentação com fungos selecionados na degradação das frações da mistura B10 no solo durante a biorremediação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Óleo diesel – histórico, caracterização, contaminação do solo e legislação vigente

A revolução industrial e as mudanças na sociedade ocorridas no século XIX aumentaram a demanda por fontes energéticas. As fontes não renováveis passaram a ser utilizadas em detrimento da combustão da madeira e de energia hídrica, iniciando-se a era da exploração dos combustíveis fósseis (Péres da Silva et al., 2003).

Dentre os derivados de petróleo, o óleo diesel é o mais difundido, sendo utilizado principalmente em motores de combustão interna, desenvolvidos por Rudolph Diesel em 1895. Inicialmente, o pesquisador desenhou os modelos com o intuito de utilizar óleos de origem vegetal ou animal. Porém, a abundância de petróleo no início do século XX e o baixo custo para seu refino fizeram com que os óleos vegetais fossem substituídos pelo óleo refinado de petróleo, denominado “óleo diesel” (Silva & Freitas, 2008; Chhibber et al., 2012).

Passado mais de um século do desenvolvimento do motor, o óleo diesel continua com grande popularidade. Além de preços inferiores ao de outros combustíveis, os motores movidos a diesel possuem maior durabilidade

(Braun et al., 2003; Chibber et al., 2012). Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo (ANP), no ano de 2011, 44,3 % do petróleo processado foi convertido em óleo diesel, enquanto que 25,4 % foi convertido em gasolina automotiva (ANP, 2011). Essa maior porcentagem de produção de diesel em relação à gasolina deve-se a sua ampla utilização em máquinas e motores de grande porte, como embarcações e no transporte rodoviário. Assim, constitui o derivado de petróleo mais consumido mundialmente (Braun et al., 2003; Chhibber et al., 2012). No Brasil o cenário não é diferente. O consumo de óleo diesel se dá principalmente no setor de transportes, e até setembro de 2012, o total do óleo consumido no país foi na ordem de 41,4 milhões de m³, o equivalente a cerca de 45 % do consumo dos derivados de petróleo (ANP, 2012).

O óleo diesel é resultante do processo de destilação fracionada do petróleo cru. Apresenta na sua composição uma mistura de alcanos de cadeias simples e ramificadas, além de compostos cíclicos e aromáticos, na faixa de C₉-C₂₈ (Knothe, 2010; Bucker et al., 2011). Na mistura também estão presentes em baixas concentrações átomos de oxigênio, nitrogênio além de altos teores de enxofre, variando de 0,1 % a 0,5 % (Braun et al., 2003; ANP, 2012).

A combustão do óleo diesel é responsável por liberar no ambiente uma série de poluentes, dentre os quais, destacam-se os gases causadores de Efeito Estufa, compostos orgânicos voláteis e particulados, e outros compostos tóxicos, como óxidos de enxofre (Braun et al., 2003; Pinto et al., 2005). A tendência mundial é reduzir a quantidade de enxofre presente no óleo. Desde

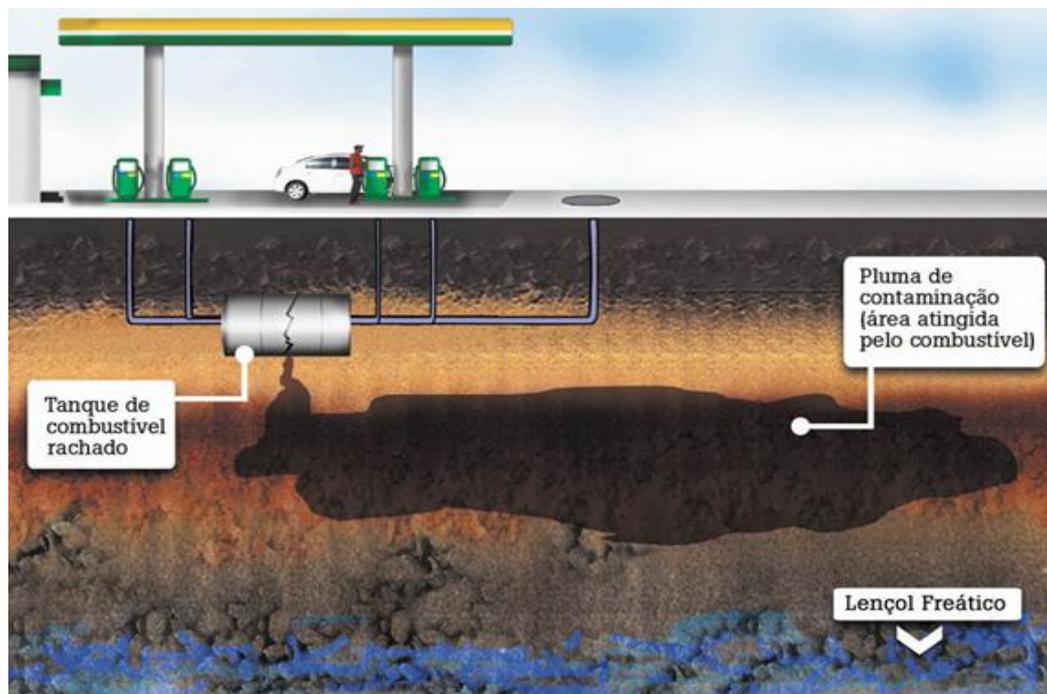
2009, foi introduzido no mercado brasileiro o óleo diesel S50, contendo 50 ppm de enxofre em sua composição. A redução do teor de enxofre diminui a emissão de gases nocivos durante a combustão do óleo, tornando-o menos poluidor. Em janeiro de 2012, o S50 tornou-se obrigatório no território nacional. Contudo, o processo de hidrodessulfurização elimina também compostos contendo oxigênio e nitrogênio, promovendo a diminuição da lubricidade do petrodiesel, o que pode gerar o desgaste prematuro de bombas e componentes dos sistemas de injeção de combustível. Neste sentido, a adição de biodiesel, que no Brasil iniciou em janeiro de 2005 com a adição de 2 % ao diesel, foi também uma alternativa para solucionar o problema, pois promove a restauração dos padrões de lubricidade perdidos (Knothe, 2010; ANP, 2012). A exploração, refino, transporte e armazenamento dos derivados de petróleo representam uma preocupação global, pois os hidrocarbonetos derivados de combustíveis fósseis são a principal forma de contaminação do ambiente (Das & Chandran, 2011; Chagas-Spinelli et al., 2012; Thapa et al., 2012). Estudos referentes à toxicidade desses compostos no solo e sua influência sob a biota vem sendo desenvolvidos (Sueiro et al., 2011; Leme et al., 2011; Tang et al., 2011), já que a contaminação do solo por derramamentos de óleo constitui a grande preocupação global em termos ambientais (Thapa et al., 2012).

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), durante o período de 1994 a maio de 2010, 475 acidentes envolvendo 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). Durante o ano de 2011, o mesmo órgão ambiental registrou a ocorrência de 30 acidentes envolvendo o transporte de diesel e biodiesel (FEPAM, 2011).

Outro foco de dano ambiental são os vazamentos pontuais dos tanques subterrâneos de estocagem em postos de abastecimento, sendo esses os responsáveis por mais da metade dos casos de contaminação do solo (Coutinho e Gomes, 2006; Brito et al., 2010). Segundo a Companhia Estadual de Saneamento Ambiental (CETESB), no ano de 2011 os vazamentos em postos de combustíveis foram responsáveis por 78 % dos casos de áreas contaminadas no Estado de São Paulo. Tais acidentes estão relacionados à falta de monitoramento adequado devido à dificuldade de acessar os tanques e ao tempo de vida útil desses, que é em torno de 20 anos. Como a maioria dos tanques foi instalada na década de 70, a preocupação com os riscos existentes nesse ambiente procedeu apenas a partir de 1990 (Cunha et al., 2008). Além de contaminar os diferentes horizontes do solo, as características de mobilidade do óleo permitem que o contaminante percole no perfil do solo e atinja o lençol freático comprometendo também águas superficiais e subterrâneas (Gallego et al., 2001) (Figura 1). Portanto, com o intuito de evitar novos vazamentos, a CETESB passou a exigir dos proprietários dos postos de combustível que adotem as seguintes medidas: 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 (CETESB, 2012).



Fonte: <http://era-da-agua.com/2012/02/14/tanque-de-posto-de-combustiveis-racha-e-solo-e-contaminado/>
Figura 1: Desenho ilustrando a formação da pluma de contaminação no solo em decorrência de vazamentos nos tanques.

Quando em contato com óleo, as características físico-químicas e biológicas do solo são alteradas, podendo afetar as populações microbianas e suas atividades, assim como o teor de matéria orgânica, densidade, porosidade, além da respiração e processos de transferência de massa, devido à hidrofobicidade dos hidrocarbonetos presentes no contaminante (Silva & Vieira, 2008; Lozano-Garcia et al., 2011). Além do dano ambiental, esses fatores limitam o uso do solo, pois diminuem a capacidade agrícola do local contaminado ocasionando perdas econômicas (Thapa et al., 2012).

Diante desse cenário de comprometimento da qualidade dos solos e das águas, uma série de novas leis, resoluções e decretos municipais

foram promulgados a fim de mitigar os danos ao ambiente. No município de Porto Alegre, desde 1996, por ação do Decreto Municipal nº 11.423, é exigida licença ambiental para instalação e operação de quaisquer estabelecimentos que pratiquem o armazenamento de combustíveis em tanques subterrâneos. Em 2000 foi lançada a resolução do CONAMA nº 273, onde consta que toda instalação e sistemas de armazenamento de quaisquer combustíveis, configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais. Dessa forma, a construção, instalação, modificação, ampliação e operação de postos revendedores, postos de abastecimento, ou mesmo postos flutuantes de combustíveis dependerão de licenciamento do órgão ambiental competente. Em abril de 2010, a FEPAM publicou a Portaria nº 016/2010, que modifica o destino final dos resíduos classe I - borras oleosas, borras de processos petroquímicos, borras de fundo de tanques de combustíveis, produtos inflamáveis e solo contaminado com combustíveis -. A partir desta Portaria, esses resíduos devem ser encaminhados a estações especializadas de tratamentos, em detrimento do aterro de resíduos classe I, local onde os resíduos com as características citadas eram despejados sem receber tratamento prévio.

2.2 Biodiesel - histórico, caracterização e legislação vigente

Os biocombustíveis como possíveis substitutos para o óleo diesel nos motores de combustão interna são conhecidos desde o desenvolvimento do motor (Guariero et al., 2008). No entanto, apenas a partir da crise do petróleo em 1973 e do Golfo, em 1990 é que os estudos envolvendo óleos

naturais e gordura animal como substitutos ao derivado do petróleo passaram a ganhar espaço nos centros de pesquisa (Chhibber et al., 2012). De acordo com a Agência Nacional do Petróleo (ANP), os biocombustíveis são derivados de biomassa renovável podendo substituir, parcial ou totalmente, combustíveis de origem fóssil e gás natural em motores à combustão ou em outro tipo de geração de energia (Lei 11.097/05). No Brasil, os principais biocombustíveis são o etanol e biodiesel, sendo esse último utilizado em misturas com a gasolina (24 %) e com o diesel de petróleo (5 %) (ANP, 2012).

O biodiesel é definido como um biocombustível derivado de óleos vegetais, gordura animal ou outros produtos existentes na biomassa (Cunha, 2008; Demirbas, 2008). 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).

A síntese do óleo ocorre principalmente através da reação de transesterificação entre triacilglicerídeos e um álcool (metanol ou etanol), na presença de um catalisador ácido ou básico. A produção do biocombustível ainda pode ocorrer a partir de reação química de lipídios por diferentes processos como craqueamento (quebra de moléculas complexas em moléculas simples pela ação de catalisador), ou esterificação (ácido reagindo com álcool, produzindo éster e água). A reação culmina na produção de uma mistura de alquil ésteres de cadeia linear, e como subproduto da mesma, tem-se mono, di

e triglicerídeos além do glicerol (Knothe et al., 2006; Moraes, 2008; Lobô et al., 2009; Atadashi et al., 2010). Ao glicerol é dada grande atenção, já que a pureza e a qualidade do biodiesel são determinadas pela quantidade de glicerina presente na mistura, sendo esta não só prejudicial ao motor como também nociva aos ecossistemas (Meyer, 2011).

Por apresentar propriedades físico-químicas semelhantes ao petrodiesel, o biodiesel se tornou reconhecido por substituir total ou parcialmente o mesmo, podendo ser usado diretamente no motor em misturas de até 20 % com o diesel, sem maiores modificações mecânicas ou gastos em manutenção (Demirbas, 2009; Chhibber, 2012). Dessa forma, a frota de veículos que utiliza o biodiesel como combustível na Europa é de aproximadamente 100 mil carros (Chhibber, 2012). A introdução do biodiesel na matriz energética brasileira é recente, data de 2005 com a promulgação da lei 11.097, que estipulou a obrigatoriedade da comercialização do biocombustível em misturas com o diesel de petróleo, em uma proporção de 2 %. Hoje, a porcentagem de biodiesel encontrada no diesel comercial é de 5 % com estimativas de aumento para 10 % (ANP, 2012).

A inserção do biodiesel e seu uso nas misturas com o diesel de petróleo trazem uma série de vantagens econômicas e ambientais. (Guarheiro et al., 2008; Mariano et al., 2008a; Demirbas, 2009). No âmbito socioeconômico, a produção do biodiesel a partir de culturas vegetais típicas de cada região incentiva o agronegócio e a geração de empregos (Pinto et al., 2005; Cunha, 2008), e também acarreta na redução das importações de petróleo e de óleo diesel refinado (Guarheiro et al., 2008). Ainda, em

comparação ao óleo mineral, o biodiesel apresenta boas características de ignição e por ser mais lubrificante do que o primeiro, acaba por aumentar a vida útil do motor (Aworanti et al., 2012; Chhibber, 2012). Em termos ambientais, seu uso se torna atrativo pois sua combustão gera menos poluentes, reduzindo a emissão atmosférica de óxidos de enxofre, monóxido de carbono, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos além de material particulado (Demirbas, 2009; Aworanti et al., 2012).

Outra vantagem sobre os combustíveis convencionais é sua biodegradabilidade, favorecida pelas cadeias de hidrocarbonetos alifáticos C_{16} - C_{18} (ácidos graxos), ausência de moléculas aromáticas, propriedades higroscópicas e disponibilidade de ligações éster de alta energia (Passman et al., 2005; Leung et al., 2006; Demirbas, 2009; Knothe, 2010). Contudo, existem alguns problemas relacionados ao biocombustível. Sua produção ainda envolve altos custos (Aworanti et al., 2012) e a viscosidade é maior do que a do óleo diesel. Essa característica afeta a lubrificação, pois quanto maior a viscosidade, maior a tendência de formar depósitos no motor. Além disso, o biodiesel é mais suscetível à biodeterioração em sistemas de estocagem e há liberação de óxidos de nitrogênio (NO_x) durante sua combustão (Bento et al., 2006; Demirbas, 2009; Knothe, 2010; Bucker et al., 2011).

Apesar do biodiesel ser um combustível produzido a partir de fontes renováveis e ser considerado, portanto, um combustível mais ecológico do que os óleos derivados de combustíveis fósseis, sua presença no ambiente pode trazer consequências adversas para o mesmo, e ainda são poucos os estudos a respeito dos seus efeitos no meio (Silva et al., 2012a). Pela

crescente participação do biodiesel na matriz energética mundial e nacional, estudos referentes ao impacto do óleo e das misturas com o diesel de petróleo no ambiente, bem como estudos sobre sua degradação são de extrema importância (Mariano, 2008a; Junior et al., 2009; Knothe, 2010; Leme et al., 2011; Silva et al., 2012a), visto que alguns estudos mostram que, quando no solo, o biodiesel pode provocar alterações na comunidade microbiana de um modo geral, por representar um grande aporte de carbono orgânico ou ainda por ser tóxico para parte da microbiota (Lapinskiene et al., 2006; Silva et al., 2012a).

2.3 Técnicas de remediação de ambientes impactados

Segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do estado de São Paulo (CETESB), uma área contaminada é definida como um local onde há comprovadamente poluição ou contaminação causada pela introdução de quaisquer substâncias ou resíduos que nela tenham sido depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados de forma planejada, acidental ou até natural e que gera impactos negativos sobre os bens a proteger. A existência de uma área contaminada pode gerar problemas como, danos à saúde, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e danos ao patrimônio público e privado, com a desvalorização das propriedades, além dos danos ao meio ambiente (CETESB, 2011).

Em 2009 o Ministério do Meio Ambiente e o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) lançaram a Resolução nº 420 que dispõe sobre

critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. De acordo com a resolução, o padrão utilizado são os valores orientadores para solos e águas subterrâneas da CETESB (2005) que foi elaborada utilizando como base a Lista Holandesa de Valores de Referência de Qualidade do Solo e da Água Subterrânea (1994). Como exemplo, os valores orientadores para os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) em um solo contendo 25 % de argila e 10 % de matéria orgânica encontram-se na Tabela 1, sendo S os valores de referência, T de alerta e I de intervenção.

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

Parâmetro	Concentração em peso seco (mg.kg ⁻¹)		
	S	T	I
Compostos remanescentes			
Ciclohexano	0,10	135,1	270,0
Ftalatos (soma)	0,10	30,1	60,0
Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP)	50,0	2525,0	5.000,0
Piridina	0,10	0,55	1,0
Estireno	0,10	50,1	100,0
Tetrahidrofuram	0,10	0,25	0,40

S- Valor de referência; T- Valor de alerta; I- Valor de intervenção.

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

Uma série de estratégias de remediação vem sendo implantadas e desenvolvidas na tentativa de restaurar a qualidade de locais impactados, sobretudo, por derivados do petróleo. Dessa forma, técnicas físicas, químicas e biológicas podem ser implementadas isoladamente ou em conjunto, com a finalidade de reestabelecer os padrões de níveis de segurança aceitáveis, de

acordo com a legislação vigente de cada país (Reddy et al., 1999; Zhu et al., 2010). A seleção da técnica empregada irá depender do contaminante, das características de cada local, das exigências regulatórias, dos custos de operação e das restrições de tempo (Riser-Roberts, 1998; Reddy et al., 1999). É importante ressaltar ainda, que embora haja a disponibilidade de diversas tecnologias aplicáveis, o processo de remediação inevitavelmente resultará na mudança ou suspensão das funções naturais do meio, seja permanente ou temporariamente (Zhu et al., 2010).

Diferentes processos químicos, físicos e biológicos são conhecidos para a remoção de hidrocarbonetos no solo (Pietroletti et al., 2010). As técnicas podem ser classificadas de duas formas, em decorrência do local de aplicação das mesmas. Quando a estratégia de descontaminação é efetuada na própria área impactada, a remediação é "*in situ*". Quando ocorre remoção do resíduo até um local adequado para a remediação, distante da fonte poluidora, as estratégias são denominadas "*ex situ*", tendo essas, custos mais elevados do que a primeira (Zhang et al., 2000). Geralmente, a remediação *ex situ* está relacionada com altas concentrações de contaminantes recalcitrantes, necessitando de estratégias mais eficientes de recuperação desses resíduos (Mohan et al., 2006).

Em relação às estratégias de descontaminação, processos físicos de remediação envolvem a separação do contaminante do local em que ele se localiza através da aplicação de altas temperaturas ou de campos elétricos, dependendo das características do contaminante. Compostos voláteis, semivoláteis ou termicamente instáveis são tratados por remediação térmica,

enquanto que a remediação eletrocinética é recomendada para descontaminação de locais impactados por compostos iônicos (Zhu et al., 2010). Processos químicos, por sua vez, incluem a aplicação de agentes oxidantes ou solventes para extração dos contaminantes do solo, como peróxido de hidrogênio, etanol, metanol, surfactantes, óleos vegetais, ciclohexano ou diclorometano. A escolha do composto varia de acordo com os poluentes envolvidos (Zhu et al., 2010).

Os processos físicos e químicos estão entre as técnicas de remediação mais aplicadas no estado de São Paulo durante o ano de 2011. Apesar de serem utilizados com grande frequência, esses processos apresentam algumas desvantagens, pois envolvem altos custos de execução quando comparados a técnicas de biorremediação, e também porque as próprias técnicas geram impacto sobre o ambiente (Sridevi et al., 2011). Processos químicos que empregam solventes, por exemplo, geram um passivo ambiental que requer um tratamento secundário para sua extração. Já, técnicas como incineração impactam o local contaminado e ainda liberam compostos tóxicos na atmosfera (Zhu et al., 2010). Alguns derivados de petróleo contêm na sua estrutura hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), hidrocarbonetos saturados, além de compostos contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio. A degradação desses compostos por processos físico-químicos envolve altos custos e pode gerar impactos ainda mais graves ao ambiente. Técnicas físico-químicas como as citadas são preferencialmente utilizadas em detrimento de abordagens biológicas, pois já estão bem estabelecidas (Head, 1998). A remediação por processos biológicos,

entretanto, é uma interessante alternativa, visto os apelos por tecnologias limpas que podem levar à redução de compostos recalcitrantes (Varsha et al., 2011).

2.4 Biorremediação

Biorremediação ou remediação biológica é definida como qualquer processo em que micro-organismos ou seu potencial enzimático são utilizados para restaurar o ambiente contaminado por xenobióticos a suas condições originais (Boopathy, 2000). Pode também ser descrita como uma “tecnologia que utiliza a atividade biológica para reduzir a concentração ou toxicidade de algum poluente” (King et al., 1997), pois os micro-organismos possuem a capacidade de transformar quimicamente uma substância persistente no ambiente, seja alterando alguma de suas propriedades ou degradando-a completamente a subprodutos oxidados, que serão, por fim, degradados a compostos inertes, como metano, amônia, gás carbônico, água e outros compostos inorgânicos, bem como a compostos celulares (Boopathy, 2000; Mariano et al., 2008a; Aluyor et al., 2009; Jacques et al., 2009).

A biorremediação passou a ser considerada como uma tecnologia ambiental pela Agência Americana de Proteção Ambiental – EPA - nos anos 1970, quando McCarty et al. (1969) utilizaram micro-organismos autóctones para descontaminar uma área atingida por derramamento de petróleo. Em 1989, o acidente envolvendo o cargueiro Exxon Valdez tornou a biorremediação conhecida mundialmente ao utilizar, junto com técnicas físicas de remediação, a estimulação dos micro-organismos degradadores presentes

no local a partir da introdução de fertilizantes, para controlar um derramamento de 41 milhões de litros de petróleo na costa do Alasca (EUA) (Peixoto et al., 2011; Chhibber et al., 2012; EPA, 2013).

Nos anos seguintes, trabalhos envolvendo processos biológicos para o tratamento de solos contaminados por derivados de petróleo passaram a se destacar (Seabra, 2008). No Brasil, o que vem motivando os estudos são o grande número de acidentes envolvendo derramamento de combustíveis no ambiente (Trindade et al., 2005). A biorremediação, em relação às demais tecnologias convencionais de remediação, se apresenta como uma alternativa de simples manutenção e de baixo risco, que envolve baixos custos operacionais, podendo ser aplicada a vastas áreas, além de apresentar custo-benefício positivo, sendo capaz de levar a destruição completa do contaminante (Pereira-Junior et al., 2009). Embora o processo, em alguns casos, possa vir a ser longo e mais demorado do que os processos físicos e químicos de remediação, a biorremediação é iniciada prontamente após o contato do poluente com a microbiota. Ainda, é eficiente na transformação de contaminantes em substâncias inócuas, sendo que o benefício máximo do processo é a completa mineralização dos compostos (Cunha & Leite, 2000; Scragg, 2005; Aluyor et al., 2009; Zhang et al., 2010; Thapa et al., 2012).

Dentre os organismos utilizados na remediação de locais impactados, os micro-organismos apresentam uma série de vantagens em relação aos demais utilizados (como as plantas, no caso da fitorremediação). Sua ampla diversidade metabólica os torna ubíquos na maioria dos ecossistemas onde contaminantes podem servir de fonte de carbono orgânico.

Dessa forma, a biodegradação de compostos persistentes, como os hidrocarbonetos de petróleo, dependerá das diferentes competências enzimáticas de populações microbianas, cuja versatilidade metabólica permite a transformação daqueles compostos em produtos a serem integrados aos ciclos biogeoquímicos naturais (Peixoto et al., 2011; Varsha et al., 2011). Na maioria dos ambientes, a seleção e o enriquecimento das comunidades microbianas degradadoras autóctones acontecem assim que uma contaminação ocorre (Margesin & Schiner, 2001). A adaptação microbiana consiste em um importante mecanismo de resposta aos contaminantes, podendo resultar na compensação de um efeito adverso por meio do aumento na atividade da microbiota restante (Silva & Vieira, 2008).

