

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

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE MISTURAS DE  
DIESEL E DE BIODIESEL (B0, B20 E B100) EM DOIS SOLOS  
COM DIFERENTES GRANULOMETRIAS**

**Daniel Derrossi Meyer  
Biólogo/UFRGS**

**Porto Alegre, março de 2011**

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

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE MISTURAS DE  
DIESEL E DE BIODIESEL (B0, B20 E B100) EM DOIS SOLOS  
COM DIFERENTES GRANULOMETRIAS**

**Daniel Derrossi Meyer  
Biólogo/UFRGS**

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

**Porto Alegre, março de 2011.**

Catálogo na Publicação  
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

M613a Meyer, Daniel Derrossi

Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias / Daniel Derrossi Meyer. – 2011.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

Orientação: Prof. Fátima Menezes Bento

1. Combustíveis 2. Óleo diesel 3. Biodiesel 4. Biodegradação 5. Solo.  
I. Bento, Fátima Menezes, orient. II. Título.

CDU 579.66 (043)

*“A rapidez da mudança e a velocidade com que novas situações se criam  
acompanham o ritmo impetuoso e insensato do Homem, ao invés de  
acompanhar o passo deliberado da Natureza”*

**Rachel Carlson**

*“Os homens esqueceram essa verdade – disse ainda a raposa. Mas tu não a  
deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.*

*Tu és responsável pela tua rosa...”*

**Antoine de Saint-Exupéry**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, Profa Dra Fátima Menezes Bento, pela oportunidade, amizade e confiança depositada.

Aos meus pais, Olavo e Gecilda, pela vida.

Aos meus irmãos, André e Fernanda, pelo incentivo, e à Michele pelo amor, compreensão e carinho.

Às minhas estagiárias queridas, Naiara Santestevan e Sabrina Becker, pela competência e amizade.

A todos os colegas de laboratório, especialmente, Lucélia Cabral, Patrícia Giovanella, Vanessa Cerqueira, Fabíola Schultz e Dione Roehrs; (Solos); Francielle Bücken, Sabrina Salamoni e Karina Heck (ICBS), pelo apoio técnico e pela amizade.

Aos colegas Francisco Esmalle Lima e Carolina Gusatti pelo companheirismo.

À colega Rosele dos Santos pelo auxílio nas coletas de solo.

À Profa Dra Maria do Carmo Peralba e equipe (Simone, Paula e Gabriel) pelo auxílio e aprendizado durante o processo de extração dos solos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro durante os dois anos de Mestrado.

E a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho.

# AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE MISTURAS DE DIESEL E DE BIODIESEL (B0, B20 E B100) EM DOIS SOLOS COM DIFERENTES GRANULOMETRIAS<sup>1</sup>

## Resumo

Autor: Daniel Derrossi Meyer  
Orientador: Fátima Menezes Bento

O biodiesel é uma fonte alternativa de energia que apresenta alto potencial de biodegradabilidade e relativa baixa toxicidade, mitigando, assim, o impacto aos ecossistemas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biodegradação das misturas de diesel/biodiesel (B0, B20 e B100) em dois tipos de solo (argiloso e arenoso) sob duas estratégias de biorremediação (Atenuação Natural e Bioaumentação). A seleção do consórcio microbiano foi realizada a partir da utilização de indicadores-redox (DCPIP e TTC), de ensaios enzimáticos [alcano hidroxilase, Catecol 1,2-dioxigenase, Catecol 2,3-dioxigenase, Protocatecol 3,4-dioxigenase, hidrólise do p-NPA (esterase) e lipase], produção de proteínas totais, de biossurfactantes, de metabólitos e avaliação da hidrobicidade celular. Foram eleitos quatro isolados bacterianos (*Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*), formando um consórcio a ser utilizado na Bioaumentação. Para os experimentos de biodegradação em solos, a atividade microbiana foi avaliada por respirometria, desidrogenase, contagem de degradadores/heterotróficos e pela concentração de TPH para B0 e B20 e de ésteres totais para B20 e B100. Foram observados percentuais acima de 90% na biodegradação para B0 e B20 tanto para Atenuação Natural e Bioaumentação quanto para os dois tipos de solos avaliados. Para B100, a biodegradação de estéreis totais foi superior na Bioaumentação para os dois solos. Embora a Bioaumentação não tenha apresentado diferenças na biodegradabilidade entre B0 e B20, a adição do consórcio microbiano associado aos macronutrientes inoculados no solo foi importante para aumentar as taxas de degradação do tratamento B100.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (161 p.), março, 2011.