Os fungos e as bactérias são responsáveis pela biodegradação primária dos hidrocarbonetos do ambiente (Leahy & Colwell, 1990; Singh, 2006), e o sistema metabólico microbiano é o que tem se mostrado mais eficiente na biodegradação de moléculas xenobióticas recalcitrantes (Gaylarde et al., 2005). Diante dos compostos tóxicos, os micro-organismos podem desenvolver mecanismos que corroboram para sua permanência no ambiente contaminado e até mesmo facilitam a degradação dos xenobióticos. Uma das adaptações é a ativação de bombas de efluxo que, por transporte ativo, auxiliam na remoção de compostos tóxicos do citoplasma (Silva & Vieira, 2008). Alguns micro-organismos são capazes de alterar sua permeabilidade celular quando na presença de contaminantes (Carvalho et al., 2009), enquanto outros produzem biossurfactantes.

A produção de biossurfactantes aumenta a solubilidade relativa

do contaminante ao proporcionar mudanças na superfície celular microbiana, facilitando seu transporte para dentro da célula (Pijanowska et al., 2007; Bento et al., 2008; Ruggeri et al., 2009; Kaczorek et al., 2010). Os biossurfactantes são compostos anfipáticos produzidos extracelularmente como parte da membrana celular de uma série de bactérias, leveduras e fungos filamentosos durante o seu crescimento (Chen et al., 2007; Bento et al., 2008). Essas moléculas possuem propriedades emulsificantes que acarretam na diminuição da tensão superficial pela produção de pequenas gotículas que permitem a entrada na célula da fonte de carbono a ser metabolizada (Das & Chandran, 2010). O interesse biotecnológico desses compostos se dá pela sua versatilidade, podendo ser utilizados nos diversos setores da indústria. A substituição dos surfactantes sintéticos por esses biocompostos vem sendo desenvolvida pelo interesse nas suas características de baixa toxicidade e seletividade (Mulligan, 2005). 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). Essa diferenciação que os micro-organismos apresentam impulsiona a busca por um melhor entendimento do metabolismo envolvido na degradação de contaminantes, caracterização genética e o desenvolvimento de metodologias para aplicação desses organismos a campo (Megharaj et al., 2011).

As estratégias de biorremediação são classificadas de três formas:

1) Atenuação Natural ou Bioatenuação: é uma estratégia de biorremediação “*in situ*” que envolve baixos custos operacionais, pois refere-se a processos físicos, químicos e biológicos naturais de degradação que ocorrem no solo e em águas subterrâneas que levam a redução da toxicidade e/ou concentração de poluentes ou ainda à imobilização dos mesmos. A eficiência da estratégia, portanto, vai depender de fatores bióticos, como uma microbiota autóctone capacitada metabolicamente para a degradação dos compostos tóxicos além de fatores abióticos que influenciam da disponibilidade dos contaminantes. Desde 1994 é considerada como a técnica de remediação mais aceitável para o tratamento de meios impactados com combustíveis e com melhores benefícios em relação a custos além de ser ecologicamente aceitável (Atteia & Guillot, 2007; Silva et al., 2009). A aplicação da estratégia de forma isolada pode ser ineficiente e prolongada, pois grande parte dos solos são originalmente oligotróficos e desprovidos de uma população microbiana degradadora em magnitude satisfatória (Megharaj et al., 2011).

2) Bioestimulação: é a estratégia que visa otimizar as condições do ambiente a partir da adição de nutrientes, aceptores de elétrons e/ou oxigênio para estimular a microbiota existente envolvida na biorremediação. A adição de macronutrientes é feita geralmente a partir de fertilizantes solúveis, como NH_3NO_3 , K_2HPO_4 e MgNH_4PO_4 de modo a estabelecer relações C:N:P adequadas para o aumento das populações microbianas e, conseqüentemente, o aumento nas taxas de degradação por essas (Trindade et al., 2005; Megharaj et al., 2011; Thapa et al., 2012).

3) Bioaugmentação: a estratégia propõe que seja realizada uma

prospecção de organismos degradadores do local contaminado para posterior reintrodução do inóculo, geralmente na forma de consórcio, devido às interações entre os componentes do mesmo que podem levar à mineralização do composto (Mukred et al., 2008). A introdução de microbiota exógena competente é sugerida quando a os micro-organismos autóctones do local não possuem potencial metabólico para degradar o contaminante. Assim, a bioaugmentação incrementa o número de organismos aptos a degradar o composto em questão, acelerando o processo de descontaminação (Mariano, 2006; Łebkowska et al., 2011; Megharaj et al., 2011; Thapa et al., 2012).

Alguns autores defendem a aplicabilidade da bioaugmentação, (Mancera- López et al., 2008; Alisi et al., 2009; Li et al., 2009; Aleer et al., 2011; Cerqueira et al., 2011), enquanto outros relatam dificuldades que podem surgir em decorrência do emprego da estratégia. O desconhecimento dos substratos requeridos pelos micro-organismos utilizados na composição do consórcio, a competição entre a microbiota introduzida e os organismos autóctones, além da predação por protozoários, podem diminuir a população introduzida, resultando na falha da estratégia (Bouchez et al., 2000; Simon et al., 2004, Bento et al., 2005a). Dessa forma, o sucesso da estratégia depende da utilização de micro-organismos com potencial metabólico para degradar o contaminante em questão e da manutenção dos mesmos no local contaminado (Cerqueira et al., 2011).

2.5 Bioaugmentação com fungos filamentosos

Os fungos são organismos degradadores naturais, encontrados

nos mais diversos ambientes, sendo o solo, o compartimento da biosfera com maior biomassa fúngica, constituindo mais de 75 % da biomassa microbiana (Putzke, 2002; Harms et al., 2011). Para as exigências de carbono e energia, esses organismos podem utilizar diversas fontes, principalmente macromoléculas insolúveis, que precisam ser primeiramente degradadas em unidades monoméricas solúveis para a posterior assimilação, como é o caso da celulose e da lignina, moléculas complexas e recalcitrantes naturais abundantes no ambiente. O estudo da degradação desses compostos pelos fungos levou ao conhecimento de um sistema enzimático complexo constituído por enzimas extracelulares inespecíficas (Johnsen et al., 2005; Bononi, 2008; Oliveira, 2008) que poderiam apresentar potencial para a degradação de compostos tóxicos no ambiente.

Apesar da micorremediação ser menos difundida em relação a bactérias, avaliações em escala de laboratório confirmam que esses organismos apresentam um potencial enzimático competente para a degradação de compostos orgânicos recalcitrantes, como HAP, pesticidas, fenóis, dentre outros (Santos & Linardi, 2004; Bento et al., 2005a; Kim et al., 2005; Atagana, 2006; Singh, 2006; Mancera-López et al., 2008; Valentín et al., 2009; Bonugri-Santos et al., 2010; Aler et al., 2011). Comparado às bactérias e leveduras, os fungos filamentosos exibem diferentes capacidades de metabolizar hidrocarbonetos. Enquanto a capacidade daqueles organismos para metabolizar alcanos diminui com o aumento do número de carbonos, os fungos filamentosos não exibem uma degradação particular relacionada ao tamanho da cadeia carbônica (Singh, 2006), sendo reconhecidos também por

seu potencial em degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de alto peso molecular, constituintes dos derivados de petróleo (Jacques et al., 2007; Arun & Eyini, 2011). Além disso, o uso dos fungos na biorremediação é vantajoso, visto sua capacidade de crescer sob condições ambientais limite para bactérias, como meios com baixos valores de pH, pobres em nutrientes e com baixa atividade de água, como em locais de clima árido e semi-árido (Atagana, 2006; Kashangura et al., 2006; Andrade, 2009). Outra vantagem está relacionada com a sua forma de crescimento – o micélio ramifica-se rapidamente no substrato em direção à fonte de carbono-. Essa forma de espalhamento do organismo aumenta a superfície de contato com o xenobiótico, otimizando a degradação (Andrade, 2009).

O modelo fúngico mais estudado para remediação de compostos recalcitrantes no ambiente é a espécie *Phanerochaete chrysosporium* (Pointing, 2001; Zheng & Obbard, 2002; Wu & Yu, 2006; Ballaminut & Matheus, 2007). Esse basidiomiceto é conhecido pela degradação chamada de podridão branca, ou seja, são degradados componentes da madeira como lignina, celulose e hemicelulose, deixando a mesma com uma coloração esbranquiçada característica (Bononi, 2008). A estrutura molecular da lignina é similar à estrutura de alguns compostos sintéticos orgânicos. Portanto, o sistema enzimático oxidativo, extracelular e não específico (Bononi, 2008) que os fungos da podridão branca apresentam para degradar àquela molécula, pode ser responsável, pelo menos em parte, pela degradação de alguns compostos poluentes orgânicos como clorofenóis, nitrofenóis e HAP (Ballaminut, 2007; Martins et al., 2009).

Além dos fungos lignolíticos, os não-lignolíticos também são conhecidos por degradar compostos xenobióticos. O fungo não-lignolítico mais estudado na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos é um zigomiceto, *Cunninghamella elegans* (Jacques, 2005). Outros fungos filamentosos dos gêneros *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Hormoconis*, *Aspergillus*, *Hormoconis*, *Penicillium* e *Alternaria* também demonstram seu potencial biodegradador de hidrocarbonetos ao serem isolados de tanques de armazenamento de misturas de diesel e biodiesel ou ainda de solos contaminados com combustíveis (Bento et al., 2005a; Bento et al., 2005b; Passmann, 2005; Miranda et al., 2007; Jacques et al., 2008; Bucker et al., 2011).

Nos últimos anos, vários trabalhos avaliaram o uso de fungos filamentosos para biorremediação de solos contaminados com derivados de petróleo. Olusola & Anslem (2010) avaliaram a biorremediação de solo contaminado por óleo cru. A degradação de HAP foi estudada por Li et al. (2008), Silva et al. (2009) e Dai et al. (2010). Jacques et al. (2008), Chagas-Spinelli et al. (2012) e Steliga et al. (2012) utilizaram consórcios mistos de fungos com bactérias para avaliar a degradação de HAPs, óleo diesel e das diferentes frações de HTP, respectivamente. Pozdnyakova et al. (2011) analisaram as alterações nas diferentes frações de HTP durante a biorremediação com fungos. Os trabalhos citados e outros encontrados na literatura (Mancera-López et al., 2008 ; Li et al.; 2009; Aleer et al., 2011) obtiveram resultados promissores, demonstrando o potencial desses organismos na degradação dos derivados de petróleo, ressaltando a sua

importância para a descontaminação de solos atingidos por esses contaminantes.

Portanto, a capacidade de crescer sob condições ambientais de estresse, a forma de crescimento em direção à fonte de carbono e sua complexidade enzimática tornam os fungos vantajosos ao processo de biorremediação, constituindo uma alternativa biológica viável para a remediação de solos contaminados por xenobióticos (Atagana, 2006; Andrade, 2009).

2.6 Fatores abióticos que influenciam na biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo no solo

As condições bióticas e abióticas do meio são de fundamental importância para o sucesso da biorremediação (Jacques et al., 2010; Zhu et al., 2010). A biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo é um processo complexo que ocorre, na maioria das vezes por culturas microbianas mistas de maneira simultânea e depende diretamente da natureza e da quantidade dos hidrocarbonetos presentes (Seabra, 2008; Das & Chandran, 2010;). Geralmente, a biodegradabilidade dos componentes diminui na seguinte ordem: n-alcanos > alcanos ramificados> aromáticos de baixa massa molecular> ciclo alcanos> aromáticos de alta massa molecular (Van Hamme et al., 2003), sendo que em alguns casos, compostos aromáticos como os HAP podem não ser degradados (Atlas & Bragg, 2009). A disponibilidade do contaminante aos micro-organismos é um dos principais fatores que limita a biodegradação. Solos ricos em matéria orgânica e com alto teor de argila

reduzem a biodisponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos devido à sorção às fases sólidas mineral e orgânicas o solo, além de penetrarem nos microporos do ambiente (Alexander, 2000; Trindade et al., 2005; Nazarov et al., 2010). Portanto, as condições do solo também são limitantes à biorremediação à medida que suas características podem ser favoráveis ou não à sobrevivência e à atividade dos microrganismos degradadores (Jacques et al., 2007).

Os fatores ambientais também exercem influencia sobre as taxas de degradação. Dentre os principais, podem ser citados:

1) Temperatura: alterações de temperatura podem afetar a química do contaminante, alterando sua viscosidade e toxicidade, além de afetar fisiologicamente a microbiota (Atlas, 1981; Seabra, 2008; Das & Chandran, 2010).

2) Concentração de nutrientes: nitrogênio, fósforo são os macronutrientes que influenciam diretamente a atividade microbiana e podem ser limitantes ao processo de degradação (Das & Chandran, 2010; Santos et al., 2011; Liang et al., 2012). O ajuste da relação C:N:P deve ser avaliado, e se necessário após um evento de contaminação, ser efetuado a partir da adição de nitrogênio e fósforo, visto que, por apresentar em sua constituição majoritariamente hidrocarbonetos, a presença do contaminante no ambiente representa um aporte de carbono orgânico no ambiente.

3) pH: o pH do solo é responsável por controlar os processos biológicos. A faixa de pH requerida para manter as atividades microbianas está entre 5,5 e 8,8, e para a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, entre

6,5–8,0 (Thapa et al., 2012). No Rio Grande do Sul, a presença de solos ácidos demanda a correção do pH através da adição de CaCO_3 , deixando o pH numa faixa neutra e favorável à biodegradação (Bissani et al., 2008; Liang et al., 2012).

4) Umidade do solo: A água no solo é necessária para as funções fisiológicas dos organismos, portanto, o nível de umidade deve estimular a microbiota degradadora sem, no entanto, levar à redução da permeabilidade do solo e ao teor de oxigênio. Normalmente, os teores de água no solo ideais para atividade microbiana são de 25 a 85% da capacidade de campo (Paul & Clark, 1989; Seabra, 2008). A capacidade de campo é uma medida utilizada para o ajuste da quantidade de água de um solo. Por definição, é a quantidade de água presente em um solo no qual todos os micro poros deste estão saturados (Bissani et al., 2008).

5) Níveis de oxigênio: O oxigênio é necessário para os passos iniciais da degradação aeróbica dos hidrocarbonetos. A biodegradação ocorre através de reações de oxidação-redução, onde os contaminantes são oxidados na presença de determinados receptores de elétrons, sendo o oxigênio um dos principais aceptores nos sistemas aeróbicos (Atlas, 1981; Leahy & Colwell, 1990; Chapelle, 2001; Thapa et al., 2012). No solo, a disponibilidade de oxigênio é dependente das taxas de consumo da microbiota, do tipo de solo e da quantidade de saturação hídrica (Bossert & Bartha, 1984).

2.7 Fisiologia da degradação da mistura diesel/biodiesel

A rota metabólica aeróbia de degradação de poluentes orgânicos

é mais rápida e completa, e envolve a ação de oxigenases, enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons entre moléculas (Das & Chandran, 2010; Pazmiño et al., 2010). Essas enzimas se dividem em duas categorias: as mono-oxigenases, que incorporam um átomo de O_2 ao seu substrato, e as dioxigenases, que incorporam dois átomos de O_2 ao substrato.

Bactérias e leveduras realizam a biodegradação aeróbia de n-alcenos, constituintes principais do diesel, e de ácidos graxos através de uma classe específica de mono-oxigenases, as alcanos hidroxilases, a partir da introdução de um grupo hidroxila nas regiões terminais, subterminais ou biterminais da cadeia hidrocarbônica (van Beilen & Witholt, 2004; van Beilen & Funhoff, 2005; Funhoff & van Beilen, 2006; Hamamura et al., 2008). A clivagem das ligações C-H acarreta na oxidação da molécula a um álcool, depois a um aldeído e, finalmente, a um ácido graxo (Mercedes et al., 2001; Belhaj et al., 2002). Estes compostos podem entrar nas rotas biossintéticas típicas de degradação de ácidos carboxílicos, em que a molécula é quebrada em ácidos menores. Ainda, ácidos graxos podem servir como fontes de carbono para bactérias de uma comunidade, podendo aumentar o índice de degradação dos hidrocarbonetos (Vasconcellos, 2006).

As enzimas envolvidas na oxidação de alcanos pelos fungos filamentosos, no entanto, ainda não são conhecidas. Pedrini et al. (2007) citam que a rota metabólica de degradação desses compostos ocorrem por vias análogas a de leveduras e bactérias, porém, Schulz et al. (2012) relatam que os fungos filamentosos não utilizam a via de mono-oxigenases para a degradação desses compostos, e que ainda são necessários estudos para

determinar a via oxidativa de n-alcenos por esses organismos. A via de degradação de n-alcenos por bactérias e fungos leveduriformes está ilustrada na Figura 2.

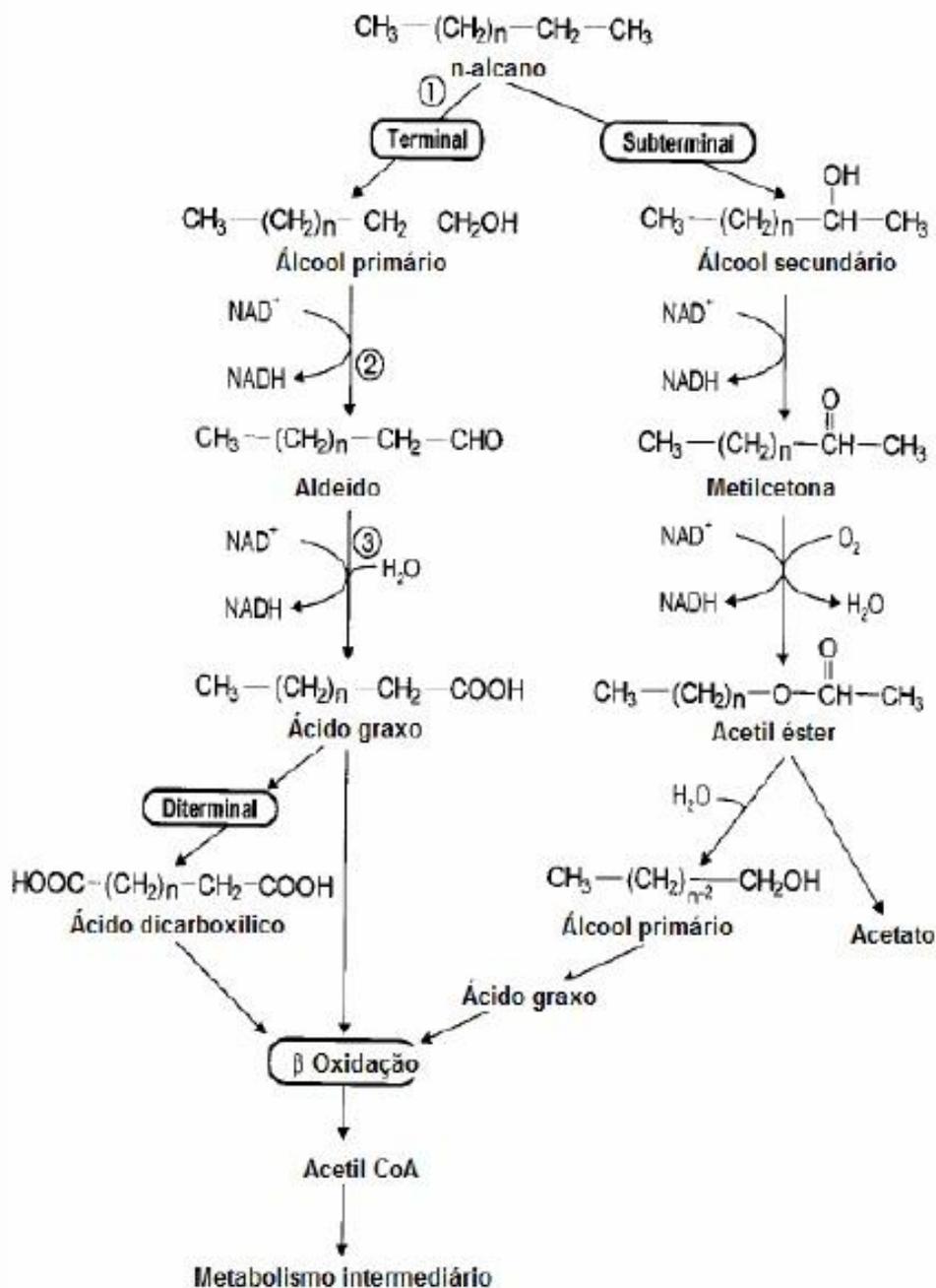


Figura 2: Rota de degradação de n-alcenos (Fritsche & Hofrichter, 2000).

A biodegradação dos compostos aromáticos ocorre através da

inserção de um ou dois átomos de oxigênio à molécula, sendo as dioxigenases as principais enzimas ligadas ao metabolismo desses compostos. Essas enzimas são classificadas como periféricas ou de fissão (Mishra et al., 2001). As primeiras participam dos processos de inserção dos átomos de oxigênio à molécula, de hidroxilação do anel de ressonância e de rearomatização geral desses compostos. Como resultado, formam-se compostos intermediários centrais como o catecol (em bactérias) e o protocatecol (na maioria dos fungos e em algumas bactérias) (Fuchs et al., 2011). Após a degradação periférica, as enzimas de fissão passam a atuar na clivagem do anel aromático, que pode ocorrer tanto na posição *orto* (entre dois grupos hidroxil) quanto na posição *meta* (adjacente a grupos hidroxil) (Nozaki et al., 1970; Direito, 2005). 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, respectivamente. Uma vez clivados, os compostos aromáticos são transformados em intermediários das rotas comuns do metabolismo microbiano, via ciclo do ácido cítrico (Bamforth & Singleton, 2005) (Figura 3).

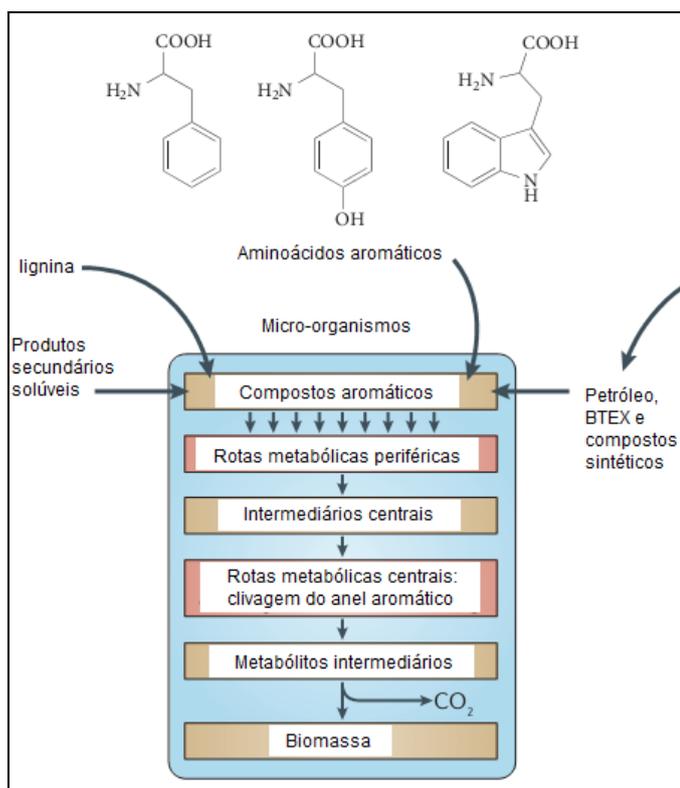


Figura 3. Rota de degradação de compostos aromáticos (Fuchs et al., 2011).

A rota para a biodegradação do biodiesel tem início na hidrólise do etil ou metil éster a partir da ação de lipases ou esterases. Essas enzimas constituem exemplos de carboxilesterases e destacam-se por sua estabilidade em solventes orgânicos, alta especificidade com relação ao substrato e o não requerimento de cofatores para a reação (Whiteley et al., 2003; Suzuki et al., 2004, Hasan et al., 2006). A diferença entre as enzimas está relacionada ao tamanho da cadeia de ácidos graxos que hidrolisam: as lipases atuam preferencialmente na degradação de ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que as esterases hidrolisam ésteres simples e triglicerídeos com cadeias de no máximo C₆. Além disso, as esterases atuam em substratos somente solúveis em água; as lipases, ao contrário, estão ativas em soluções hidrofóbicas

saturadas e apresentam sua atividade aumentada no momento em que entram em contato com uma concentração mínima desses substratos. Esse aumento na atividade enzimática ocorre devido a alterações conformacionais na enzima induzidas pelo substrato, de modo que o sítio ativo fique disponível para atuar na hidrólise do mesmo (Jaeger et al., 1994; Tesch et al., 1996; Bornscheuer, 2002, Reis et al., 2009). Como resultado da degradação desses compostos, tem-se um ácido graxo e um álcool. O ácido graxo, mesmo quando longo, entra na via de β -oxidação, que promove o encurtamento da molécula até o ácido inicial ser completamente oxidado a acetil-CoA (Zhang et al., 1998; Chapelle, 2001).

A degradação da mistura diesel/biodiesel, grande parte das vezes, é facilitada pela presença do biocombustível na mistura. Por apresentar em sua configuração majoritariamente ácidos graxos, o biodiesel constitui um substrato natural para as enzimas microbianas existentes (Owsianiak et al., 2009; Balat, 2011; Yusuf et al., 2011). Dessa forma, a biodegradação das frações orgânicas de derivados do petróleo seria incrementada pela ação de efeitos sinérgicos promovidos pelo biodiesel via cometabolismo microbiano, de modo que quanto maior a concentração deste óleo em uma mistura, maior a taxa de degradação do combustível total (Zhang et al., 1998; Mudge & Pereira, 1999; Fernández-Álvarez et al., 2007). Estudos de Mariano et al., 2008a e Owsianiak et al., 2007 relatam as alterações na cinética de degradação da mistura quando o biodiesel é adicionado ao diesel. No entanto, DeMello et al. (2007), informam que a biodegradabilidade das misturas de diesel/biodiesel pode ser variável, 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.

2.8 Metodologias de monitoramento da degradação da mistura diesel/biodiesel

A respirometria é uma forma indireta de estimar a descarboxilação de compostos orgânicos que são degradados no sistema (Margesin et al., 2000), sendo uma metodologia proposta para avaliar a mineralização de um dado contaminante. Muitos estudos demonstram a relação entre o CO₂ liberado e a degradação de poluentes orgânicos (Jacques et al., 2008; Silva et al., 2009; Meneghetti et al., 2012). No entanto, a degradação de alguns compostos pode acarretar na formação de compostos ainda mais recalcitrantes e tóxicos no ambiente. Portanto a necessidade de se conhecer os intermediários formados pela degradação primária do contaminante, como as frações de hidrocarbonetos de petróleo e ácidos graxos do biodiesel, tornaram técnicas analíticas como processos cromatográficos necessários em estudos de biorremediação (Sendzikien et al., 2007; Mariano et al., 2008b).

As técnicas cromatográficas tornam possível a separação de misturas de composição complexas de diversas substâncias químicas, com grande eficiência e reprodutividade (Moreira, 2011). São métodos físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra são separados por partição em duas fases, uma móvel e outra estacionária (Gonçalo, 2004). A cromatografia gasosa (CG) é utilizada na análise de diversos compostos,

dentre os quais, os combustíveis. A técnica utiliza como fase móvel um gás quimicamente inerte à fase estacionária e aos componentes da mistura a ser analisada. Para análises mais detalhadas, a técnica pode ser empregada em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, quando colunas cromatográficas são acopladas a detectores de ultravioleta, infravermelho e à espectrofotometria de massa (Luz, 2010; Moreira, 2011).

Ainda, as técnicas cromatográficas podem ser utilizadas como complementares à respirometria nos ensaios de biorremediação. Essas metodologias de estimativa de degradação são utilizadas em diversos trabalhos que avaliam a biodegradação de poluentes orgânicos como hidrocarbonetos derivados de petróleo e suas misturas com biocombustíveis no solo (Jacques et al., 2008; Mariano et al., 2009; Meneghetti et al., 2012; Silva et al., 2012a) e também em meio líquido (Cerqueira et al., 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em duas etapas. Primeiramente, um solo sem histórico de contaminação foi contaminado artificialmente com a mistura B10, e, a partir da estratégia de bioaugmentação com fungos filamentosos previamente isolados de *landfarming* (área de deposição de resíduos petroquímicos) e de tanques de combustível, foi comparada a eficiência da remoção do contaminante desta estratégia com a estratégia de atenuação natural (Ensaio Preliminar de Biorremediação). Na segunda etapa, foi realizado o isolamento de fungos filamentosos do solo do tratamento de atenuação natural do primeiro experimento de biorremediação. Foi realizada a seleção daqueles que apresentavam potencial de degradação da mistura B10, para posterior reintrodução no solo, em um novo ensaio de biorremediação. Durante essa fase, também foram selecionados quanto ao potencial de degradação de B10 em meio líquido, fungos isolados de tanques de combustível de estudos anteriores. Um segundo experimento de biorremediação foi desenvolvido, onde foram monitoradas diferentes estratégias de biorremediação: bioaugmentação com microbiota autóctone e com fungos exógenos, além da bioaugmentação tardia, bioestimulação e atenuação natural.

3.1 Combustíveis

A mistura B10 (90 % de óleo diesel e 10 % de biodiesel) foi escolhida para o estudo, sendo utilizado óleo diesel metropolitano contendo 50 ppm de enxofre, e de biodiesel metílico constituído por 70% de óleo de soja e 30% de gordura animal. Ambos combustíveis foram fornecidos pela Ipiranga Distribuidora de Petróleo S.A.. A preparação da mistura B10 foi realizada no laboratório com auxílio de uma proveta graduada, previamente desinfetada. A esterilização do combustível foi realizada por meio de filtração a vácuo com membranas de porosidade de 0,22 μm , utilizando um frasco *kitassato* esterilizado. Após esse processo, o combustível foi armazenado à temperatura ambiente, em frascos de vidro estéreis e hermeticamente fechados, cobertos por papel alumínio e em local protegido da luz, para evitar a foto-oxidação.

3.2 Coleta do solo

Amostras de solo com profundidade de 0-20 cm foram coletadas em um local sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, em uma área cultivada com plantas forrageiras na Faculdade de Agronomia da UFRGS (30°06'91"S 51°14'27"O), no município de Porto Alegre, RS. As amostras foram transportadas em sacos de plástico escuros até o Laboratório de Biorremediação de Solos do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia (UFRGS), para a realização dos experimentos. As amostras foram secas a temperatura ambiente e, após, peneiradas em malha de 2 mm e armazenadas sob refrigeração a 4°C até a realização dos estudos. Uma amostra de 10 g foi enviada para análise físico-química no Laboratório de

Análise de Solos da UFRGS, de acordo com a metodologia descrita por Tedesco et al. (1995), estando os resultados mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Análise físico-química do solo amostrado.

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

3.3 Ensaio preliminar de biorremediação

3.3.1 Contaminação do solo

Uma amostra do solo coletado foi artificialmente contaminada com a mistura B10, a fim de simular uma contaminação considerada como um “valor de intervenção” segundo os valores orientadores para qualidade do solo da CETESB (2005). A mistura B10 foi derramada cuidadosamente sobre o solo e homogeneizada com o auxílio de uma espátula previamente desinfetada. A concentração final de combustível adicionada foi correspondente a 20 g HTP.kg⁻¹ de solo.

3.3.2 Fungos utilizados

Os fungos utilizados para essa etapa foram *Paecilomyces variotii* e *Pseudallescheria boydii*, isolados em trabalhos anteriores de tanques com a mistura diesel/biodiesel e de área de landfarming com borra de petróleo, respectivamente (Bücker, 2009; Schultz, 2010).

Para o preparo do pré-inóculo, os fungos foram cultivados em tubos inclinados com ágar Malte por cinco dias a 30°C. Após esse período, foi feita a remoção dos esporos através da adição de 2 mL de água destilada e de 2 mL de uma solução do surfactante Tween 80 0,01% sobre o micélio. O uso do surfactante teve como objetivo facilitar a dispersão dos esporos, uma vez que esses apresentam propriedades adstringentes. A solução de esporos foi transferida para um tubo de centrifuga de 50 mL estéril e deixada por 12 h em solução salina estéril a fim de que ocorresse o esgotamento das reservas energéticas. Após esse período, foi realizada a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. A partir disso, foi preparada uma suspensão dos esporos em solução salina estéril a fim de se obter um inóculo inicial com concentração de 10^5 esporos.g⁻¹ de solo para cada fungo.

3.3.3 Montagem dos microcosmos

Os ensaios foram montados em microcosmos, que são frascos de vidro hermeticamente fechados com capacidade de 1,5 L. Em cada frasco foram adicionados 200 g de solo artificialmente contaminado. A quantidade de solo adicionada a cada frasco foi determinada de forma que permitisse aeração adequada em cada recipiente, a fim de que o oxigênio não se tornasse um fator

limitante para a degradação. A capacidade de campo foi ajustada com água destilada estéril para 80 %, conforme Tedesco et al. (1995). Para avaliar a degradação, foram utilizadas as seguintes estratégias em triplicata: bioaugmentação, com a adição do inóculo fúngico; atenuação natural, no qual foi considerada apenas a microbiota autóctone presente no solo contaminado; tratamento controle, onde foi utilizado o solo não contaminado sem introdução de microbiota exógena. Os frascos foram mantidos por 30 dias a temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), em local protegido da luz.

3.3.4 Avaliação da degradação do contaminante

3.3.4.1 Respirometria

A liberação de CO_2 constitui uma medida indireta utilizada para avaliar a atividade microbiana no solo, e a partir desses valores pode-se obter uma estimativa da degradação do contaminante. Assim, os frascos de vidro com o solo foram equipados com um aparato constituído por copos plásticos com capacidade para 50 mL, suspensos por um tripé de metal, contendo uma solução de NaOH 0,5 M para a captação do CO_2 liberado. As medições foram realizadas a cada dois dias. Os frascos hermeticamente fechados foram abertos apenas para a realização das análises e substituição do NaOH. Para esse procedimento, logo após a abertura dos frascos foram adicionados 2 mL de BaCl_2 30 % ao hidróxido de sódio a fim de precipitar o CO_2 em solução. Em seguida, foram adicionadas seis gotas do indicador fenolftaleína 1 % para determinar a quantidade de NaOH residual na solução através da titulação com HCl 1 M. Antes de fechar os frascos, o solo era revolvido mecanicamente

para promover sua aeração. A produção de C-CO₂ (mg.Kg solo seco⁻¹) foi determinada segundo cálculo descrito por Stotzki (1965).

$$C\text{-CO}_2 \text{ (mg.kg}^{-1}\text{)} = \frac{[(B - T) \times \text{eq} \times M \text{ HCl} \times \text{FC}]}{M_c}$$

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 ($M_{\text{HCl}}/M_{\text{NaOH}}$);

M_c = massa de solo seco (Kg);

3.3.4.2 Cromatografia Gasosa (CG)

Para determinação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), foram retiradas amostras compostas dos três frascos de cada tratamento, totalizando 1 g. As amostras foram mantidas em geladeira até o envio para análises cromatográficas. A determinação das frações leves, correspondentes à faixa de C₁₂-C₂₃, e pesadas, C₂₃-C₄₀, dos HTPs foram realizadas segundo a metodologia ISO / DIN 16703. As amostragens foram realizadas no tempo inicial e final do ensaio. O percentual de degradação foi calculado pela diferença entre as concentrações de HTP no tempo 30 dias em relação à

concentração de HTP presente no tempo inicial.

3.4 Seleção de fungos degradadores para aplicação em processos de biorremediação

3.4.1 Isolamento dos fungos do solo

O isolamento dos fungos foi realizado conforme a metodologia de enriquecimento com modificações. Para o procedimento, 2 g de solo foram inicialmente adicionados a 20 mL de meio mineral (Bushnell & Hass, 1941) esterilizado contendo 1 % da mistura B10, que constituiu a única fonte de carbono presente. As amostras, em triplicata, foram submetidas à agitação de 180 rpm a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 21 dias. Durante esse período, a cada sete dias, realizaram-se transferências das amostras, para meios de mesma composição, com o objetivo de assegurar que o crescimento microbiano ocorresse como fonte exclusiva de carbono a mistura diesel/biodiesel, constituindo uma pressão seletiva. Após finalizar a transferência semanal das amostras, uma alíquota de 100 μL foi retirada de cada frasco e inoculada em meio mineral sólido (pH 5) contendo 10 % da mistura B10 e também em meio ágar Sabouraud-Dextrose com cloranfenicol (100 mg.L^{-1}) (ANVISA 2004), para evitar o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas em estufa a 30°C até que o crescimento dos fungos fosse observado. As colônias com diferenças morfológicas foram transferidas para meio ágar Malte, até a obtenção das colônias fúngicas puras, que foram armazenadas em tubos de ensaio, em geladeira.

3.4.2 Isolamento dos fungos de tanques de combustível

Os fungos foram isolados em 2010 durante estudos anteriores a partir de tanques de combustível contendo a mistura B5 (Galves et al., 2009). Os isolados foram mantidos em tubos de ensaio com ágar Malte a 4°C.

3.4.3 Identificação morfológica dos isolados

A primeira etapa de identificação dos isolados procedeu por análise morfológica através da técnica de microcultivos. Essa técnica se destaca por manter íntegras as estruturas reprodutivas, como conidióforos ou esporangiósporos, facilitando a separação dos fungos em famílias taxonômicas ou até mesmo em gêneros. Assim, foi possível obter uma identificação prévia a nível de gênero dos micro-organismos selecionados.

O procedimento foi realizado a partir da metodologia descrita no Manual para Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica da ANVISA (2004) com modificações. A metodologia consiste em ajustar uma lâmina de microscopia sobre um pequeno suporte, em uma placa de Petri, junto com um algodão umidificado com água destilada, também estéril, de forma a manter o ambiente úmido, propiciando o desenvolvimento dos fungos. Sobre a lâmina, coloca-se um pedaço de meio de cultura, e nos cantos desse, adiciona-se, com auxílio de uma alça de platina, o fungo. Sem pressionar, cobre-se a lâmina com uma lamínula esterilizada. A placa é fechada e mantida em estufa a 30°C. As placas foram retiradas da estufa em tempos diferentes (com diferença de 2 a 4 dias) para a análise morfológica em microscópio óptico, e adicionado o corante azul de metileno para melhor visualização das

estruturas (ANVISA, 2004).

3.4.4 Extração de DNA e identificação molecular do isolado

S1

O micélio fúngico foi obtido por inoculação da cepa em meio caldo Malte por 7 dias, à temperatura de 28°C. Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo desenvolvido por Ferreira & Grattapaglia (1996). O micélio foi macerado e cerca de 500 mg foram acondicionados em microtubo, onde foram adicionados 700 µL de tampão CTAB preaquecido a aproximadamente 65°C. Os microtubos foram incubados em banho maria a 65° C, entre 30 minutos e uma hora, sendo agitados a cada 10 minutos. Ao homogeneizado foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e se agitou por cinco minutos; em seguida, centrifugou-se por dez minutos a 10.000 x g. Em novos tubos identificados, transferiu-se a fase aquosa, a qual adicionaram-se 400 µL de isopropanol gelado (-20°C) misturando-se suavemente por inversão dos tubos, várias vezes. As amostras foram então submetidas à temperatura de -20°C por 30 minutos ou mais, para formação do sedimentado. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 x g e se descartou o sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70 %, por cinco a dez minutos e uma vez com etanol absoluto, por três minutos. Secou-se o precipitado, deixando os tubos em câmara de fluxo laminar. O DNA extraído foi ressuspenso em 150 µL de TE e incubou-se a 37°C, por 30 minutos a duas horas.

A identificação do isolado S1 foi realizada através da amplificação

e sequenciamento de um fragmento de DNA que codifica a região intergênica ITS (Internal transcribed spacer) do DNA ribossomal incluindo o gene 5,8S. Os isolados foram submetidos à amplificação utilizando os iniciadores ITS 1 (5'TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') ITS4 (WHITE et al., 1990).

As reações foram otimizadas em 25 µL de água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore) e continham 20 ng.µl⁻¹ de DNA molde, 3 mM MgCl₂, 0,64 pmol de cada iniciadores, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2,5 x de tampão (Invitrogen) e 0,32 mM de desoxinucleotídeos (ABgene).

As reações foram incubadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C; seguido por 35 ciclos de 15 s a 94°C, 45 s a 55°C e 90 s a 72°C; e 6 min a 72°C. O produto de PCR esperado de 600pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1,5 %) corados com SyberSafe ® para visualização em luz Ultravioleta, e purificados utilizando-se PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen).

A sequência foi obtida com o sequenciador automático Amersham MegaBACE 1000, utilizando os protocolos padronizados na Rede Genoma Brasileira, e o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer, com os protocolos estabelecidos pela empresa Ludwig Biotech Brasil. Ambos equipamentos se localizam no Centro de Biotecnologia, Cbiot-UFRGS-RS, Brasil.

A identificação do isolado foi realizada pela comparação da sequência obtida com as sequências depositadas no banco de dados GenBank

utilizando-se o programa BLAST.

3.4.5 Avaliação preliminar da capacidade biodegradadora da mistura B10 utilizando o indicador-redox 2,6 diclorofenol indofenol (DCPIP)

Após o isolamento dos fungos, foi conduzida a pré-seleção dos isolados com capacidade para metabolizar a mistura B10. Para tanto, utilizou-se a metodologia proposta por Hanson (1993), na qual é utilizado o indicador redox 2,6 diclorofenol indofenol (DCPIP) em meio mineral mínimo acrescido com a fonte de carbono de interesse. A utilização da fonte de carbono pelos micro-organismos é observada através da alteração na coloração do indicador, que passa de azul escuro para incolor. A modificação na coloração ocorre devido à oxidação da fonte de carbono, que provoca a liberação de um fluxo de elétrons no meio que são aceitados pelo indicador, reduzindo o mesmo. O indicador exerce função similar ao oxigênio, o nitrato ou o sulfato, se comportando como um acceptor artificial na cadeia transportadora de elétrons.

O estudo foi realizado em frascos de vidro com capacidade para 25 mL, nos quais foram adicionados ao meio mineral mínimo (Bushnell & Hass, 1941) com o indicador redox DCPIP três concentrações diferentes da mistura B10 juntamente com o inóculo fúngico, preparado como descrito anteriormente (3.4.2). Em cada frasco foram então adicionados 10 mL de meio, a mistura B10 nas concentrações de 1, 5 e 20 % e o inóculo totalizando 10^5 esporos.mL⁻¹. O experimento foi realizado em triplicata e os frascos foram armazenados em estufa a 30°C protegidos da luminosidade para evitar a foto-oxidação do

indicador e do combustível. A alteração no meio foi acompanhada a cada 24 h e após 14 dias foi avaliado o crescimento de cada fungo através da quantificação da biomassa pela técnica do peso seco. Para tanto, a biomassa foi retida em discos de papel filtro previamente pesados. Para a remoção do excesso de óleo, utilizou-se 2 mL de hexano sobre cada disco. Os discos foram colocados em estufa a 50°C para a remoção da umidade, e após foram transferidos para um dessecador de onde foram retirados somente para a pesagem.

3.4.6 Ensaios em meio líquido – Determinação das condições ótimas para o crescimento pela metodologia de superfície de resposta e curva de crescimento

A partir da pré-seleção com o indicador redox, foram selecionados quatro fungos para as análises de biodegradabilidade da mistura B10 em meio líquido. Os fungos utilizados no ensaio preliminar de biorremediação (item 3.4) também foram submetidos às análises.

A fim de determinar as condições ótimas de pH e temperatura para o crescimento de cada um dos isolados, foi utilizado um planejamento experimental fatorial, que permite variar fatores simultaneamente, possibilitando avaliar os efeitos de cada fator no sistema, assim como interações entre os fatores (Calado e Montgomery, 2003). Neste trabalho foi utilizado um delineamento experimental do tipo 3^2 onde as variáveis estudadas foram temperatura e pH nos níveis: 10°C, 20°C e 30°C para temperatura e 4,0, 5,5 e 7,0 para pH, a fim de determinar as condições ideais para o crescimento do

fungo, que consistiu na variável de resposta.

Os ensaios foram montados em frascos de vidro estéreis com capacidade para 150 mL. Em cada frasco foram adicionados 50 mL de meio mineral (Bushnell & Hass), 20 % da mistura B10 como fonte de carbono e o inóculo fúngico, preparado como descrito no item 3.3.2, na concentração de 10^5 esporos.mL⁻¹. Os experimentos foram realizados em triplicata totalizando 27 ensaios. Os resultados experimentais foram analisados pelo software Statistica 8.0 (StatSoft) conforme o modelo de regressão da equação abaixo, onde b são os coeficientes da regressão e Y é a resposta (biomassa após 21 dias de incubação).

$$Y = b_0 + b_1 \cdot \text{pH} + b_2 \cdot T + b_{11} \cdot \text{pH}^2 + b_{22} \cdot T^2 + b_{12} \cdot T \cdot \text{pH}$$

A partir dos resultados obtidos com a metodologia de superfície de resposta, determinou-se quais as temperaturas e pH ideais para o crescimento de cada fungo. Assim, um segundo ensaio de crescimento foi montado. Foram utilizados frascos de vidro estéreis com capacidade para 150 mL nos quais foram adicionados 50 mL de meio mineral (Bushnell & Hass), 20% da mistura B10 como fonte de carbono e o inóculo fúngico, preparado como descrito no item 3.3.2, na concentração de 10^5 esporos.mL⁻¹. O ensaio foi realizado em triplicata com amostras destrutivas, e o controle foi realizado a partir de frascos contendo apenas o meio mineral e a mistura B10. Os frascos foram acondicionados durante 21 dias de modo que permanecessem protegidos da luminosidade. A cada sete dias foram realizadas análises das fases aquosa, além de avaliações do crescimento, conforme descritas a seguir.

3.4.7 Análises da fase aquosa

A fase aquosa dos experimentos foi avaliada quanto ao crescimento, quanto à presença de substâncias tensoativas, presença de metabólitos com características ácidas ou básicas e ainda quanto à atividade das enzimas catecol 1,2 dioxigenase (C1,2O), catecol 2,3 dioxigenase (C2,3O), protococatecol 3,4 dioxigenase (P3,4O) e lipase.

3.4.7.1 Produção de biossurfactantes

A fim de detectar a produção de surfactantes foram realizadas medidas da tensão superficial nos tempos inicial e final da curva de crescimento. A medida foi avaliada na ausência de células fúngicas, removidas por centrifugação (10000 rpm por 30 min) e posterior filtração da biomassa. A medida da tensão superficial das amostras foi determinada em um medidor de tensão superficial digital (Gibertini, Milão, Itália), utilizando o método da placa de Wilhelmy. Foram utilizados a água destilada ($72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) e o etanol 98% ($22,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) como padrões para a calibração do aparelho.

3.4.7.2 Medidas de pH

A detecção dos metabólitos de natureza ácidas ou básicas oriundos da degradação do combustível avaliado e presentes na fase aquosa, foi monitorada a partir de medidas do pH nos tempos 1, 7, 14 e 21 dias. As medidas foram realizadas com o auxílio de um eletrodo de pH acoplado a um potenciômetro da marca Digimed DM-22.

3.4.7.3 Avaliação da atividade enzimática

Para a detecção das enzimas intracelulares C1,2O, C2,3O, P3,4O, foi utilizada a metodologia proposta por Balajee & Mahdevan (1987) com modificações, na qual a extração das enzimas é realizada a partir de duas lavagens do extrato celular com tampão fosfato 0,025 M, pH 7 em centrifugações a 10000 rpm, 5°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o extrato celular macerado com auxílio de pequenas esferas de vidro que foram colocadas em tubos de 50 mL junto à biomassa e tampão fosfato 0,1M. A lise do micélio ocorreu ao levar os tubos ao vortex por 2 min. Em seguida, o extrato foi novamente centrifugado a 10000 rpm, 5°C por 30 min. O sobrenadante foi filtrado e deixado no gelo para realização das análises enzimáticas.

A atividade da lipase procedeu a partir da análise de uma alíquota de 100 µL retirada diretamente da fase aquosa.

3.4.7.3.1 Determinação da atividade das enzimas C1,2O, C2,3O e P3,4O

A atividade da C1,2O foi determinada pela formação de cis-muconato, a partir do aumento da absorbância a 260 nm, conforme a metodologia descrita por Hegman (1966).

A C2,3O, foi medida pela determinação da formação do produto 2-hidroximucônico semialdeído através do aumento da absorbância em espectrofotômetro a 375 nm, conforme descrito por Baggi et al (1987).

A atividade da P3,4O foi determinada pelo decréscimo da absorbância a 290 nm, devido à formação de cis-muconato, conforme descrito

por Fujisawa & Hayaishi (1968).

As unidades das atividades enzimáticas foram expressas por miligrama de proteínas totais ($U \cdot mg^{-1}$) de acordo com os seguintes cálculos:

Equação 1:

$$\epsilon = \frac{A}{c \cdot L}$$

Sendo:

ϵ = coeficiente de extinção molar;

A = absorvância no tempo zero;

c = concentração do substrato (μM);

L = caminho percorrido pela luz (cm).

Equação 2:

$$U / mg = \frac{\Delta A \cdot V_1}{\Delta T \cdot \epsilon \cdot V_2 \cdot mg}$$

Sendo:

ϵ = coeficiente de extinção molar;

V_1 = volume total da reação;

V_2 = volume da suspensão enzimática;

ΔA = variação da absorbância ($A_{15 \text{ min.}} - A_{0 \text{ min.}}$);

ΔT = variação do tempo (15 min – 0 min.);

mg = miligramas de proteínas totais.

3.4.7.3.2 Determinação de proteínas totais

A determinação da concentração das proteínas totais (mg.mL^{-1}) foi realizada para a determinação da atividade enzimática. O método utilizado foi o proposto por Bradford (1976). O preparo do reagente é feito a partir de 100 mg de Coomassie Blue BG250 (Merck, Alemanha) dissolvidos em 50 mL de etanol 95 %. A essa solução são adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85 %. Por fim, a solução final foi diluída com água destilada em volume de 1 L e filtrada, sendo posteriormente armazenada sob proteção da luz a 4°C. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro (Bioespectro SP-220). Foi construída uma curva padrão tendo como base as seguintes concentrações de Albumina Sérica Humana (BSA): 120, 150, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.4.7.3.3 Determinação da atividade da lipase

Para avaliar a atividade lipolítica, foi utilizada a metodologia de Winkler & Stuckmann (1979), que utiliza o p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) como substrato. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 410 nm e a atividade foi calculada de acordo com a curva padrão previamente obtida. A unidade de atividade enzimática (U) foi expressa pela quantidade de lipase capaz de liberar 1 μmol de p-NPP por minuto.

3.4.8 Avaliação do crescimento

O crescimento dos fungos filamentosos foi estimado pela biomassa formada na interface óleo-água. A biomassa foi monitorada durante 21 dias conforme descrito no item 3.4.5

3.5 Biorremediação

3.5.1 Amostra de solo não contaminado

O solo utilizado na montagem dos microcosmos foi coletado em outubro de 2012 na mesma área onde foi realizada a coleta do solo para o Ensaio Preliminar de Biorremediação e sob as mesmas condições (item 3.2), na Faculdade de Agronomia da UFRGS. A amostra foi seca a temperatura ambiente, peneirada em malhas de 2 mm e mantida a 4°C até a montagem do experimento.

3.5.2 Montagem dos microcosmos

Os microcosmos foram montados em triplicatas, em frascos de vidro, com fechamento hermético e capacidade de armazenamento de 1,5 L. Em cada frasco foram distribuídos 150 g de solo, a fim de garantir a aeração adequada para o processo de degradação. A capacidade de campo foi ajustada para 80 % com água destilada estéril. A umidade gravimétrica foi monitorada ao longo do período de incubação do solo a partir de pesagens dos microcosmos. O ajuste de água foi feito sempre que necessário, através da adição de água destilada estéril (Tedesco et al., 1995).

O pH do solo foi ajustado em 6,5 anteriormente à montagem do

experimento. Foi incorporado ao solo CaCO_3 , na quantidade recomendada por Bissani et al. (2008), e deixado sob incubação a temperatura ambiente por dois dias. Esse procedimento de incubação prévio é realizado para que não ocorra uma superestimativa na quantificação de CO_2 liberado, observada nos primeiros dias do experimento de respirometria, devido à adição do corretivo calcário.

Durante o tempo de análise experimental, os sistemas foram mantidos em laboratório sob temperatura ambiente ($30^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$).

Cinco estratégias de biorremediação foram avaliadas para análise da degradação da mistura B10, além do controle negativo, constituindo o solo sem adição do contaminante. A contaminação artificial do solo foi feita como descrito no item 3.3.1. Neste segundo ensaio, contudo, a contaminação utilizada foi de 50 g HTP.kg^{-1} de solo, que corresponde a um valor de intervenção segundo a tabela de Valores de Referência da CETESB (CETESB, 2005). As estratégias de biorremediação foram as seguintes:

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

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

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 NH_4NO_3 e KH_2PO_4 ;

Bioaugmentação com fungos nativos (BN) – solo contaminado, com correção da umidade, do pH e introdução dos fungos S1 e S3, isolados

previamente do solo contaminado;

Bioaugmentação com fungos exógenos (BE) – solo contaminado, com correção da umidade, do pH e introdução dos fungos C e D, isolados previamente do tanques contendo a mistura diesel/biodiesel. Em ambas estratégias de bioaugmentação foi realizado o ajuste da proporção C:N:P para 100:10:1 pela adição de uma solução de NH_4NO_3 e KH_2PO_4 ;

Bioestimulação com bioaugmentação tardia (BT) – 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 NH_4NO_3 e KH_2PO_4 e adição do inóculo fúngico composto pelos isolados S1 e S3 após 14 dias de incubação.

3.5.3 Monitoramento da atividade microbiana

3.5.3.1 Estimativa de heterotróficos totais

A partir da coleta de 1 g de solo dos frascos respirométricos foi acompanhado o crescimento da população microbiana heterotrófica. Foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-9} e posteriormente 100 μL dessas foram inoculadas em 100 μL de caldo nutriente em placas de poliestireno de 96 poços estéreis. As placas foram incubadas por 48 h a 30°C . A avaliação do crescimento procedeu a partir da análise da turbidez do meio, e a estimativa do número mais provável (NMP), a partir de uma tabela-referência (APHA, 1995).

3.5.3.2 Estimativa de micro-organismos degradadores da mistura B10

O método é baseado na alteração da coloração do indicador

redox 2,3,5 –trifeniltetrazólio (TTC), conforme proposto por Braddock & Catterall (1999). Foram utilizados 100 µl de uma solução de meio mineral (Richard & Vogel, 1999) com o indicador, que foram distribuídos em placa de poliestireno de 96 poços. A cada um dos poços também foram adicionados 100 µL das amostras de solo, previamente diluídas em série (conforme descrito no item acima), e 20 µL da mistura B10. As placas foram incubadas, sob proteção da luz, durante 14 dias a 30°C a fim de detectar micro-organismos capazes de utilizar o B10 como fonte de carbono através da mudança de cor da solução de incolor a róseo, resultado da redução do indicador a trifenil-formazan (TPF). A determinação do NMP procedeu pela mesma metodologia descrita no item anterior.

3.5.4 Avaliação da degradação do contaminante

A avaliação da degradação da mistura B10 foi estimada a partir de análises respirométricas conforme descrito nos itens 3.3.4.1, e por cromatografia gasosa nos tempos inicial e final, conforme o EPA 8015. Para isso, foram coletadas amostras compostas de cada tratamento e enviadas para a cromatografia acondicionadas em frascos de vidro, mantidos sob refrigeração. O percentual de degradação dos HTP foi calculado pela diferença de concentração entre HTP presente no final do ensaio em relação à concentração inicial.

3.6 Análise Estatística

Os resultados dos parâmetros avaliados durante análise da fase

aquosa, como pH, atividade enzimática, tensão superficial, produção de biomassa, bem como os resultados obtidos com as análises de superfície de resposta e também durante os ensaios de respirometria foram interpretados a partir da análise de variância (ANOVA) e Tuckey com nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$). O programa utilizado foi o Statistica (StatSoft), versão 8.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio Preliminar de Biorremediação

4.1.2 Análise da degradação do contaminante

Os resultados da produção acumulada de C-CO₂ ao longo do ensaio de 30 dias pode ser visualizado na Figura 4.

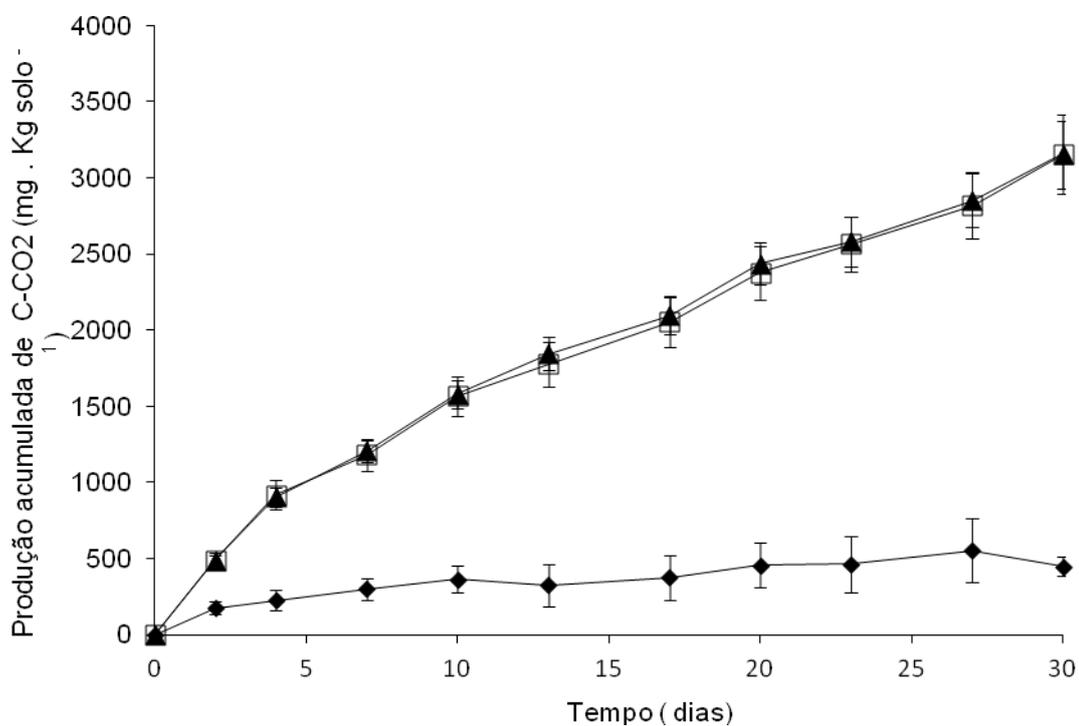


Figura 4. Produção acumulada de C-CO₂ do solo contaminado por B10 durante o ensaio de biorremediação por 30 dias. Controle: ◆; Atenuação natural: ◻; Bioaumentação com fungos filamentosos: ▲.

A capacidade microbiana de degradar o combustível foi observada pela produção acumulada de C-CO₂ durante 30 dias de incubação (Figura 4). Durante esse período, verificou-se que os microcosmos contaminados com B10 apresentaram atividade respiratória em níveis superiores ao do controle negativo ($p < 0,05$). Os valores de C-CO₂ da estratégia de bioaugmentação passaram a diferir de forma significativa do controle negativo a partir do 2º dia de incubação, sem se diferenciar da estratégia de atenuação natural em nenhum dos tempos, o que sugere a utilização da mistura B10 pela microbiota nativa e também pelos fungos introduzidos durante a bioaugmentação.

Os valores de liberação de C-CO₂ dos microcosmos que receberam o contaminante durante os cinco primeiros dias de ensaio, indicam que a mistura diesel/biodiesel não foi tóxica para a população microbiana, e que provavelmente o carbono presente na mistura B10 foi recebido como um aporte de carbono orgânico pelos micro-organismos, que tiveram sua atividade metabólica aumentada durante os primeiros momentos. Colla (2012), em seu estudo de biorremediação de solo contaminado com a mistura B10, observou o igualmente um aumento inicial na liberação de C-CO₂, sendo esses valores estabilizados em torno de sete dias de incubação. Possivelmente essa liberação diferenciada de CO₂ nos primeiros dias do ensaio corresponda à degradação das frações lábeis da mistura, que ocorre preferencialmente em relação às frações mais recalcitrantes.

Na Tabela 3 são apresentados os percentuais de degradação dos

HTP, calculados pela diferença de concentração de hidrocarbonetos detectados por cromatografia gasosa do tempo zero em relação ao tempo 30 dias de incubação.

Tabela 3. Percentual de degradação de HTP nas estratégias de biorremediação nos tempos inicial e após 30 dias.

Tratamento	Tempo inicial	Tempo final	Percentual de degradação (%)
Atenuação Natural	12,979	10,526	18
Bioaugmentação com fungos filamentosos	12,510	5,879	47

A comparação das estratégias a partir dos resultados da cromatografia gasosa ressalta que a bioaugmentação com fungos filamentosos isolados de tanques contendo a mistura diesel/biodiesel foi mais eficiente na degradação de HTP no solo (47 %) em comparação à atenuação natural (18 %), e que, portanto, a estratégia de bioaugmentação utilizando microbiota exógena neste caso foi efetiva. Bento et al. (2005a), observaram a estratégia de bioaugmentação com microbiota exógena apresentou 17 % de degradação da fração leve dos hidrocarbonetos (fração que compreende C₁₂-C₂₃) em 12 semanas enquanto que a bioaugmentação com nativos degradou 75 % da fração. A eficácia da estratégia de bioaugmentação com microbiota exógena, por conseguinte, varia com as características metabólicas dos organismos introduzidos, assim como com o potencial metabólico dos organismos autóctones.

A diferença apresentada entre o percentual de degradação do contaminante e a liberação de CO₂ evidencia que nem sempre há correlação positiva entre essas variáveis. O carbono presente no combustível pode ter sido degradado, mas não completamente mineralizado, constituindo biomassa

microbiana ou ainda sendo incorporado ao solo na forma de metabólitos intermediários, e dessa forma, não podendo ser quantificado pela técnica de respirometria (Mancera-Lopes et al., 2008). A partir desses resultados, é reforçado o pressuposto de que a ferramenta de quantificação de CO₂ liberado constitui apenas uma medida indireta de degradação do contaminante, e a cromatografia (líquida ou gasosa), uma técnica que tem sido utilizada na demonstração da biodegradação dos poluentes orgânicos no solo. As técnicas cromatográficas são utilizadas para a detecção de intermediários formados pela degradação primária do contaminante, enquanto que a quantificação do gás carbônico emitido do solo é proporcional à atividade microbiana sobre o substrato (Sendzikiene et al., 2007; Mariano et al., 2008b). Essas metodologias de estimativa de degradação são utilizadas em diversos trabalhos que avaliam a biodegradação de poluentes orgânicos como hidrocarbonetos derivados de petróleo e suas misturas com biocombustíveis no solo (Jacques et al., 2008. Mariano et al., 2008a; Silva et al., 2012a; Meneghetti et al., 2012) e em meio líquido (Cerqueira et al., 2011).

Os resultados observados da estratégia de atenuação natural, evidenciam o potencial degradador da microbiota autóctone, visto que a única interferência que o solo recebeu após a contaminação foi o revolvimento para permitir aeração, sem ter sido realizada correção de umidade periódica ou aporte de nutrientes para ajuste da relação C:N:P. Portanto, em 30 dias a redução de 18 % de HTP e a as taxas de liberação de CO₂ similares à estratégia de bioaugmentação evidenciaram a presença de micro-organismos com alto potencial para a degradação de hidrocarbonetos, posto que essa

microbiota não havia sido exposta ao contaminante previamente. Meyer (2011), ao utilizar a mistura B20, e Colla (2012) utilizando a mistura B10, observaram que as estratégias de atenuação natural também apresentaram liberação de CO₂ superior aos controles negativos, dando indícios da capacidade microbiana de metabolizar o combustível. Ao avaliar a degradação por cromatografia gasosa, no entanto, Colla (2012) verificou taxas bastante reduzidas de degradação de HTP, sendo essas inferiores às observadas neste estudo. Meyer (2011), por outro lado, ao avaliar a degradação da fração leve de HTP (C₉ – C₂₈), que compreende grande parte dos hidrocarbonetos alifáticos e, em menor quantidade, aromáticos, observou valores em torno de 90 % para a degradação dos combustíveis avaliados (diesel puro e mistura B20: 20 % de biodiesel e 80 % de diesel). Os diferentes resultados obtidos nesses estudos a partir da aplicação da estratégia de atenuação natural demonstram que a degradação dos mesmos contaminantes pode variar de acordo com as condições do solo e ainda com o potencial degradador dos micro-organismos autóctones do local impactado.

4.2 Isolamento de fungos filamentosos do solo contaminado

Os resultados da liberação de CO₂ e de degradação de HTP durante o ensaio preliminar de biorremediação destacaram a capacidade da microbiota autóctone do solo em degradar a mistura B10, observada nos resultados de respirometria e degradação de HTP da estratégia de atenuação natural. O isolamento procedeu com o objetivo de selecionar fungos potencialmente degradadores deste solo. Foram isolados oito fungos

filamentosos do solo artificialmente contaminado com a mistura B10.

4.3 Seleção dos micro-organismos quanto ao potencial degradador da mistura B10 e à capacidade de crescer utilizando a mistura como fonte de carbono.

A seleção dos isolados fúngicos foi conduzida com base no potencial desses organismos de biodegradar a mistura B10. Para tanto, foi utilizado um indicador redox (DCPIP) no meio mínimo e a mistura B10 como fonte de carbono, em três concentrações diferentes, 1 %, 5 % e 20 % (Figura 5). Os organismos também foram selecionados quanto à capacidade de crescer utilizando a mistura diesel/biodiesel como fonte de carbono. Assim, após 14 dias de incubação, foram realizadas medições da biomassa formada por cada fungo.

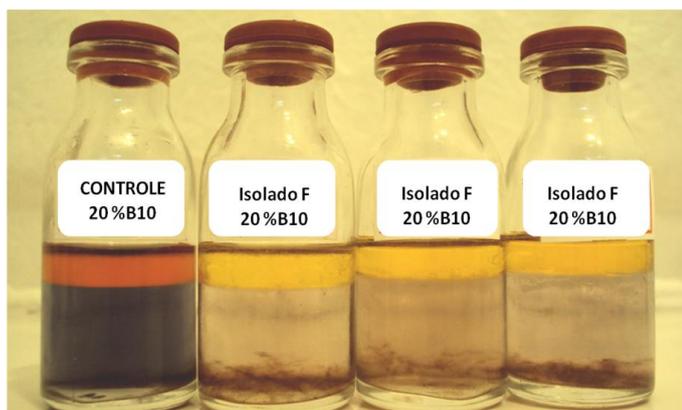


Figura 5. Aspecto do microcosmo montado com o indicador DCPIP (azul no controle) após 96 h de incubação contendo 20 % da mistura B10, com o isolado F.

Três dos oito fungos isolados do solo oxidaram o combustível nas três concentrações utilizadas em até 96 horas, tendo a mudança da coloração

do indicador iniciado em 24 horas de incubação. Com relação aos fungos previamente isolados de tanques de combustível, todos os treze testados apresentaram capacidade de oxidar a mistura B10 em até 96 horas em no mínimo uma das concentrações da mistura utilizadas (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados para teste preliminar de biodegradação em meio mineral mínimo, contendo o indicador redox DCPIP e a mistura B10 como fonte de carbono em três concentrações após 96h de incubação.

Isolados	1 %	5 %	20 %
A	+	-	-
C	+	+	+
D	+	+	+
F	+	+	+
G	+	+	+
H	+	-	+
I	+	+	+
K	+	-	+
L	+	+	-
M	+	+	+
N	+	+	+
O	+	+	-
P	+	-	-
S1	+	+	+
S3	+	+	+
S5	+	+	+

+: fungos que modificaram a coloração do meio em 96 h para a fonte de carbono testada.

-: fungos que não descoloriram o meio em 96 h para a fonte de carbono testada.

Mariano et al.(2008a) e Meyer (2011) ao avaliarem a degradação de misturas de diesel/biodiesel por micro-organismos utilizando a metodologia do indicador redox observaram que quanto maior a porcentagem de biodiesel na mistura, mais rapidamente ocorreu a alteração do indicador. Segundo alguns autores, o biodiesel, por representar uma fonte de carbono mais acessível aos micro-organismos, pode acelerar a degradação do diesel por meio do cometabolismo (Zhang et al., 1998; Pasqualino, 2006; Silva et al., 2012a). A rapidez na mudança da coloração do indicador depende principalmente da capacidade enzimática de cada isolado. O tempo de

exposição à mistura B10 durante o ensaio preliminar de biorremediação e à mistura diesel/biodiesel contida nos tanques pode ter levado os fungos expressarem enzimas envolvidas na degradação dos componentes presentes na mistura, diminuindo o tempo de adaptação.

A técnica de indicadores-redox tem sido utilizada como ferramenta de investigação da capacidade de metabolização de hidrocarbonetos por micro-organismos em diversos estudos (Peixoto & Vieira 2005; Vieira et al., 2007a; Carvalhaes 2009; Mariano et al., 2010; Meyer et al., 2012). Desde a publicação do trabalho de Mariano et al. (2008a), o teste também passou a ser utilizado para analisar a biodegradabilidade de misturas de diesel e biodiesel (Júnior et al., 2009; Mariano et al., 2010, Vaz, 2010) e também só de biodiesel (Meyer, 2011; Colla, 2012; Souza, 2012). No entanto, nos estudos anteriores citados, a concentração das misturas utilizada nos ensaios foi de 1 % para Mariano et al. (2008a), Meyer et al. (2012) e Souza (2012) enquanto Colla (2012) avaliou a degradação de 4 %. A degradação de 20 % da mistura B10 em até 96 h demonstra que a biodegradação dos hidrocarbonetos e dos ésteres presentes na mistura pode ocorrer mesmo em concentrações altas e ainda assim não ser tóxico para os micro-organismos avaliados, servindo como fonte de carbono para a promoção do crescimento desses organismos.

O teste de indicadores-redox, portanto, constitui-se como uma metodologia de seleção de microrganismos com capacidade degradativa simples e de baixo custo, podendo ser padronizado e utilizado para detecção da degradação de diversos compostos de interesse (Peixoto & Vieira, 2005).

Ao avaliar o crescimento através da produção de biomassa, todos

os fungos testados apresentaram capacidade em crescer utilizando o combustível como fonte de carbono, conforme observado na Figura 6.

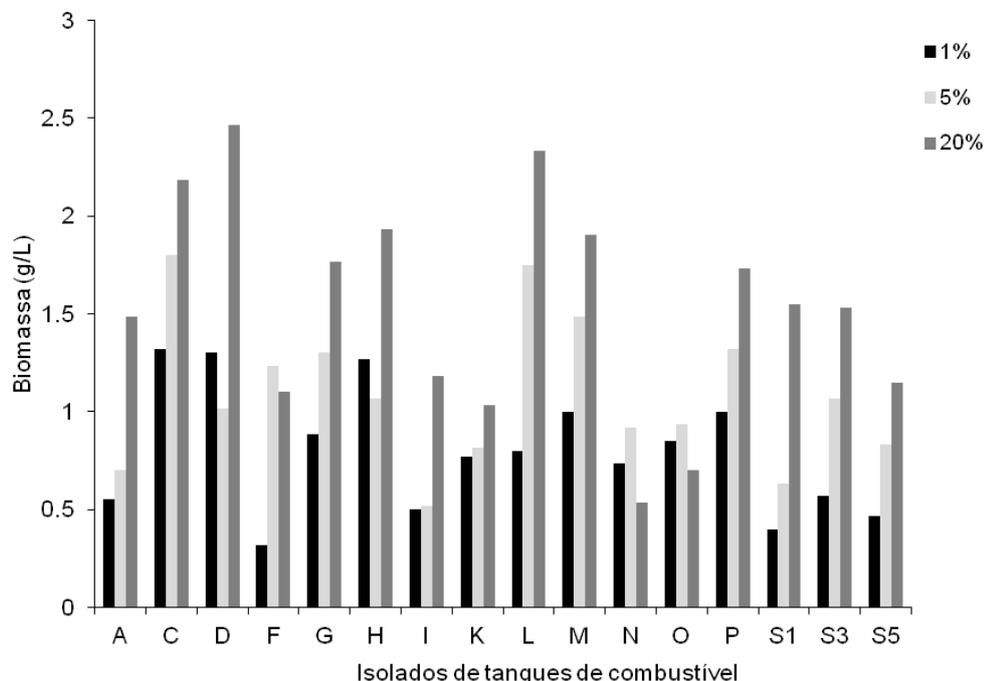


Figura 6. Valores de biomassa de cada fungo filamentoso após 14 dias de incubação em meio mineral mínimo nas diferentes concentrações da mistura B10, 1, 5 e 20 %. As letras representam isolados diferentes.

Dos 21 isolados avaliados, 13 apresentaram maior biomassa nos ensaios que continham 20 % da mistura B10, ressaltando a capacidade desses fungos em crescer na presença de 20 % de combustível. Comparando o crescimento dos fungos isolados de tanques com os isolados do solo, foi observado que os que apresentaram maior formação de biomassa foram os fungos isolados de tanque de combustível. O ambiente dos tanques constitui um ambiente de pressão seletiva para os organismos que ali se encontram, pois existem condições especiais de tensão de O_2 , disponibilidade de nutrientes e de água. Desta forma, estas condições podem ter favorecido o

melhor desempenho destes fungos em relação aos fungos do solo.

Os fungos selecionados para as etapas posteriores (isolado C, isolado D, isolado S1 e isolado S3) foram os que apresentaram melhor desempenho ao oxidar o combustível em menor tempo e que também apresentaram maior formação de biomassa ao longo dos 14 dias de incubação, evidenciando além do potencial degradador da mistura B10, a capacidade de crescer às expensas do carbono presente na mistura B10.

4.4 Identificação dos isolados selecionados

Os isolados C, D e S3 foram identificados a nível de gênero a partir de caracteres morfológicos. Os três fungos são do gênero *Aspergillus*. O isolado S1 foi identificado a partir do sequenciamento da região ITS como *Fusarium oxysporum*, com 100 % de identidade (Tabela 5).

Tabela 5. Identificação dos isolados selecionados.

Isolados	Identificação
C	<i>Aspergillus</i> sp 1.
D	<i>Aspergillus</i> sp 2.
S1	<i>Fusarium oxysporum</i>
S3	<i>Aspergillus</i> sp 3.

4.5 Determinação das condições ótimas para o crescimento pela metodologia de superfície de resposta

A variação simultânea da temperatura e do pH permitiu verificar a importância dessas variáveis para o crescimento dos isolados estudados, bem como a existência de interação entre os fatores. Os coeficientes que influenciaram o crescimento dos isolados de forma significativa foram utilizados

na construção de um modelo de regressão, a partir do qual os resultados experimentais foram analisados. O modelo de regressão obtido para cada fungo encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6. Modelo de regressão com os coeficientes significativos obtido para cada um dos isolados (*Aspergillus* sp.1, *Aspergillus* sp.2, *F. oxysporum*, *Aspergillus* sp.3, *P. boydii*, *P.variotti*).

Fungo	Modelo de regressão
<i>Aspergillus</i> sp.1	$Y = b_2 \cdot T + b_{12} \cdot T \cdot \text{pH}$
<i>Aspergillus</i> sp.2	$Y = b_0 + b_2 \cdot T + b_{22} \cdot T^2$
<i>F. oxysporum</i>	$Y = b_0 + b_2 \cdot T + b_{22} \cdot T^2$
<i>Aspergillus</i> sp.3	$Y = b_2 \cdot T$
<i>P. boydii</i>	$Y = b_0 + b_1 \cdot \text{pH} + b_2 \cdot T + b_{12} \cdot T \cdot \text{pH}$
<i>P.variotti</i>	$Y = b_2 \cdot T$

A partir dos fatores que influenciaram o crescimento de cada fungo de forma significativa, uma nova análise foi realizada, desprezando-se os coeficientes não significativos. A significância dos modelos reduzidos foram avaliadas através do teste F. Os valores de F e a porcentagem de variação explicada pelos modelos foram adequados (valores de R^2) (Tabelas 7 e 8). Os modelos foram considerados preditivos e utilizados para gerar uma superfície de resposta evidenciando as melhores condições de crescimento para cada um dos fungos (Figura 7).

Tabela 7. Coeficientes de regressão dos modelos reduzidos, valores-*p*, valores de F e de R² dos isolados *Aspergillus* sp.3, *Aspergillus* sp.3 e *F. oxysporum*.

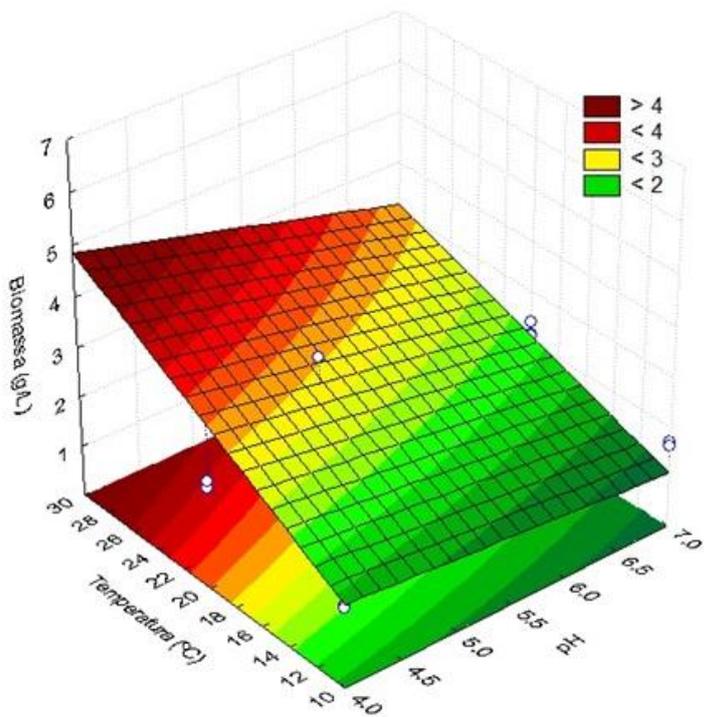
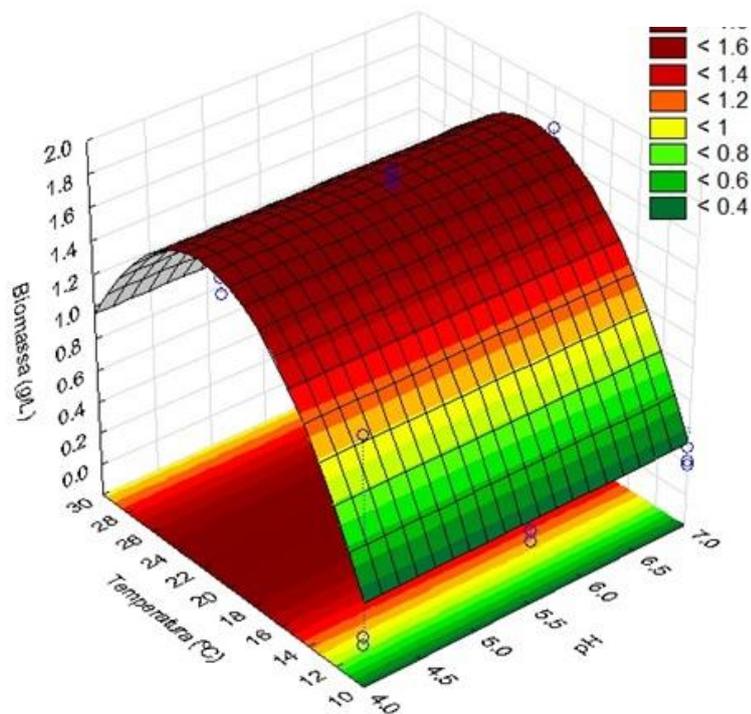
	Isolados					
	<i>Aspergillus</i> sp.1		<i>Aspergillus</i> sp.2		<i>F. oxysporum</i>	
	Coeficiente	<i>p</i>	Coeficiente	<i>p</i>	Coeficiente	<i>p</i>
β_0	-	-	-3,146	<0,0001	-4,90	<0,0001
β_1	-	-	-	-	-	-
β_{11}	-	-	-	-	-	-
β_2	0,230	<0,0001	0,452	<0,0001	0,655	<0,0001
β_{22}	-	-	-0,010	<0,0001	-0,014	<0,0001
β_{12}	-0,017	0,01	-	-	-	-
Regressão						
valor- <i>p</i>	<0,0001		<0,0001		<0,0001	
F	15,61		39,46		56,38	
R ²	0,609		0,766		0,824	
FA*	0,119		0,159		0,867	

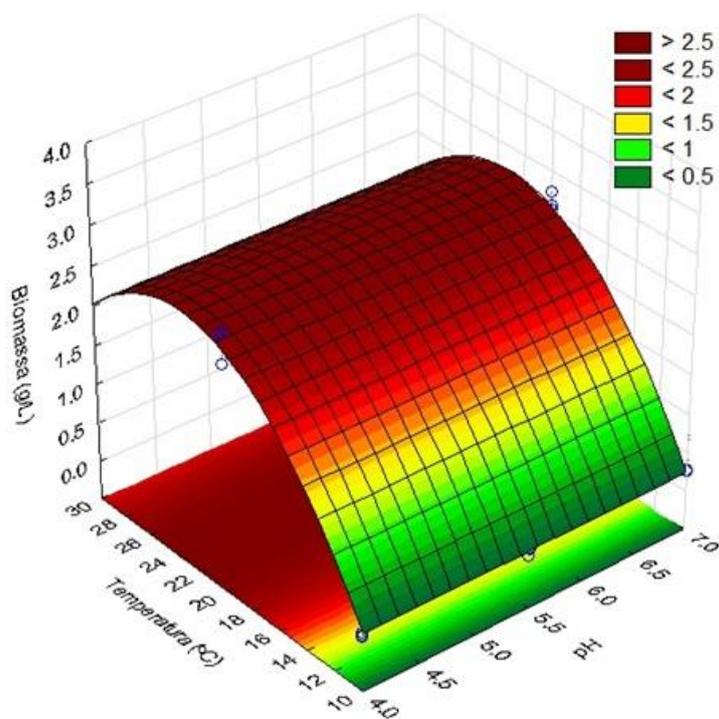
* Falta de ajuste do valor-*p*

Tabela 8. Coeficientes de regressão dos modelos reduzidos, valores-*p*, valores de F e de R² dos isolados *Aspergillus* sp.3, *P.boydii* e *P.variotii*.

	Isolados					
	<i>Aspergillus</i> sp.3		<i>P.boydii</i>		<i>P.variotii</i>	
	Coeficiente	<i>p</i>	Coeficiente	<i>p</i>	Coeficiente	<i>p</i>
β_0	-0,407	0,340	-	-	-	-
β_1	-	-	1,17	0,021	-	-
β_{11}	-	-	-	-	-	-
β_2	0,142	<0,0001	-	-	0,187	<0,0001
β_{22}	-	-	0,019	<0,0001	-	-
β_{12}	-	-	-	-0,09	0,002	-
Regressão						
valor- <i>p</i>	<0,0001		<0,0001		<0,0001	
F	51,06		30,34		61,32	
R ²	0,689		0,845		0,710	
FA*	0,459		0,018		0,401	

* Falta de ajuste do valor-*p*

Superfície de Resposta Isolado *Aspergillus sp.1*Superfície de Resposta Isolado *Aspergillus sp.2**Aspergillus sp.3*

Superfície de Resposta Isolado *F. oxysporum*

Superfície de Resposta Isolado S3

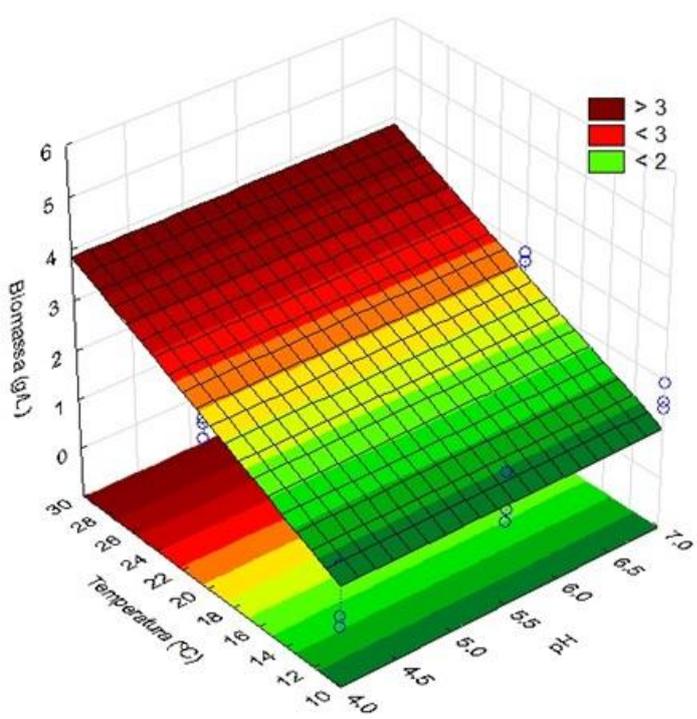
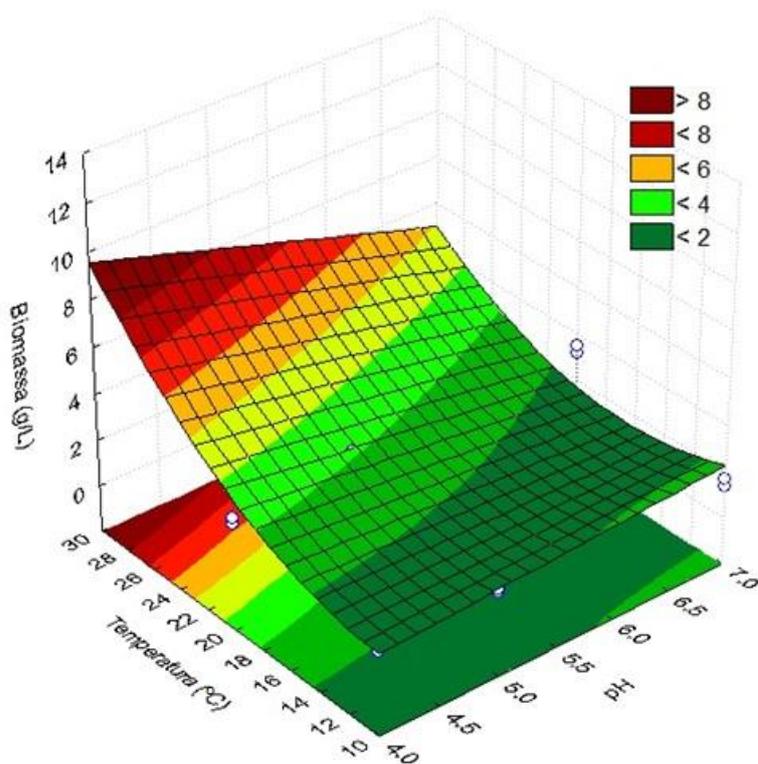
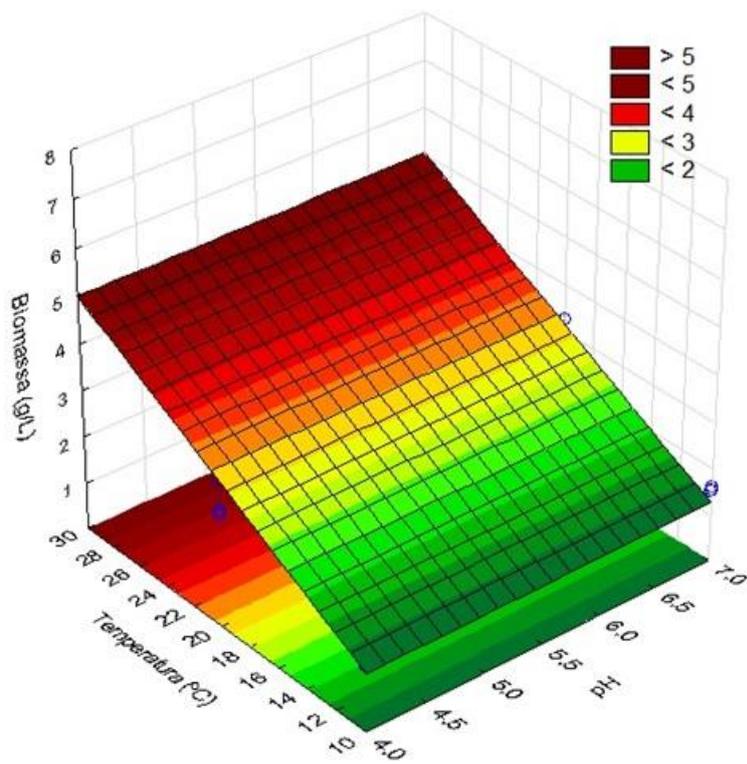
Superfície de Resposta Isolado *P. boydii*Superfície de Resposta Isolado *P. variotii*

Figura 7. Superfícies de resposta de crescimento (biomassa) para cada fungo, em função da temperatura e pH.

Os resultados obtidos para cada fungo a partir da metodologia de superfície de resposta permitem estabelecer as condições de temperatura e de pH conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Valores temperatura e pH ótimos para o crescimento de cada um dos fungos obtidos a partir da Superfície de Resposta.

Isolado	Temperatura (°C)	pH
<i>Aspergillus</i> sp.1	30	4
<i>Aspergillus</i> sp.2	20	5,5*
<i>F. oxysporum</i>	20	5,5
<i>Aspergillus</i> sp.3	30	5,5*
<i>P.boydii</i>	30	4,0
<i>P.variotti</i>	30	4,0*

*Qualquer um dos pH testados (4,0; 5,5 e 7,0) poderia ter sido utilizado, no entanto, optou-se pelos valores trazidos na tabela.

Com os resultados obtidos, é possível constatar que o crescimento dos fungos foi influenciado principalmente pela temperatura, sendo o pH uma variável que atua somente em alguns dos isolados aqui analisados. Os isolados fúngicos influenciados apenas pela temperatura foram os isolados *F.oxysporum*, *Aspergillus* sp.2, *Aspergillus* sp.3 e *P.variotti*, tendo essa variável uma relação direta com a produção de biomassa. O crescimento dos isolados *Aspergillus* sp.1 e *P.boydii*, além da temperatura, também sofreram influência da interação entre a variação da temperatura e do pH.

Diversos fatores influenciam o desenvolvimento dos micro-organismos e a biodegradação de hidrocarbonetos. Alterações de temperatura podem afetar as propriedades físicas e químicas do contaminante. Apesar da biodegradação de hidrocarbonetos ocorrer em uma ampla faixa de temperatura

(0-70°C) (Sorkhoh et al., 1993), as taxas de degradação geralmente diminuem com a redução da temperatura (Dzida & Pruzakiewicz, 2008). Quando em baixas temperaturas, a densidade e a viscosidade do óleo aumentam e a solubilidade diminui (Atlas, 1981; Das & Chandran, 2010). A redução na temperatura também pode acarretar na cristalização dos ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel, e o mesmo ocorre com os hidrocarbonetos saturados presentes no diesel (Pontes et al., 2010). Além disso, alterações na temperatura alteram fisiologicamente a microbiota, (Atlas, 1981; Seabra, 2008; Das & Chandran, 2010) sendo a atividade enzimática e o metabolismo microbiano diretamente proporcionais ao aumento da temperatura (Atlas, 1988; Leavy & Colwell, 1990). Ao submeter os fungos a temperaturas reduzidas durante o ensaio, podem ter ocorrido, além de alterações metabólicas nos micro-organismos, modificações na natureza física e na composição química do combustível, reduzindo sua disponibilidade à degradação e aumentando sua toxicidade aos micro-organismos (Atlas, 1981).

O pH influencia no crescimento de modo que altera a atividade enzimática microbiana. Os fungos filamentosos são tolerantes a pH ácido, desenvolvendo-se satisfatoriamente na faixa de pH 4-5 (Singh, 2006). No entanto, as variações nos valores de pH avaliados neste estudo para os fungos não indicaram diferença significativa no crescimento. Apenas *P. boydii* e o isolado *Aspergillus* sp.1 foram influenciados pelo pH, apresentando maior crescimento em pH 4. O pH afeta diretamente a atividade dos micro-organismos por meio dos efeitos dos íons 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). A partir do observado neste ensaio, os valores de pH testados não diferiram significativamente de modo a influenciar o crescimento dos fungos, evidenciando sua capacidade que esses organismos apresentam de crescer em uma ampla faixa de pH.

A necessidade de se conhecer os fatores que influenciam no crescimento dos organismos utilizados em estudos de biorremediação está relacionada à otimização do processo de biodegradação. A literatura destaca a importância da ocorrência de condições adequadas do meio físico para a ação microbiana (Horel & Schiewer, 2009; Chang et al., 2011). Portanto, se tratando de estudos de degradação para organismos individualmente, o conhecimento das condições ótimas de crescimento podem promover uma maior degradação de um dado contaminante.

4.6 Ensaio de crescimento em meio líquido - Análises da Fase

Aquosa

A fase aquosa de todos os tempos amostrados foi avaliada e foram realizadas medidas de tensão superficial, de pH, sendo essa uma medida indireta de crescimento e degradação à medida que ambos liberam no meio metabólitos que podem promover a acidez do mesmo. As enzimas C1,2O, C2,3O, P3,4O e lipase, envolvidas na degradação de hidrocarbonetos e de ésteres de ácidos graxos constituintes da mistura B10 foram monitoradas. Os resultados obtidos durante este ensaio correspondem à otimização das condições de crescimento dos fungos apontadas pela metodologia de

superfície de resposta.

4.6.1 Produção de biossurfactantes

A tensão superficial foi monitorada com o objetivo de verificar a presença de compostos com ação surfactante. Os fungos filamentosos são conhecidos como produtores de biossurfactantes (Arun et al., 2008; Bento et al., 2008; Castiglioni et al., 2009; Kiran et al., 2009). Conforme os resultados apresentados na Tabela 10, foram observadas alterações nas medidas de tensão superficial nas fases aquosas dos ensaios. Os resultados demonstraram um aumento nos valores de tensão superficial, variando de 41,16 mN.m⁻¹ a 50,23 mN.m⁻¹ (aumento de 10,6 %) para o fungo *P.boydii* e 33,78 mN.m⁻¹ a 46,9 mN.m⁻¹ (aumento de 38,8 %) para o isolado *Aspergillus* sp.2. O controle negativo também revelou aumento na tensão, variando de 37,62 mN.m⁻¹ a 41,63 mN/m (aumento 15,7 %) ao final de 21 dias (Tabela 9).

Tabela 10. Medidas de tensão superficial (TS) da fase aquosa proveniente da curva de crescimento com os isolados estudados (C, D, S1, S3, *P.boydii* e *P.variotti*) e do controle negativo (CN) nos tempos inicial (T0) e final (T21).

Isolados	Tensão superficial (mN.m ⁻¹)	
	T0	T21
<i>Aspergillus</i> sp.1	40,46 ± 2,96	47,2 ± 2,42
<i>Aspergillus</i> sp.2	33,78 ± 2,96	46,9 ± 2,96
<i>F. oxysporum</i>	33,86 ± 1,84	44,96 ± 1,45
<i>Aspergillus</i> sp.3	36,96 ± 1,75	45,65 ± 1,46
<i>P.boydii</i>	41,16 ± 3,16	50,23 ± 0,96
<i>P.variotti</i>	44,13 ± 2,59	51,06 ± 1,33
CN	37,62 ± 3,12	41,63 ± 1,09

Bücker (2010) ao avaliar alterações nas medidas de tensão superficial durante a curva de crescimento do fungo *Paecilomyces* sp. observou

que em 21 dias de inubação em meio mineral Richard & Voguel (1999) e 50 % da mistura B10 também ocorreu um pequeno aumento nos valores da tensão superficial, que passou de $41,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para $48,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, e ao final de 60 dias, o valor observado foi $46,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (aumentos de 17,3 e 11,34 %, respectivamente). Schultz (2010) observou apenas pequenas alterações nos valores de tensão superficial ao avaliar a degradação da mistura B20 (20 % de biodiesel e 80 % de diesel) na presença de fungos filamentosos em 30 dias de ensaio, e atribuiu essa variação à presença da mistura B20 no meio.

Estudos anteriores que avaliaram medidas de tensão superficial em meio mínimo com misturas de diesel/biodiesel relataram que a presença do biodiesel na mistura pode diminuir a tensão superficial devido as suas propriedades físico-químicas (Bücker, 2010; Meyer, 2011; Moreira, 2012). O biocombustível atua como um agente oleofílico com potencial de solubilizar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, presentes na fração diesel, além de ter a capacidade de atuar como um agente de estímulo para biodegradação (Wu et al., 2010). No entanto, não foi possível observar a redução na tensão superficial durante as análises da fase aquosa deste estudo.

4.6.2 pH

Foi observada a acidificação da fase aquosa em todos os tratamentos analisados (Tabela 11). Com exceção do isolado *Aspergillus* sp.1, os demais fungos apresentaram redução no pH a partir de sétimo dia de incubação. Apenas no 21º dia de análise esse isolado apresentou pH menor do que seu controle: 4,14 e 4,51 respectivamente. Esses valores, no entanto,

não se diferenciam de forma significativa ($p>0,05$). Mesmo com pequenas diferenças na variação do pH, não é possível afirmar a ausência de ácidos como resultado da degradação do contaminante ou mesmo do crescimento desse fungo, pois o pH inicial do ensaio desse fungo foi 5,5.

A fase aquosa dos fungos *Aspergillus* sp.2 e *F. oxysporum* apresentaram pH mais ácido do que seus controles durante todos os tempos avaliados, diferenciando-se dos mesmos de forma significativa a partir dos 14 dias de incubação, mantendo-se assim até o último dia de análise.

Tabela 11. Avaliação de pH da fase aquosa dos isolados *Aspergillus* sp.1, *Aspergillus* sp.2, *F. oxysporum*, *Aspergillus* sp.3, *P. boydii* e *P. variotti* e do controle negativo em meio mineral mínimo e a mistura B10 nos tempos 0 (condição inicial), 7, 14 e 21 dias durante curva de crescimento.

Tratamento (dias)	pH amostra	pH controle negativo
<i>Aspergillus</i> sp.1 (0)	4,36 ± 0,03	4,24
<i>Aspergillus</i> sp.1 (7)	4,46 ± 0,04	4,45
<i>Aspergillus</i> sp.1 (14)	4,22 ± 0,09	4,28
<i>Aspergillus</i> sp.1 (21)	4,14 ± 0,23	4,51
<i>Aspergillus</i> sp.2 (0)	5,56 ± 0,01	5,75
<i>Aspergillus</i> sp.2 (7)	5,40 ± 0,05	5,63
<i>Aspergillus</i> sp.2 (14)	4,80 ± 0,07	5,64
<i>Aspergillus</i> sp. 2 (21)	4,75 ± 0,09	5,70
<i>F. oxysporum</i> (0)	5,56 ± 0,03	5,75
<i>F. oxysporum</i> (7)	5,10 ± 0,55	5,63
<i>F. oxysporum</i> (14)	5,16 ± 0,20	5,64
<i>F. oxysporum</i> (21)	5,06 ± 0,05	5,70
<i>Aspergillus</i> sp.3 (0)	5,62 ± 0,06	5,53
<i>Aspergillus</i> sp.3 (7)	5,01 ± 0,43	5,64
<i>Aspergillus</i> sp.3 (14)	4,30 ± 0,66	5,43
<i>Aspergillus</i> sp.3(21)	3,57 ± 0,24	5,60
<i>P. boydii</i> (0)	4,36 ± 0,22	4,60
<i>P. boydii</i> (7)	3,85 ± 0,08	4,17
<i>P. boydii</i> (14)	3,44 ± 0,11	4,34
<i>P. boydii</i> (21)	3,3 ± 0,08	4,43
<i>P. variotti</i> (0)	4,23 ± 0,08	4,60
<i>P. variotti</i> (7)	3,60 ± 0,12	4,17
<i>P. variotti</i> (14)	3,41 ± 0,07	4,34
<i>P. variotti</i> (21)	3,07 ± 0,02	4,43

Os valores de pH para os isolados *Aspergillus* sp. 2 e *F. oxysporum* no tempo 21 dias foram de 4,75 e 5,06, respectivamente. Considerando que ambos partiram de um valor de pH de 5,5, esta variação pode sugerir a produção de metabólitos com características ácidas, principalmente para o isolado *Aspergillus* sp. 2.

O isolado *Aspergillus* sp.3 apresentou uma redução visível durante todos os tempos, no entanto, apresentou diferença em relação à fase aquosa do controle negativo apenas no tempo 21 dias. Em relação ao tempo inicial, o fungo reduziu o pH de $5,62 \pm 0,06$ para $3,57 \pm 0,24$.

P.boydii e *P. variotii* foram os fungos com maior alterações no pH, diferenciando-se de seus controles a partir da primeira semana de incubação. As condições iniciais de ensaio do isolado *P.boydii* foram pH $4,36 \pm 0,22$, chegando a $3,3 \pm 0,08$ após os 21 dias de ensaio. Para o fungo *P. variotii*, os valores variaram de $4,23 \pm 0,08$ até $3,07 \pm 0,02$.

A acidificação do meio é consequência da degradação da mistura diesel/biodiesel e do crescimento dos micro-organismos às expensas do combustível. Esses processos levam à produção de ácidos orgânicos que podem ser incorporados às vias do ciclo do ácido cítrico durante o crescimento microbiano. Quando liberados no meio, esses ácidos provocam a acidificação do mesmo (Bento et al., 2005b; Bacosa et al., 2010). Bento et al. (2005b) analisaram os metabólitos encontrados na fase aquosa do meio mineral contendo diesel após 60 dias de incubação com *Aspergillus fumigatus* a partir da metodologia de microextração em fase sólida (SPME). Os autores encontraram a presença de ácidos orgânicos como o ácido propiônico e 2-etil-

hexanoico, além de acetonas e alcoóis. Bückner et al. (2011) afirma que a redução do pH da fase aquosa também pode ser causada tanto pela lise celular quanto pela produção de ácidos orgânicos gerados durante a degradação abiótica do diesel e/ou biodiesel.

Durante este ensaio de crescimento de 21 dias de incubação, não foi verificada a acidificação significativa da fase aquosa para todos os fungos estudados. A opção por otimizar as condições de crescimento dos organismos estudados acarretou na redução do pH da fase aquosa de forma artificial no início do ensaio. Assim, a detecção de metabólitos ácidos liberados como produto do metabolismo dos fungos por medidas de pH foi prejudicada pela acidificação do meio na fase inicial da curva de crescimento.

4.6.3 Avaliação enzimática

A fim de verificar a presença das enzimas envolvidas na degradação de aromáticos da porção diesel, ensaios enzimáticos foram realizados nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias durante a curva de crescimento (Tabela 12). A fração correspondente ao diesel presente na mistura B10 é constituída por 40 % de hidrocarbonetos alifáticos, 39 % de isoalcanos e cicloalcanos e 22 % de hidrocarbonetos mono ou diaromáticos (Mazzuco, 2004), sendo que todas as frações constituem substratos para o crescimento dos fungos. As vias de biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos podem formar como intermediário central o protocatecol, o gentisato ou na maioria dos casos o catecol, o qual é tipicamente clivado por dioxigenases por via orto (via também conhecida como β -cetoadipato), realizada pela enzima catecol 2,3 dioxigenase

formando 2-hidroxi-mucônico semialdeído, ou por via meta, realizada pela enzima catecol 1,2 dioxigenase, formando cis-cis-muconato (Loh & Chua, 2002; Jacques et al., 2007; Dhote et al., 2010).

Tabela 12 – Valores de atividade de C1,2O, C2,3O, P3,4O dos isolados estudados na presença de 20 % de B10 nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias durante curva de crescimento.

Tratamento (dias)	C1,2O (U.mg ⁻¹)	C2,3O (U.mg ⁻¹)	P3,4O (U.mg ⁻¹)
<i>Aspergillus</i> sp.1 (0)	0,0386 ± 0,0426	0,0060 ± 0,00114	0,00539 ± 0,0020
<i>Aspergillus</i> sp.1 (7)	0,0275 ± 0,008	0,1168 ± 0,093	0,04621 ± 0,0038
<i>Aspergillus</i> sp.1 (14)	0,2138 ± 0,0760	0,0345 ± 0,0259	0,0715 ± 0,00554
<i>Aspergillus</i> sp.1 (21)	1,402 ± 0,256	nd	Nd
<i>Aspergillus</i> sp.2 (0)	0,9554 ± 0,4503	0,400 ± 0,0394	Nd
<i>Aspergillus</i> sp.2 (7)	0,0081 ± 0,003	0,00908 ± 0,0030	0,0199 ± 0,0093
<i>Aspergillus</i> sp.2 (14)	0,00195 ± 0,0010	0,00671 ± 0,00175	0,00652 ± 0,0026
<i>Aspergillus</i> sp.2 (21)	0,019 ± 0,00496	0,0174 ± 0,00392	0,025 ± 0,0081
<i>F. oxysporum</i> (0)	0,9871 ± 0,958	0,418 ± 0,3495	Nd
<i>F. oxysporum</i> (7)	0,0940 ± 0,0380	0,0636 ± 0,0202	0,06612 ± 0,0217
<i>F. oxysporum</i> (14)	0,2240 ± 0,0781	0,2273 ± 0,00331	0,3710 ± 0,1262
<i>F. oxysporum</i> (21)	0,0632 ± 0,0243	0,0536 ± 0,00668	0,0702 ± 0,00242
<i>Aspergillus</i> sp.3 (0)	0,060 ± 0,01	0,0235 ± 0,00468	0,0147 ± 0,0050
<i>Aspergillus</i> sp.3 (7)	0,0278 ± 0,0036	0,2249 ± 0,0358	0,4460 ± 0,1676
<i>Aspergillus</i> sp.3 (14)	0,1929 ± 0,0326	0,04342 ± 0,0238	0,1202 ± 0,0059
<i>Aspergillus</i> sp.3 (21)	0,3518 ± 0,2207	Nd	Nd
<i>P. boydii</i> (0)	0,0358 ± 0,013	0,00752 ± 0,00438	Nd
<i>P. boydii</i> (7)	0,0040 ± 0,003	0,00237 ± 0,0020	Nd
<i>P. boydii</i> (14)	0,006 ± 0,005	Nd	Nd
<i>P. boydii</i> (21)	0,0691 ± 0,0341	0,04137 ± 0,03040	Nd
<i>P. variotti</i> (0)	0,08 ± 0,05	0,03637 ± 0,02874	0,0621 ± 0,0255
<i>P. variotti</i> (7)	0,0043 ± 0,0028	0,0029 ± 0,00178	Nd
<i>P. variotti</i> (14)	0,0952 ± 0,0206	0,03055 ± 0,02196	0,2146 ± 0,0291
<i>P. variotti</i> (21)	0,1809 ± 0,1140	0,1465 ± 0,1073	Nd

Nd=não detectado

Dentre as enzimas responsáveis pela degradação dessa fração de hidrocarbonetos, a C1,2O foi a que apresentou maior frequência nos diferentes isolados ao longo dos tempos estudados (Tabela 12). A maior atividade da enzima foi verificada em amostras dos tempos iniciais dos isolados *Aspergillus* sp.2 (0,9554 U.mg⁻¹), *F. oxysporum* (0,9871 U.mg⁻¹) e final do isolado *Aspergillus* sp.3 (0,3518 U.mg⁻¹) ($p > 0,05$).

A enzima C2,3O, outra enzima ligada à rota de degradação de aromáticos, foi detectada na maioria dos ensaios, com exceção do isolado *P.boydii* no tempo 14, e dos isolados *Aspergillus* sp.1 e *Aspergillus* sp. 3 no tempo final. As maiores atividades foram do isolado *F. oxysporum*, atingindo valores de 0,2273 U.mg⁻¹ a 0,418 U.mg⁻¹. A P3,2O foi a dioxigenase menos ativa no experimento, não sendo detectada em diversos momentos. A presença dessas enzimas e a atividade de pelo menos uma delas em todos os tempos sugerem a utilização de hidrocarbonetos aromáticos como substrato.

A maior parte dos estudos encontrados na literatura referem-se a degradação dos compostos aromáticos por bactérias (Wang et al., 2006; Silva, 2008; Silva et al., 2012b; Meyer et al., 2012). No entanto, os fungos filamentosos podem exercer um papel importante na reciclagem de compostos aromáticos na natureza. Santos & Linardi (2004) realizaram um estudo de degradação de fenol por fungos filamentosos utilizando a mesma metodologia citada neste trabalho para a detecção da formação de cis-cis-muconato e 2-hidroximucônico semialdeído. Nesse estudo, os autores concluíram que os fungos estudados, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Graphium* e *Penicillium* são produtores das enzimas, com potencial para serem utilizados na descontaminação de ambientes contendo fenol.

Cai et al. (2007) avaliaram a atividade das mesmas enzimas do fungo *Fusarium* sp. sob diferentes pHs e temperaturas, a fim de determinar as condições ótimas para a degradação de fenol. Os autores observaram que as melhores condições de pH para a atividade de C1,2O e C2,3O foram 6,8 e 9,4 respectivamente. Para a temperatura, os resultados foram 40°C para C1,2O e

60°C para C2,3O. Durante o ensaio de degradação da mistura B10 que procedeu neste estudo, foi priorizado a otimização das condições de crescimento dos fungos filamentosos em diferentes faixas de pH e de temperatura. Cai et al. (2007) procuraram otimizar a atividade de enzimas específicas da rota de degradação de um composto aromático específico. A ausência de condições ideais para a atividade dessas enzimas específicas neste estudo de degradação pode explicar a diferença da atividade enzimática encontrada.

Mesmo na ausência de condições ideais para sua atividade, a enzima C1,2O apresentou entre 0,35 U.mg⁻¹ e 1,4 U.mg⁻¹ para o fungo *Aspergillus* sp.3 e *Aspergillus* sp.1, respectivamente, ambos no tempo 21 dias. Santos & Linardi (2004) observaram que as linhagens dos fungos avaliadas durante o estudo para degradação de fenol tiveram atividades de C1,2O variando de 0,124 U.mg⁻¹ a 1,22 U.mg⁻¹, e todas foram eficientes na degradação do composto aromático. Assim, os fungos *Aspergillus* sp.3 e *Aspergillus* sp.1 também podem ser considerados bons produtores de C1,2O e com potencial para serem utilizados em estudos de degradação de hidrocarbonetos aromáticos.

4.6.4 Atividade lipase

A atividade da enzima lipase foi avaliada durante a degradação da fração correspondente ao biodiesel da mistura B10. A enzima está envolvida na degradação dos ésteres de ácidos graxos presentes no biocombustível. A enzima foi avaliada para os fungos nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias de incubação,

e os resultados podem ser visualizados na Tabela 13.

Tabela 13 – Valores de atividade da lipase dos isolados estudados na presença de 20 % de B10 nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias durante curva de crescimento.

Tratamento (dias)	Atividade lipase (U _{mL} ⁻¹ .min)	Controle
<i>Aspergillus</i> sp.1 (0)	0,7091 ± 0,008	0,2290 ± 0
<i>Aspergillus</i> sp.1 (7)	0,7381 ± 0,03	0,2275 ± 0,006
<i>Aspergillus</i> sp.1 (14)	0,4312 ± 0,05	0,1406 ± 0,02
<i>Aspergillus</i> sp.1 (21)	0,5714 ± 0,04	0,2295 ± 0,04
<i>Aspergillus</i> sp.2 (0)	0,2623 ± 0,003	0,1096 ± 0,004
<i>Aspergillus</i> sp.2 (7)	0,3055 ± 0,006	0,2656 ± 0,008
<i>Aspergillus</i> sp.2 (14)	0,6163 ± 0,02	0,1816 ± 0,004
<i>Aspergillus</i> sp.2 (21)	0,8076 ± 0,04	0,2770 ± 0,018
<i>F. oxysporum</i> (0)	0,2795 ± 0,008	0,1096 ± 0,004
<i>F. oxysporum</i> (7)	1,0345 ± 0,14	0,2656 ± 0,008
<i>F. oxysporum</i> (14)	0,9383 ± 0,05	0,1816 ± 0,004
<i>F. oxysporum</i> (21)	1,320 ± 0,17	0,2770 ± 0,018
<i>Aspergillus</i> sp.3 (0)	0,688 ± 0,06	0,2230 ± 0
<i>Aspergillus</i> sp.3 (7)	0,7062 ± 0,43	0,2595 ± 0,01
<i>Aspergillus</i> sp.3 (14)	0,3531 ± 0,66	0,1760 ± 0
<i>Aspergillus</i> sp.3 (21)	0,6888 ± 0,24	0,8063 ± 0,005
<i>P. boydii</i> (0)	0,7386 ± 0,03	0
<i>P. boydii</i> (7)	0,087 ± 0,02	0
<i>P. boydii</i> (14)	1,605 ± 0,06	0,4313 ± 0,009
<i>P. boydii</i> (21)	1,478 ± 0,01	0,4316 ± 0,05
<i>P. variotti</i> (0)	0,5386 ± 0,03	0
<i>P. variotti</i> (7)	0	0
<i>P. variotti</i> (14)	1,221 ± 0,06	0,4313 ± 0,009
<i>P. variotti</i> (21)	0,9821 ± 0,09	0,4316 ± 0,05

A partir da comparação dos resultados com seus respectivos controles, foi possível observar que ocorreu a produção da enzima pelos isolados na maioria dos tempos ($p < 0,05$). A produção da lipase pelos isolados *Aspergillus* sp.2 e *F. oxysporum* diferenciou-se de seus controles em todos os tempos analisados, com atividade máxima da enzima no tempo 21 dias para os isolados *Aspergillus* sp.2 (0,8 U_{mL}⁻¹.min) e *F. oxysporum* (1,32 U_{mL}⁻¹.min).

Os valores da lipase para o isolado *Aspergillus* sp.1 demonstraram um declínio após as primeiras duas semanas de incubação, mantendo os valores baixos até o final do ensaio (Tabela 13). Os fungos

P.boydii e *P.variotii*, após um declínio acentuado na atividade em sete dias de incubação, foram os fungos que apresentaram maior atividade da enzima, destacando-se principalmente em 14 dias, onde foram observadas as maiores atividades para os dois fungos ($p < 0,05$), 1,60 e 1,22 U.mL⁻¹.min respectivamente.

Os fungos são conhecidos por serem bons produtores de lipase. Singh & Mukhopadhyay (2012) citam os gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Candida*, e *Penicillium* como produtores da enzima. Sabe-se que fontes lipídicas como triacilglicerídios, ésteres hidrolisáveis, tweens, glicerol, ácidos biliares e ácidos graxos (como os presentes no biodiesel) podem induzir a síntese da enzima por microorganismos (Marek & Bednarski, 1996; Gupta et al., 2003), o que pode explicar o aumento na atividade lipolítica na maioria dos isolados estudados nos tempos finais do ensaio de crescimento.

A produção da lipase pode ser afetada por variáveis como pH, temperatura, aeração, composição do meio e pode variar de acordo com a linhagem do isolado (Cihangir & Sarikaya, 2004). Ainda, Gilham & Lehner (2005) relataram que a acidificação do meio pode influenciar a absorvância do p-nitrofenil, substrato utilizado nesse estudo para a detecção da atividade da enzima. Mesmo relacionada a um substrato de fácil degradação, não foram encontrados valores de atividade condizentes para alguns dos isolados estudados (*Aspergillus* sp.1, *Aspergillus* sp.2 e *Aspergillus* sp.3). Sua atividade pode ter sido influenciada pelos fatores citados, como acidez do meio, ou ainda os fungos podem ter priorizado a degradação de outras frações da mistura em

detrimento da fração de ésteres de ácidos graxos, o que explica os baixos valores de atividade da enzima encontrados.

4.7 Crescimento em meio mineral com a mistura B10

O crescimento dos fungos durante o ensaio foi acompanhado pelo aumento da biomassa formada na interface óleo-água. Essa região limítrofe favorece o crescimento dos micro-organismos porque proporciona o contato com a fonte de carbono, proveniente da fase oleosa, e com os demais nutrientes necessários para o crescimento, oriundos da fase aquosa.

Em todos os isolados avaliados, pode ser observado a ausência de uma fase de aclimação (Figura 8), mesmo com a transferência dos fungos de um meio rico para o meio selecionado para o ensaio (meio mineral mínimo com 20 % da mistura B10). A ausência da fase lag, neste caso, é consequência da submissão dos micro-organismos às condições ideais de temperatura e pH para crescimento, obtidas a partir da análise da superfície de resposta. Sabe-se que essas duas variáveis, além da disponibilidade de uma fonte de carbono e de nutrientes contribuem significativamente na formação de biomassa.

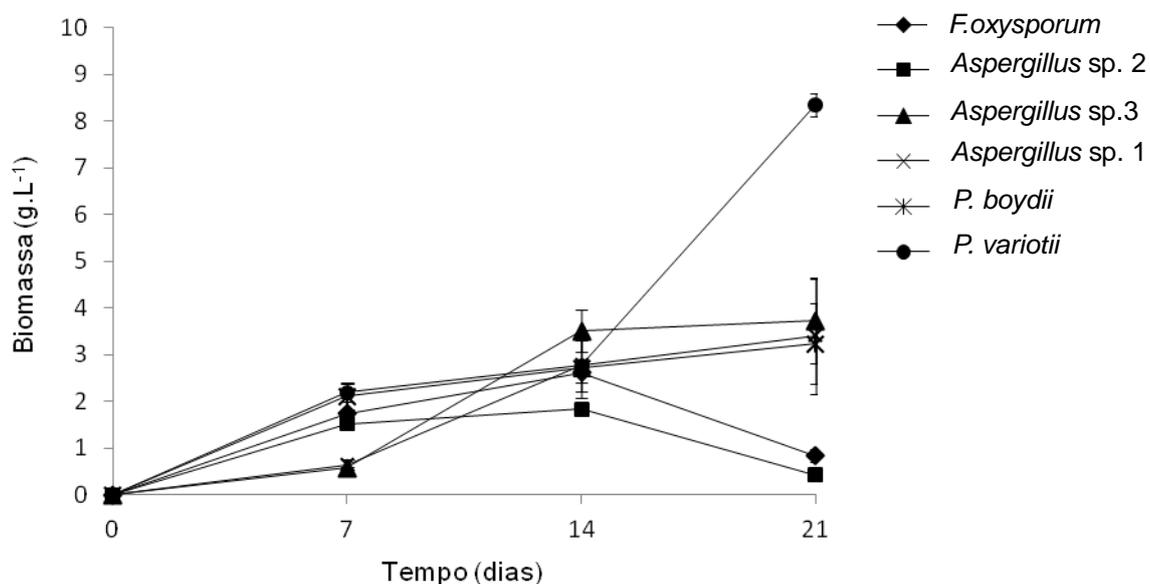


Figura 8. Valores de biomassa dos fungos filamentosos formada na interface óleo-água durante o ensaio da curva de crescimento nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias.

Na primeira semana de análise os fungos apresentaram valores de biomassa bastante distintos entre si. Os isolados *Aspergillus sp.1* e *Aspergillus sp.3* foram os que exibiram os menores valores ($0,64 \text{ g.L}^{-1}$, e $0,56 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente) sendo esses valores similares entre si ($p > 0,05$). Os fungos *P. variotii* e *P.boydii*, foram os que mais cresceram, com um total de $2,18 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,18 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente. Os fungos *Aspergillus sp.2* e *F. oxysporum*, demonstraram um crescimento intermediário, com valores de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,73 \text{ g.L}^{-1}$. Bücken et al. (2011) observaram que após sete dias de incubação em meio mineral Richard & Vogel (1999) e 50 % da mistura B10, o fungo *Paecilomyces variotii* apresentou valores de biomassa em torno de $0,14 \text{ g}$. A grande diferença em relação à biomassa produzida pelo mesmo fungo no estudo de Bücken et al. (2011) e neste ensaio pode estar relacionado ao valor de pH inicial e ao percentual de fase oleosa presente. A percentagem do

combustível presente no microcosmo do estudo conduzido por Bücken et al. (2011) foi de 50 %, e neste caso a camada de óleo sobre o meio pode ter limitado a concentração de oxigênio e influenciado o crescimento do fungo (Bücken, 2010).

Em 14 dias de incubação, todos os fungos apresentaram aumento na biomassa em relação ao tempo 7 dias. Com exceção do isolado *P. variotii*, os demais aumentos foram significativos ($p < 0,05$). Esse período entre 7 e 14 dias de ensaio pode ser caracterizado como uma fase estacionária para os fungos *Aspergillus* sp.2, *F. oxysporum* e *P.boydii*. Para esse último fungo, a fase estacionária foi observada até o final do ensaio. Em relação aos 21 dias, os fungos *Aspergillus* sp.2 e *F. oxysporum* diminuíram consideravelmente o seu crescimento ($p < 0,05$), caracterizando a fase de declínio para os isolados. Essa redução na biomassa pode ter sido ocasionada pelo esgotamento da fonte de carbono do meio. Os demais isolados aumentaram a biomassa em relação ao tempo anterior, caracterizando o tempo 21 ainda como uma fase de crescimento. Contudo, o fungo com produção expressiva de biomassa em relação aos demais foi o do isolado *P.variotti* ($p < 0,05$), com valores de $8,35 \text{ g.L}^{-1}$ no final do estudo.

Ao comparar os resultados de biomassa obtidos neste estudo com os resultados dos trabalhos de Bento et al. (2005b), Bücken (2010) e Schultz (2010), que também observaram o crescimento de fungos filamentosos em meio mineral com diesel e com a mistura diesel/biodiesel, conclui-se que o crescimento é influenciado pela natureza e concentração do combustível presente no microcosmo. A difusão de oxigênio é um fator limitante ao

crescimento dos micro-organismos, e os resultados de crescimento deste estudo também foram influenciados pelas condições de cultivo, como pH e temperatura.

4.8 Ensaio de Biorremediação

Ao longo dos 30 dias do ensaio de biorremediação, foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) quantificação de organismos heterotróficos e degradadores, a partir de amostras de solo dos microcosmos coletadas semanalmente, pela estimativa do número mais provável (NMP); 2) liberação do CO₂, representando a atividade microbiana e indiretamente a degradação do contaminante, a partir de respirometria, realizada a cada 3 dias; 3) degradação do contaminante, estimada por cromatografia gasosa.

4.8.1 Densidade microbiana

Os resultados da estimativa de NMP de heterotróficos e degradadores observados durante os 30 dias deste ensaio de biorremediação encontram-se nas Figuras 9 e 10. A técnica do número mais provável (NMP) tanto pode ser utilizada para estimar a população heterotrófica quanto a degradadora de um dado contaminante de amostras ambientais (Braddock & Catterall, 1999; Viñas et al., 2002; Bento et al., 2005a; Lors et al., 2010; Cerqueira et al., 2011). A técnica é aplicada no monitoramento do crescimento populacional, em ensaios em meio líquido e no solo (Rahman et al., 2003; Meyer, 2011; Cerqueira, 2011), evidenciando aumentos ou reduções na comunidade microbiana ao longo de um tratamento.

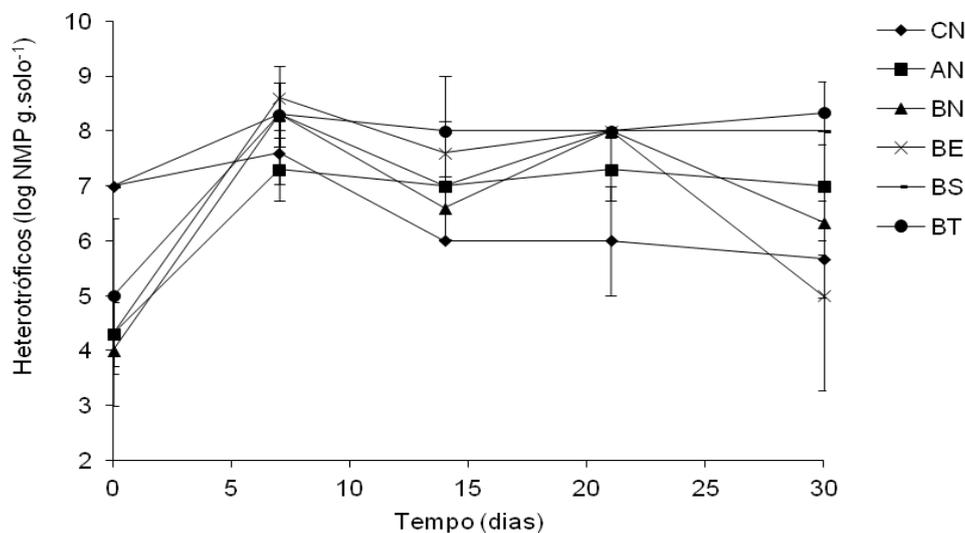


Figura 9. Estimativa do Número Mais Provável de micro-organismos heterotróficos em 30 dias de experimento de biorremediação de solo contaminado por B10. CN- Controle; NA- Atenuação natural; BN- Bioaugmentação com fungos nativos; BE- Bioaugmentação com fungos exógenos; BS- Bioestimulação; BT- Bioaugmentação tardia.

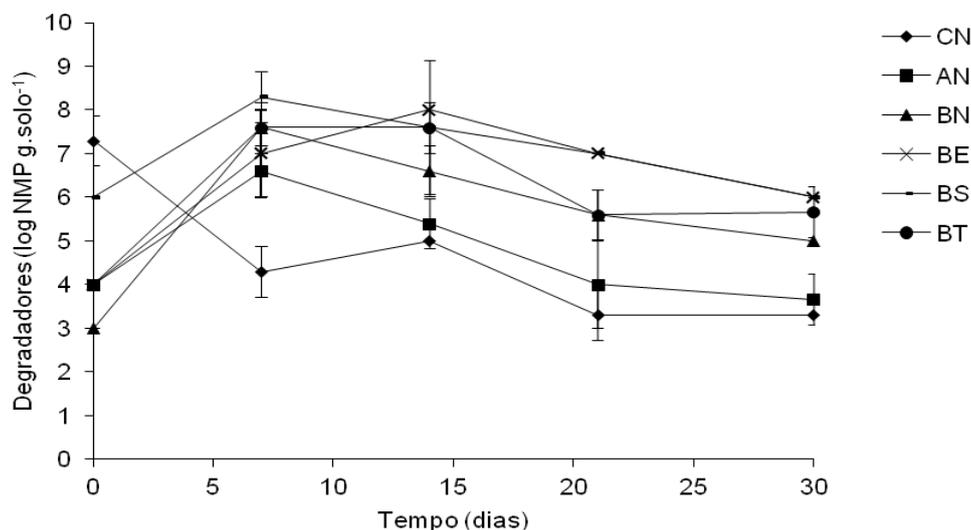


Figura 10. Estimativa do Número Mais Provável de micro-organismos degradadores em 30 dias de experimento de biorremediação de solo contaminado por B10. CN- Controle; NA- Atenuação natural; BN- Bioaugmentação com fungos nativos; BE- Bioaugmentação com fungos exógenos; BS- Bioestimulação; BT- Bioaugmentação tardia.

Pode ser observado que todos os tratamentos exibiram um aumento em suas populações de micro-organismos degradadores e heterotróficos ao longo da primeira semana de ensaio (Figuras 9 e 10). Esse aumento nas populações dos microcosmos que receberam a mistura B10 permite inferir que a concentração inicial de HTP (50 g.kg^{-1} solo) não pareceu causar um efeito inibitório à microbiota tanto nativa quanto exógena. Após esse período, contudo, a população de micro-organismos heterotróficos manteve-se praticamente constante, enquanto que a microbiota degradadora teve sua população reduzida. O único tratamento em que não foi observada a redução da população de degradadores após os primeiros sete dias de ensaio foi bioaugmentação com fungos exógenos (BE). Para esse tratamento, a população de degradadores aumentou até os sete primeiros dias ($p < 0,01$) mantendo-se estável até o 21º dia e em seguida reduziu sua população até o final do experimento ($p < 0,05$). A manutenção dos valores de degradadores pode ter sido em decorrência da introdução dos fungos exógenos com potencial para a degradação do contaminante na população. Diferente do esperado, o mesmo não foi observado para a estratégia bioaugmentação com fungos nativos (BN), onde se observou uma redução de degradadores logo nas primeiras semanas de ensaio. No entanto, mesmo tendo suas populações reduzidas ao longo do ensaio de biorremediação, os tratamentos de bioaugmentação tiveram sua população de micro-organismos degradadores, ao final de 30 dias, em níveis superiores aos valores observados no tempo inicial, sugerindo, possivelmente, a manutenção da microbiota introduzida nos

microcosmos.

A população de heterotróficos do tratamento controle (sem adição do contaminante) apresentou um aumento inicial seguido por um decréscimo de 1,6 log NMP a partir do 14^o dia ($p < 0,05$), se mantendo estável até o final do tratamento. Colla (2012) observou o mesmo aumento da população nos estágios iniciais do ensaio, e levantou a hipótese do crescimento populacional ter sido em decorrência da adição de água destilada para correção da umidade, visto que a água pode solubilizar compostos da matéria orgânica. Em relação à população degradadora, foi observado um declínio a partir dos primeiros dias de ensaio, como esperado. A ausência do contaminante no meio, ou seja, ausência de pressão seletiva acaba por não favorecer a prevalência de micro-organismos degradadores ao longo do ensaio. Ainda, a ausência de uma fonte externa de carbono pode ter corroborado para a redução das populações totais de micro-organismos. Os resultados da análise físico-química do solo (Tabela 2) evidenciam a baixa quantidade de matéria orgânica e de carbono orgânico presentes (1,5 % e 0,93 %, respectivamente). Desta forma, a população nativa contou apenas com o carbono disponível na matéria orgânica. A baixa concentração de matéria orgânica e de carbono orgânico também pode ser visualizada nas taxas respiratórias do controle (Figura 14), que foram mínimas durante o período do estudo, evidenciando a reduzida taxa de degradação da matéria orgânica presente no microcosmo.

A adição de nutrientes mostrou-se eficiente, uma vez que os tratamentos em que foi realizada a correção da relação C:N:P apresentaram,

ao final de 30 dias, aumento significativo das suas populações de heterotróficos, com exceção do tratamento de bioaugmentação com fungos exógenos. Os resultados observados para este tratamento podem estar relacionados à competição dos organismos introduzidos com a microbiota autóctone do solo, ocasionando a redução da população total de microorganismos. Além da correção de nutrientes, o aumento de heterotróficos nos demais tratamentos pode estar ligado à introdução da fonte externa de carbono, representada pela mistura B10. Colla (2012), Meyer (2011) e Silva et al. (2012a) obtiveram resultados semelhantes ao avaliar modificações nas populações de heterotróficos em solo contaminado com a mistura diesel/biodiesel. A população de degradadores também apresentou, ao final de 30 dias, aumentos significativos nos tratamentos que receberam a mistura B10, com exceção de bioestimulação e atenuação natural, que mantiveram os valores iniciais após 30 dias (10^6 e 10^4 NMP.g⁻¹ solo, respectivamente), evidenciando que a introdução do combustível no solo estimulou a microbiota presente, bem como os fungos introduzidos ao utilizar o contaminante como fonte adicional de carbono.

4.8.2 Avaliação da degradação do contaminante

Ao avaliar a produção cumulativa de C-CO² após 30 dias de incubação, foi observado que todos os resultados analisados apresentaram níveis de atividade respiratória superiores ao controle negativo (ausência de combustível) ($p < 0,05$) (Figura 11). Da mesma maneira, ao longo dos 30 dias, as estratégias de bioaugmentação e de bioestimulação foram superiores à

estratégia de atenuação natural, diferenciando-se dessa a partir da primeira amostragem realizada, no terceiro dia de tratamento ($p < 0,05$). Não foram verificadas diferenças entre as estratégias de bioaugmentação e bioestimulação aplicadas.

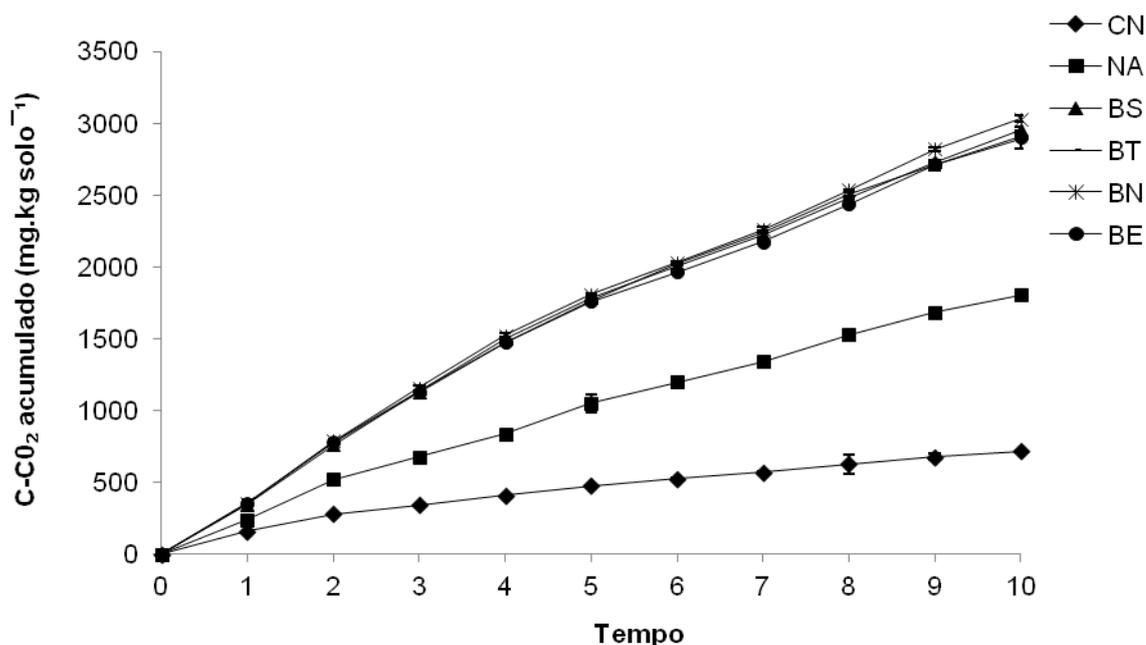


Figura 11. Produção cumulativa de C-CO₂ do solo contaminado por B10 durante o ensaio de biorremediação por 30 dias. CN - Controle; AN - Atenuação natural; BS - Bioestimulação; BT - Bioaugmentação tardia com fungos filamentosos nativos; BN - Bioaugmentação com fungos nativos; BE - Bioaugmentação com fungos filamentosos exógenos.

Assim como observado durante o ensaio preliminar de biorremediação, os tratamentos com maior liberação de CO₂ foram os contaminados com a mistura B10, evidenciando o potencial microbiano na degradação do contaminante. A manutenção da microbiota degradadora (Figura 11) durante o período do experimento também é refletida nas taxas de produção de CO₂, destacando-se, da mesma forma, para os tratamentos que

receberam a mistura B10 em relação ao controle. Diferente do ocorrido durante o primeiro ensaio, neste estudo a liberação de CO₂ para os tratamentos que envolveram estratégias como bioaumentação ou bioestimulação foi maior do que para a estratégia de atenuação natural. Colla (2012) obteve um resultado semelhante ao comparar diferentes estratégias de biorremediação em solo contaminado igualmente com a mistura B10. No entanto, mesmo com uma comunidade metabolicamente menos ativa quando comparada ao ensaio preliminar de biorremediação, a liberação de CO₂ produzida na estratégia de atenuação natural superior ao controle negativo sugere que a microbiota residente é capaz de metabolizar a mistura B10.

A degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos foi avaliada através da diferença de concentração dos hidrocarbonetos totais de petróleo presentes no final dos 30 dias de ensaio, em relação à quantidade presente no tempo inicial. A fração do biodiesel constituinte da mistura não foi monitorada quanto à degradação nesta avaliação. Os resultados da degradação da fração de HTP presentes na mistura B10 podem ser visualizados na Tabela 14.

Tabela 14. Percentual de degradação das diferentes frações de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) nas diferentes estratégias de biorremediação após 30 dias.

Tratamentos	Biodegradação (%)				Total
	C ₈ – C ₁₁	C ₁₁ – C ₁₄	C ₁₄ – C ₂₀	C ₂₀ – C ₄₀	
AN	50,86 ^a	16,17 ^b	11,00 ^{b,c}	31,75 ^c	20,96 ^e
BS	65,60 ^a	26,88 ^b	17,26 ^b	39,26 ^{a,b}	31,13 ^e
BT	62,50 ^a	33,44 ^a	24,82 ^a	45,84 ^a	36,88 ^e
BN	64,00 ^a	25,80 ^{b,c}	13,41 ^b	39,33 ^c	29,22 ^e
BE	58,92 ^a	21,48 ^b	11,44 ^b	44,52 ^a	28,11 ^e

AN - Atenuação natural; BS – Bioestimulação; BT – Bioaumentação tardia com fungos

filamentosos nativos; BN – Bioaugmentação com fungos nativos; BE – Bioaugmentação com fungos filamentosos exógenos. Letras iguais significam que não há diferença significativa entre as frações de HTP (na linha) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Não foi encontrado significância entre os tratamentos em todas as frações de HTP.

Os resultados de biodegradação de HTP presente na mistura B10 evidenciam que para todos os tratamentos, a fração com maior degradação foi na faixa entre C₈-C₁₁. Essa fração corresponde à fração lábil de alifáticos, e de acordo com a literatura, é a mais facilmente biodegradada (van Hamme et al, 2003; Bento et al., 2005a; Vieira et al., 2006). Dentre os tratamentos, bioestimulação e bioaugmentação tardia foram os que apresentaram maior percentual de degradação do total de HTP, no entanto, não se diferenciaram de forma significativa dos demais, exceto pela atenuação natural, que apresentou as menores taxas de degradação total. Estes resultados de degradação são condizentes com o observado durante a respirometria, devido à proporcionalidade entre a produção de CO₂ e o consumo de carbono do substrato pelos micro-organismos, sendo a liberação do gás carbônico proporcional ao substrato biodegradado (Mariano et al., 2008a).

Os resultados da cromatografia gasosa evidenciam que a atividade degradadora exibida pelos consórcios introduzidos foi equivalente ao da microbiota nativa presente no tratamento de atenuação natural. Os micro-organismos autóctones responderam satisfatoriamente ao estímulo gerado pela correção de alguns parâmetros abióticos do meio, como pH, e umidade. Jacques et al. (2010) observaram a relação direta entre a umidade gravimétrica do solo e a produção de C-CO₂, confirmando o pressuposto de que populações

microbianas do solo com intensa atividade de degradação de compostos orgânicos demandam grande quantidade de água para suprir suas necessidades metabólicas (Haider et al., 1999). O potencial degradador da microbiota deste solo já era conhecido devido ao ensaio preliminar de biorremediação. O aumento da percentagem de degradação de HTP na estratégia de atenuação natural deste ensaio em relação à atenuação natural do estudo preliminar, provavelmente está associado à correção dos parâmetros citados anteriormente, o que não foi feito durante o primeiro estudo.

Os valores de HTP introduzido no solo também podem ter influenciado a atividade microbiana. Ao avaliar a biodegradação de diferentes concentrações de HTP em solo após 110 dias, fazendo apenas a correção da relação C:N:P, Li et al. (2007) concluíram que a degradação biótica diminuiu com o aumento da concentração de HTP. Após o período de estudo, os autores observaram que os microcosmos que receberam 50 g HTP/kg de solo reduziram os níveis de HTP em 36,8 %, valor próximo ao observado neste estudo para o tratamento semelhante (BS). A comparação dos percentuais de degradação obtidos no estudo realizado por Li et al. (2007) e neste estudo destaca, novamente, o potencial da microbiota residente em metabolizar hidrocarbonetos totais de petróleo, já que as taxas de degradação observadas por Li et al. (2007) e neste estudo foram similares em tempos diferentes (110 e 30 dias, respectivamente). É importante salientar que os solos avaliados possuíam características diferentes, no entanto, o percentual de matéria orgânica de ambos era semelhante (1,6 %). A diferença na composição edáfica pode ter influenciado a degradação dos hidrocarbonetos, já que os

componentes do combustível podem ter se agregado às partículas do solo, diminuindo a disponibilidade do contaminante aos micro-organismos.

A estratégia de bioaumentação geralmente consiste em inocular um consórcio no tempo inicial do tratamento (Bento et al., 2005a; Karamalidis et al., 2010; Kauppi et al., 2011). Alguns trabalhos recentes, no entanto, obtiveram resultados satisfatórios ao avaliar a biorremediação de solo contaminado por óleo diesel e por borra oleosa através de inoculações sucessivas (Lebkowska et al., 2011; Tahhan et al., 2011; Colla 2012). A bioaumentação tardia (BT) proposta neste estudo foi a estratégia com maior percentual de degradação total de HTP, sem, no entanto, se diferenciar dos demais tratamentos. O objetivo da aplicação desta estratégia foi estimular a microbiota nativa a degradar compostos lábeis durante os primeiros dias de tratamento pela introdução de nutrientes. A introdução do consórcio após a fração leve dos hidrocarbonetos ser degradada estimularia os fungos a metabolizarem as frações recalcitrantes remanescentes, como os hidrocarbonetos aromáticos, já que os fungos são conhecidos por seu potencial degradador dessa fração (Atagana, 2006; Mancera-López et al., 2008; Silva et al., 2009). O tempo de avaliação da biorremediação talvez tenha sido insuficiente para observar maiores diferenças entre os tratamentos. Não obstante, esta estratégia foi a que apresentou maior degradação das frações com mais de 14 carbonos na cadeia. Os resultados obtidos com este tratamento sugerem a possibilidade do desenvolvimento de uma nova estratégia para biorremediação de solos contaminados. Contudo, exige aprimoramento para que seus resultados sejam otimizados, antes do

estabelecimento de conclusões definitivas.

Os resultados da estratégia de bioaumentação, por sua vez, não foram diferentes entre si. Conforme a literatura (Bento et al., 2005a; El Fantroussi & Agathos, 2005; Xu & Lu, 2010), o esperado era que a estratégia de bioaumentação com fungos nativos se destacasse em relação a que utilizava micro-organismos exógenos, visto que esses precisam de um período de adaptação maior ao ambiente e ainda sofrem competição com a microbiota nativa. Durante o ensaio preliminar de biorremediação pode ser observado o sucesso dos fungos exógenos (*P. variotii* e *P. boydii*) na degradação do contaminante, sendo o percentual de HTP degradados superior a todos os tratamentos observados neste ensaio. Apesar disso, os fungos nativos introduzidos apresentavam potencial enzimático para degradação da mistura B10, como foi observado durante os ensaios realizados ao longo deste estudo. Possivelmente o que impediu sua prevalência e desenvolvimento no microcosmos foram limitações da comunidade microbiana do solo geradas por perturbações durante a contaminação. A introdução dos inóculos logo após a contaminação poderia ter gerado um impacto negativo sobre as taxas de degradação (Colla, 2012). Alguns trabalhos referentes ao uso de consórcios alóctones relatam esse efeito negativo (El Fantroussi & Agathos 2005; Xu & Lu, 2010). Apesar dos trabalhos serem referentes à introdução da microbiota exógena, a introdução de células microbianas em uma comunidade em equilíbrio também poderia ocasionar distúrbios na microbiota residente, e conseqüentemente, reduzir a degradação do contaminante até o restabelecimento da população original.

É importante salientar que o tempo avaliado para o ensaio de biorremediação foi de 30 dias. É possível que a população microbiana requeresse um período mais longo do para reduzir os teores de HTP até valores menores. Dentre as estratégias, a bioestimulação foi diferenciada visto que as populações microbianas do solo tratado não haviam sido previamente expostas a contaminantes derivados de petróleo. Portanto, em casos de contaminação ambiental com a mistura B10, a aplicação de nutrientes a fim de estimular a microbiota autóctone à degradação do contaminante pode ser considerada como uma estratégia eficiente para acelerar a degradação da mistura. Ainda, o estudo ressalta a importância de pesquisar novas estratégias, como a bioaugmentação tardia, que pareceu ser uma estratégia eficiente na degradação de hidrocarbonetos.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível isolar fungos filamentosos de solo artificialmente contaminado com a mistura diesel/biodiesel. Após submetidos à pressão seletiva, dois fungos isolados do solo e dois fungos isolados de tanques de combustível (três cepas de *Aspergillus sp.* e uma de *Fusarium oxysporum*) mostraram-se potencialmente biodegradadores de 20 % da mistura B10 em meio mineral, com capacidade para crescer utilizando o combustível como fonte de carbono.

A partir das análises do planejamento experimental fatorial, observou-se que o crescimento dos fungos estudados foi influenciado principalmente pela temperatura, sendo o pH uma variável que atuou somente no isolado *P. boydii*, sendo a interação entre as variáveis influente no crescimento dos isolados D, S1 e *P.boydii*.

Os seis fungos avaliados durante a curva de crescimento expressaram diversas enzimas envolvidas na degradação da mistura B10. Dentre as enzimas responsáveis pela degradação dos hidrocarbonetos de petróleo. A catecol 1,2 dioxigenase expressou maior frequência nos diferentes isolados ao longo dos tempos estudados.

É fundamental que seja avaliada a degradação dos componentes

da fração biodiesel presentes na mistura B10 a fim de se obter resultados de degradação mais fidedignos, visto que os micro-organismos podem utilizar compostos de mais fácil assimilação como fonte de carbono e energia durante a biorremediação.

A inoculação de consórcios microbianos com potencial degradador de origem exógena ou nativos são estratégias que podem apresentar riscos quanto à eficácia na degradação de misturas de diesel/biodiesel visto a complexidade das características físicas, químicas e biológicas de cada solo.

A microbiota endógena, mesmo sem exposição prévia a contaminantes, é capaz de expressar seu potencial degradador diante de estímulos apropriados. As percentagens de remoção de HTP do solo durante a biorremediação foram mais expressivas quando as estratégias bioestimulação e bioaugmentação tardia foram aplicadas.

A inoculação adicional do consórcio em bioaugmentação tardia produziu efeitos positivos para a biodegradação, sendo superiores aos obtidos pelas demais estratégias avaliadas.

6. PERSPECTIVAS

Identificar os três isolados do gênero *Aspergillus* a nível de espécie a partir do sequenciamento da região ITS;

Avaliar a degradação das diferentes frações da mistura B10 durante o ensaio de crescimento em meio líquido;

Detectar a presença de genes envolvidos na expressão de enzimas responsáveis pela degradação dos óleos, tais como lipase, esterase e dioxigenases;

Traçar um perfil das comunidades microbianas no início e no final do experimento de Biorremediação a partir da técnica de PCR-DGGE;

Aprimorar os métodos de bioaugmentação tardia, propondo diferentes tempos para a adição do consórcio;

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

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, Austrália, v. 218, p. 121–130, 2011.

ALEXANDER, M. Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 34, p 4259 – 4265, 2000.

ALISI C, MUSELLA R, TASSO F, UBALDI C, MANZO S, CREMISINI C, SPROCATI AR. Bioremediation of diesel oil in a cocontaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. **Science of Total Environment**, v. 407, p. 3024–3032, 2009.

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

ANDRADE, B.N. **Biorremediação de solos contaminados por óleo diesel com uso da microbiota nativa**. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Biotecnologia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2009.

ANP. Agência Nacional do Petróleo. **Modelo para o Desenvolvimento do Refino Nacional**. Ministério de Minas e Energia, 39p. Disponível em: <www.anp.gov.br> Acesso em: Dezembro de 2012.

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

ARUN, A.; RAJA, P, P.; ARTHI, R. ANANTHI, M.; KUMAR, K.S.;EYINI,M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Biodegradation by Basidiomycetes Fungi, Pseudomonas Isolate, and Their Cocultures: Comparative In Vivo and In Silico Approach. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 151, p132-142, 2008.

ARUN, A. EYINI, M. Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes fungi. *Bioresource Technology*, v.102, p. 8063-8070, 2011.

ATADASHI, I.M.; AROU, M.K.; AZIZ, A.A. High quality biodiesel and its diesel engine application: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Malásia, v.14, p.1999–2008, 2010.

ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J. e WALLIS, F. M. Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 172, p. 201-219, 2006.

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

ATLAS, R.M.; BRAGG, J.R. Bioremediation of marine oil spill: when and when not – the Exxon Valdez experience. **Microbiology Biotechnology**, v.2, p. 213-221, 2009.

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

AWORANTI, O.A.; AGARRY, S.E.; AJANI, A.O. A Laboratory Study of the Effect of Temperature on Densities and Viscosities of Binary and Ternary Blends of Soybean Oil, Soy Biodiesel and Petroleum Diesel Oil. **Advances in Chemical Engineering and Science**, v. 2, p. 444-452, 2012.

BACOSA, H.; KOICHI, S.; CHIHIRO, I. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 702-710, 2010.

BAGGI, G., BARBIERI, P., GALLI, E., TOLLARI, S. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades o-xylene. **Applied Environmental Microbiology**, Milão, v. 53, n. 9, 2129–2132, 1987.

BALAJEE, S.; MAHDEVAN, A. Dissimilation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Azotobacter chroococcum*. *Xenobiotica*, v. 20, p. 607-617, 1987.

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

BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D.R. Characterization of fungal inoculums used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p:248-252, 2007.

BAMFORTH, S. e SINGLETON, I. Biorremediation os polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology**, v.80, p.723-736, 2005.

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**, v. 153, p. 339–344, 2002.

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**, v. 96, p. 1049–1055, 2005a.

BENTO, F. M.; BEECH, I. B.; GAYLARDE, C. C.; ENGLERT, G. E.; MULLER, I. L. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel–mild steel–aqueous system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Brasil, v. 21, n. 2, p. 135–142, 2005b.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F.A.O.; GAYLARDE, C.; VISCARDI, S.L.; MENENDEZ, A.; DARODA, R. Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel á contaminação microbiana durante a estocagem. *Revista Biodiesel*, v. 4, p. 24-26, 2006.

BENTO, F.M.; GAYLARDE, C.C.; CAMARGO, F.A.O. Biossurfactantes. In: João Lucio Azevedo; Itamar Santos Melo. (Org.). **Microbiologia Ambiental**. 2 ed. Rio de Janeiro: Embrapa, p. 151-184, 2008.

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.

BONONI, V.L.; MACHADO, K.M.; MATHEUS, D.R.; VITALI, V.M Capítulo 12. Biodegradação de Organoclorados no Solo por Basidiomicetos Lignocelulolíticos. In: **Microbiologia Ambiental**, 2ª ed. rev. ampl. – Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 547-570, 2008.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology, EUA**, v. 74, p. 63 – 67, 2000.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **Microbiology reviews**, v. 26, p. 73 – 81, 2002.

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

BOUCHEZ, I.; PATURAU, D. DABERT, P; JURETSCHKO, D. DORI, J.;

DELGENES, P.; MOLETTA, R.; WAGNER, M. Ecological study of a bioaugmentation failure. **Environmental Microbiology**, v.2, p. 179-190, 2000.

BRADDOCK, J. F.; CATTERALL, P. H. A Simple Method for Enumerating Gasoline- and Diesel-Degrading Microorganisms. **Bioremediation Journal**, v. 3, 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, p. 248-254, 1976.

BRAUN, S.; APPEL, L.G.; SCHMAL, M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel - a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. **Química Nova**, v.27, p. 472-482, 2003.

BRITO, G.C.B.; SOUZA, D.B.; VASCONCELOS, F.C.W.; BRAGA, L.C. a importância da bioprospecção de microrganismos em áreas contaminadas com produtos derivados do petróleo. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, p. 291-310, 2010.

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

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

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

CALADO, V. MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de Experimentos Usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 260p., 2003.

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

CARVALHAES, N.O. Seleção de microrganismos endofíticos com potencialidades para biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e/ou derivados. 95p. 2009. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia)**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

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. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 82, p. 311–320, 2009.

CASTIGLIONI, G.L.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v.32, p.292-295, 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.; HOLLOENBACH, E.B.; MABONI, F.; VAINSTEIN, M.H.; CAMARGO, F.A.O.; PERALBA, M.C.R.; BENTO, F.M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 11003–11010, 2011.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>, acessado em 12 de dezembro de 2012.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E.; Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World journal of Microbiology and Biotechnology**,v,20, .193-197, 2004.

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

CHAPELLE, F. H . **Ground-water microbiology and geochemistry**. 2. ed. New York: John Wiley e Sons, 477p, 2001.

CHEN,S.Y., WEI, Y.H. and CHANG J.S. Repeted pH- stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.76, p. 67-74, 2007.

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

CHRZANOWSKI, L.; LAWNICZAK, L.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? **World J Microbiol Biotechnol**, v. 28, p. 401–419, 2012.

COLLA, T. **Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura B10 por consórcio bacteriano**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiental). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 138p., 2012.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 273 de 29 de Novembro de 2000. "Dispõe sobre prevenção e controle da poluição em postos de combustíveis e serviços". **Publicada no D.O.U em 8 de Janeiro de 2001.**

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 420 de 28 de Dezembro de 2009. "Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas." **Publicada no D.O.U em 30 de Dezembro de 2009.**

COUTINHO, R. C. P. e GOMES, C. C.. Técnicas para remediação de aquíferos contaminados por vazamentos de derivados de petróleo em postos de combustíveis. **XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos**. 2006.

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

CUNHA, M.E. **Caracterização de biodiesel produzido com misturas binárias de sebo bovino, óleo de frango e óleo de soja**. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

DAI, C.C.; TIAN, L.S; ZHAO, Y.T.; CHEN, Y.; XIE, H. Degradation of phenanthrene by the endophytic fungus *Ceratobasidium stevensii* found in *Bischofia polycarpa*. **Biodegradation**, v.21, p.245-255, 2010.

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

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**, v. 54, p. 894–904, 2007.

DEMIRBAS A. In.: **Biodiesel: a realistic fuel alternative for diesel engines**. London: Springer; 2008.

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

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

DHOTE, M.; JUWARKAR, A.; KUMAR, A.; KANADE, G.S.; CHAKRABARTI, T.

World Journal of Microbial Biotechnology, v.26, p.329-335, 2010.

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

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

FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, P.; VILA, J.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.; GRIFOLL, M.; LEMA, J.M. Trials of bioremediation on a beach affected by the heavy oil spill of the Prestige. **Journal of Hazardous Materials**, v.137, p.1523–1531, 2006.

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**, v. 28, p.19-23, 2005.

FERREIRA, M. G.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p., 1996.

FRITSCH, W; HOFRICHTER, M. Aerobic Degradation by Microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v.11, p. 145-167, 2000.

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

FUJISAWA, H. e HAYAISHI, O. Protochatechuate 3,4- Dioxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, Tóquio, v. 243, p. 2673-2681, 1968.

FUNHOFF, E. G.; VAN BEILEN, J. B. Alkane activation by P450 oxygenases. **Biochim Biophys Acta**, v. 25, n. 2 - 4, p. 186 - 193, 2007.

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

GALVES, F.; ZIMMER, A. ; Bussamara, R.; BENTO, F. M. . Avaliação de um antimicrobiano (CMI e CMB) no controle de microrganismos isolados de sedimento oriundo de uma centrífuga de biodiesel.. In: Salão de Iniciação Científica Ufrgs, 2009, Porto Alegre. Anais do Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2009

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P.. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos de biorremediação de xenobióticos. In:

Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, p. 36-43, 2005

GILHAM, D.; LEHNER, R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. **Methods**, v. 36, p.139-147, 2005.

GONÇALO, A.C. Estudo da eficiência de novos aditivos na gasolina através da cromatografia gasosa. **Monografia de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química)**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 124p., 2004.

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**, v. 31, p. 421-426, 2008.

GUPTA, R.; RATHI, P.; GUPTA, N.; BRADDOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, p. 63-71, 2003.

HAIDER, K. **Microbe-soil-organic contaminant interactions**. In: ADRIANO, D.C. et al. **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. Cap 3, p.33-51., 1999.

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 e Technology**, 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. **Biotechnology Techniques**, v. 7, n. 10, p. 745-748, 1993.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L.Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Applied and Industrial Microbiology**, v.9, p. 177-192, 2011

HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235 – 251, 2006.

HEAD, I.M. Bioremediation: towards a credible technology. **Microbiology**, v. 144, p.599- 608, 1998.

HEGMAN, G.D. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 91, n. 3, p.1140-1154, 1966.

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**, v. 58, p. 113-119, 2009.

JACQUES, R.J.S. **Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 172 f., 2005.

JACQUES, R.J.S.; OKEKE, B.C.; BENTO, F.M.; PERALBA, M.C.R.; CAMARGO, F.A.O. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 99, p.2637-2643, 2008.

JACQUES, R.J.S.; SILVA, K.J.; BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v. 40, p. 310-317, 2010.

JAEGER, K. E.; RANSACK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, , v.15, n. 1, p. 29-63, 1994.

JOHNSEN, A.R. et al. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, v.133, n.1, p.71-84, 2005.

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

KACZOREK, E.; URBANOWICZ, M.; OLSZANOWSKI, A. The influence of surfactants on cell surface properties of *Aeromonas hydrophila* during diesel oil biodegradation, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.81, p.363–368, 2010.

KASHANGURA, C.; HALLSWORTH, J.E.; MSWAKA, AY.) Phenotypic diversity amongst strains of *Pleurotus sajor-caju*: implications for cultivation in arid environments. **Mycological Research**, v.110, p. 312-317, 2006.

KENDRICK, B. **The fifth kingdom**. 3ed, Focus Pub., 373p., 2000.

KIM, Y.-H.; AHN, J.-Y., MOON, S.-H.; LEE, J. Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, melathion by *Fusarium oxysporum* f.sp.pisp cutinase. **Chemosphere**, v.60, p. 1349-1355, 2005.

KING, R.B.; LONG, G.M.; SHELDON, J.K. **Practical Environmental Bioremediation: the Field Guide**, 2 ed., Lewis, Boca Raton, 1997.

KIRAN,G.S.; HEMA,T.A.; GANDHIMATHI, R.; SELVIN,J.; THOMAS, T.A.;RAVJI, T.R.; NATARAJASEENIVASAN, K. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus*

ustus MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.73, p.250-256, 2009.

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**, v. 36, p. 364–373, 2010.

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

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

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

LEMOS, J. L. S. **Estudo da Produção de Xilanases por *Aspergillus awamoriem* bagaço-de-cana**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

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

LI, X.; PEIJUN, X..L.; LIUA, W.; WANGC, L.; MAC, F.; CHUKWUKAE, K.S. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p.601-605, 2009.

LI, X.; LI, P.; LIN, X.; ZHANG, C.; LI, Q.; GONGA, Z. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. **Journal of Hazardous Materials**, v. 150, p.21-26, 2008.

LIANG, Y.; ZHANG, X.; WANG, J.; LI, G. Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 241-242, p. 371– 378, 2012.

LOH, K.C.; CHUA, S.S. *Ortho* pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of *meta* pathway at high substrate concentrations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p.620-626, 2002.

LÔBO, E.P.; FERREIRA, S.L.; CRUZ, R.S. Biodiesel: Parâmetros de qualidade

e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, p: 1596-1608, 2009.

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

LUZ, L.P. **Estudo da viabilidade do uso da técnica de cromatografia gasosa bidimensional abrangente (CG X CG) no estudo de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) em sedimentos**. Tese de Doutorado em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 130p., 2010.

MANCERA-LÓPEZ, M.E.; ESPARZA-GARCIA, F.; CHÁVEZ-GÓMEZ, B.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; CARRERA-CORTÉS, J. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 61, p. 151-160, 2008.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. **Applied and Environmental Microbiology**, Áustria, v. 67, n. 1, p. 3127–3133, 2001.

MARIANO, A.P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 162p. 2006. **Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente)**. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

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.; MORAIS, E. B.; MARTINS, M.; RODRIGUES-LIMA, F.; DAIROU, J.; LAMOURI, A.; MALAGNAC, F.; SILAR, P.; DUPRET, J.M. An acetyltransferase conferring tolerance to toxic aromatic amine chemicals: molecular and functional studies. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 18726–18733, 2009.

MACIEL, F.R.; SELEGHIM, M. H. R.; CONTIERO, J.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. ; ANGELIS, D.F . Aerobic biodegradation of butanol and diesel oil blends. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p. 7094-7101, 2010.

MAREK, A.; BEDNARSKI, W.; Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. **Biotechnology Letters**, v. 18, p.1155-1160,1996.

MAZZUCO, L.M. **Atenuação Natural de Hidrocarbonetos Aromáticos em Aquíferos Contaminados com Óleo Diesel**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 98p, 2004.

McCARTY, P.L. BECK, L.; AMANT, P.St. Biological denitrification of wastewaters by addition of organic materials. **Proceedings of 24th industrial wastewater conference**, v. 1271- 1286, 1969.

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

MENEGHETTI, L.R.R.; THOMÉ, A.; SCHNAID, F.; PRIETTO, P.D.M.; CAVELHÃO, G. Natural Attenuation and Biostimulation of Biodiesel Contaminated Soils from Southern Brazil with Different Particle Sizes. **Geotecnia Ambiental**, artigo 4, 2012.

MERCEDES, M.; MARI, N, THEO, H.M.; SMITS, J. B., ROJO, F. The alkane hydroxylase gene of *Burkholderia cepacia* RR10 is under catabolite repression control. **The Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 14, p. 4202–4209, 2001.

MEYER, D.D. Avaliação da biodegradabilidade das misturas de diesel e biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias. 2010. 161p. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

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

MISHRA, S.; JYOT, J.; KUHAD, R.C.; LAL, B.. Evaluation of Inoculum Addition to Stimulate In Situ Bioremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Índia, v. 67, n. 4, p. 1675–1681, 2001.

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

MORAES, M.S. **Biodiesel de sebo: avaliação de propriedades e testes de consumo em motor a diesel**. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

MUDGE, S.M. e PEREIRA, G. Stimulating the Biodegradation of Crude Oil with Biodiesel Preliminary Results. **Spill Science e 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.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 183, p. 183-198, 2005.

NAZAROV, A.V.; ANAN'INA, L.N.; YASTREBOVA, O.V.; PLOTNIKOVA, 136
The effect of oil contamination on bacteria in a soddy-podzolic soil. *Eur Soil Science*, v. 43, p.1382-1386, 2010.

NOZAKI, M.; KOTANI, S.; ONO, K.; SENOH, S. Metapyrocatechase: III. Substrate specificity and mode of ring fission. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Enzimology**, v. 220, n. 2, p. 213 – 223, 1970.

OLUSOLA, S.A.; ANSLEM, E.E. Bioremediation of a Crude Oil Polluted Soil with *Pleurotus Pulmonarius* and *Glomus Mosseae* Using *Amaranthus Hybridus* as a Test Plant. **Bioremediation e Biodegradation**, v.1, p.1-6, 2010.

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

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

PASSMANN, F. e DOBRANICK, J.K. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: **International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, 9., 2005. Proceedings., p.18-22, 2005.

PASQUALINO, J.C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass and Bioenergy**, 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**, v. 146, p. 9–24, 2010.

PEIXOTO, R.M.; VIEIRA, J.D.G. Desenvolvimento da tecnologia de determinação rápida de microrganismos degradadores do petróleo e derivados e determinação do seu potencial degradativo. In: **Melhores Trabalhos de Iniciação Científica**. Série: Prêmio UFG de Iniciação Científica, 2004-2005. p 45-59. 329. 2006.

PEIXOTO, R.S.; VERMELHO, A.B.; ROSADO, A.S. Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects. **Enzyme Research**, 2011.
PEREIRA JUNIOR, N; GOMES, E.B.; SORIANO, A.U. **Séries em Biotecnologia: Biodegradação de Hidrocarbonetos**. Rio de Janeiro: Amiga Digital, 2009. 75 p.

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

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.

PIJANOWSKA, A.; KACZOREK, E.; CHRZANOWSKI, L.; OLSZANOWSKI, A. Cell hydrophobicity of *Pseudomonas* spp. And *Bacillus* spp. bacteria and hydrocarbon biodegradation in the presence of Quillaya saponin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Polônia, v. 23, n. 5 , p. 677-682, 2007.

PIMENTEL, M.F.; RIBEIRO, G.M.; CRUZ, R.S.; STRAGEVITCH, L.; FILHO, J.G.; TEIXEIRA, L.S.G. Determination of biodiesel content when blended with mineral diesel fuel using infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Microchemical Journal**, v. 82, p: 201-206, 2006

PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C.;RIBEIRO, N.M.; TORRES, E.A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P.A.; ANDRADE, J.B. Biodiesel: Na Overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p.1-18, 2005.

POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by whiterot fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 57, p. 20–33, 2001.

POZDNYAKOVA, N.N.; Dubrovskaya, E.V.; MAKAROV, O.E.; NIKITINA, V.E.; TURKOVSKAYA, O.V. Production of Ligninolytic Enzymes by White-rot Fungi

during Bioremediation of Oil-contaminated Soil. **Soil Enzimology**, v.22, p. 363-377, 2011.

PUTZKE, J. e PUTZKE, M. T L, **O Reino dos Fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, v.2., 214 p., 2002.

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

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

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, Alemanha, v. 147–148, p. 237–250, 2009.

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

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

RODRIGUEZ-MARTINEZ, E.M.; PÉREZ, E.X.; SCHADT, C.W.; MASSOL-DEYA, A.A. Microbial diversity and bioremediation of a Hydrocarbon-contaminated Aquifer (Vega Baja, Puerto Rico). **Environmental Research and Public Health**, v.3, 3, p:292-300, 2006.

RUGGERI, C.; FRANZETTI, A.; BESTETTI, G.; CAREDDA; P.; LA COLLA, P.; PINTUS, M.; SERGI, S.; TAMBURINI, E. Isolation and characterisation of surface active compound-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated environments. **International Biodeterioration e Biodegradation**, Itália, v. 63, n. 7, p. 936–942, 2009.

SANTOS, V. L.; LINARD, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents - identification and degradation potential. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1001-1006, 2004.

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**, v. 109, p. 493–497, 2007.

SCHULZ, S.; GIEBLER, J.; CHATZIONATAS, A.; WICK, L.Y.; FETZER, I.; WELZL, G.; HARMS, H.; SCHLOTTER, M. Plant litter and soil type drive abundance, activity and community structure of alkB harbouring microbes in different soil compartments. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, v.6, p. 1763-1774, 2012.

SCHULTZ, F.M. **Biorremediação de solos contaminados com diesel e misturas de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 152p, 2010.

SILVA, L.M.B.; ALVARES, J.J. Effects of Ethanol versus MTBE on Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene Natural Attenuation in Aquifer Columns. **Journal of Environment Engineering**, v.128, n.9, p. 862-865, 2002.

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

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

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

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

SILVA, A.S.; CAMARGO, F.A.O.; ANDREAZZA, R.; JACQUES, R.J.S.; BALDONI, B.B.; BENTO, F.M. Enzymatic activity of catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase produced by *Gordonia polyisoprenivorans*. **Química Nova**, v. 35, p. 1587-1592, 2012b.

SIMON, M.A.; BONNER, J.S.; PAGE, C.A.; TOWNSEND, R.T.; MUELLER, D.C.; FULLER, C.B.; AUTENRIETH, R.L. Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland.

Ecological Engineering, v. 22, p. 263–277, 2004.

SINGH, H. **Mycoremediation: Fungal Bioremediation**. New Jersey: Wiley-interscience, 2006. 592 p.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M.; Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.1-35, 2012.

SOARES-JUNIOR, J; MARIANO, P.A.; ANGELIS, D.F. Biodegradation of biodiesel-diesel blends by *Candida viswmanthii*. **African Journal of Biotechnology**, v.8, 12, p:2774-2778, 2009.

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

SOUZA, M.M. **Biodegradação de Biodiesel em Misturas Diesel/Biodiesel por Microrganismos de Água Portuária**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiental). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 182p., 2011.

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

STEGLIA, T.; JAKUBOWICZ, P.; KAPUSTA, P. Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v.125, p.1-10, 2012.

STOTZKY, G. Microbial Respiration. In.: Black, C. A. (ed.). **Methods in soil analisys**. Madison. SSSA 1965, p. 1550 – 1572.

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

SUZUKI, Y. MIYAMOTO, K., OHTA, H.; A novel thermostable esterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7, **FEMS Microbiology Letters**, v.236, p.97-102, 2004.

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

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

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 e Biodegradation**, Jordânia, v. 65, p. 130-134, 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.

TESCH, C.; NIKOLEIT, K.; GNAU, V.; GÖTZ, F.; BORMANN, C. Biochemical and Molecular Characterization of the Extracellular Esterase from *Streptomyces diastatochromogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.178, n. 7, p. 1858–1865, 1996.

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

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

VALENTIN, L.; KLUCZEK-TURPEINEN, B.; Oivanen,P.; Hatakka,A. Evaluation of basidiomycetous fungi for pretreatment of contaminated soil. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p.851-858, 2009

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

VAN BEILEN, J. B.; WITHOLT, B. Alkane degradation by pseudomonads. In.: Ramos JL (ed) **The Pseudomonads**. Kluwer, Dordrecht, 2004

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

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

VARSHA, Y.M.; DEEPTHI, N.; CHENNA, S. An Emphasis on Xenobiotic Degradation in Environmental Clean up. **Bioremediation e Biodegradation**, v. 2, S11-001, 2011.

VAZ, F.S. Bactérias Degradadoras de Biodiesel, Diesel e Misturas em Tanques de Armazenamento. Dissertação (Mestrado em Microbiologia. Universidade Federal de Goiás, Gôiania, 46p., 2010.

VIEIRA, T.; LIMA, M.F.; PEIXOTO, R.M.; VIEIRA, J.D.G. Utilização de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) em teste rápido de caracterização de potenciais biodegradadores debiodiesel. In: **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Brasília, 2007a.

VIEIRA, T.; LIMA, M.F.; PEIXOTO, R.M.; VIEIRA, J.D.G.. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Brasília, 2006.

WHITE TJ, BRUNS TD, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR protocols, a guide to methods and applications**. San Diego, California: Academic Press, p. 315-322, 1990.

WHITELEY, C.G.; BURGESS, J.E.; MELAMANE, X.; PLETSCHE, B.; ROSE, P.D.; The enzymology of sludge solubilisation utilising sulphate-reducing systems: the properties of lipases, **Water Research**, v.37, p.289-296, 2003.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M., Glicogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.38, p.663–670, 1978.

WU, J.; YU, H. Biosorption of 2, 4-dichlorophenol from aqueous solution by *Phanerochaete chrysosporium* biomass: isotherms, kinetics and thermodynamics. **Journal of Hazardous Materious**, v.1, p. 498–508, 2006.

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

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**, v. 101, p. 8452–8456, 2010.

ZHANG, C.; HUGHES, J.B.; NISHINO, S.F.; SPAIN, J.C. Slurry-phase biological treatment of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene: role of bioaugmentation and effects of high dinitrotoluene concentrations. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 13, p. 2810 - 2816, 2000.

ZHANG, X., PETERSON, C., REECE, D., HAWS, R., MOLLER, G., 1998. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **American Society of Agricultural Engineers**, n.41, p.1423–1430. 1998.

ZHENG, Z.; OBBARD, J.P.; Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 3–9, 2002.

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

8. ANEXOS

Meio Mineral Mínimo (Bushnell & Hass, 1941)

KH_2PO_4	1,0 g/L
K_2HPO_4	1,0 g/L
NH_4NO_3	1,0 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/L
FeCl_3	0,05 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L

Meio Mineral Mínimo (Richard & Vogel, 1999)

Macronutrientes

KCl	0,7g/L	
KH_2PO_4	2,0g/L	ou KH_2PO_4 1,55g/L
Na_2HPO_4	3,0g/L	ou NaH_2PO_4 2,9g/L
NH_4NO_3	1,0g/L	

Micronutrientes

MgSO_4	4,0g/L	ou $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,2g/L
FeSO_4	2,0g/L	ou $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,36g/L
MnCl_2	0,2g/L	ou $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,31g/L
CaCl_2	0,2g/L		
pH	7,2		

Caldo Nutriente, pH = 7,0.

Extrato de carne 3,0 g/L

Peptona bacteriológica 5,0 g/L

Dissolver os reagentes em água destilada e autoclavar por 20 min. a 120 °C.

Meio Ágar Malte

Extrato de Malte 30 5,0 g/L

Peptona bacteriológica 5,0 g/L

Ágar 15 g/L

Dissolver os reagentes em água deionizada e ajustar pH para 5,4.

Autoclavar por 20min. a 121°C.

Solução Mineral com Indicador-Redox DCPIP

DCPIP 0,025 g/L (100 mL)

MM1 400 mL

Diluir a solução contendo o indicador-redox em MM1 e autoclavar por 20 min. a 121 °C. Proteger o meio da luz, cobrindo o frasco com papel-alumínio