## **BIODEGRADABILITY EVALUATION OF DIESEL AND BIODIESEL BLENDS (B0, B20 and B100) IN TWO SOILS WITH DIFFERENT GRANULOMETRIES<sup>2</sup>**

### **Abstract**

Author: Daniel Derrossi Meyer  
Advisor: Fátima Menezes Bento

Biodiesel is an alternative source of energy with high biodegradability potential and relatively low toxicity, thus, mitigating impact on ecosystems. The aim of this study was to evaluate biodegradation of diesel/biodiesel (B0, B20 and B100) blends in clay and sandy soils under two approaches of bioremediation (Natural Attenuation and Bioaugmentation). The selection of microbial consortia was carried out using redox indicators (DCPIP and TTC), enzymatic assays [alkane hydroxylase, catechol 2,3-dioxygenase, protocatechol 3,4-dioxygenase, p-NPA hydrolysis (esterase) and lipase], total protein, biosurfactants and metabolites yields and cell hidrofobicity assessment. Four bacterial strains were elected (*Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*), forming a consortium to be used in Bioaugmentation. For soil biodegradation experiments, microbial activity was assessed by respirometry, desidrogenase, degradators/heterotrophic count and by TPH concentration for B0 and B20 and total esters for B20 and B100. At estimating degradation rates for the soils assessed, it was not observed significant differences between B0 and B20, both for the soils as for the two bioremediation approaches, showing high percentage of degradation (>90%). As for B100, the biodegradation of total esters was higher on bioaugmentation for both soils. Although bioaugmentation have not shown differences in biodegradability between B0 and B20, the addition of microbial consortia associated to macronutrients inoculated in the soil was important to increase the degradation rates of B100 treatment.

---

<sup>2</sup> Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (161 p.), março, 2011.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xv
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	5
2.1 Cadeia produtiva, p.rincipais fontes de contaminação por combustíveis e legislação vigente.....	5
2. 2 Óleo diesel e biodiesel: composição química, toxicidade e exposição.....	9
2. 3 Aspectos fisiológicos da degradação.....	10
2. 4 Produção de biossurfactantes.....	19
2.5 Biorremediação de solos contaminados por combustíveis.....	23
2.6 Fatores abióticos que influenciam a degradação microbiana no solo.....	30
3. Material e Métodos.....	36
3.1 Isolamento e seleção de micro-organismos.....	36
3.1.1 Combustível.....	36
3.1.2 Coleta das amostras contaminadas.....	37
3.1.3 Enriquecimento, isolamento e seleção de micro-organismos .....	37
3.1.4 Preparo do pré-inóculo.....	40
3.1.5 Avaliação da capacidade biodegradadora preliminar do biodiesel (B100), utilizando dois indicadores redox .....	40
3.1.6 Preparação do inóculo para os ensaios de biodegradabilidade em meio líquido.....	42
3.1.7.1 Determinação da concentração de proteínas totais.....	43
3.1.7.2 Medida da tensão superficial.....	43
3.1.7.3 Medidas de pH.....	44
3.1.7.4 Índice de emulsificação (IE <sub>24</sub> ).....	45
3.1.7.5 Avaliação da hidrofobicidade celular.....	45
3.1.8.1 Preparo do sobrenadante para avaliação da atividade enzimática.....	46
3.1.8.2 Determinação da atividade de Alcano Hidroxilase (monoxigenase) .....	48
3.1.8.3 Determinação da atividade das enzimas 1,2-Catecol; 2,3-Catecol e 3,4-Protocatecol (Dioxigenase) .....	48
3.1.8.4 Determinação qualitativa da atividade de esterase.....	49
3.1.8.5 Determinação quantitativa da atividade de esterase.....	50



3.1.8.6 Determinação da atividade de lipase.....	50
3. 2 Experimento de biorremediação.....	51
3.2.1 Amostras de solos não contaminados.....	52
3.2.2 Biorremediação dos solos.....	53
3.2.3 Análise respirométrica.....	54
3.2.4 Atividade enzimática do solo.....	56
3.2.5 Contagem de heterotróficos totais.....	57
3.2.6 Contagem de degradadores.....	58
3.2.7 Extração do combustível das amostras de solo.....	58
3.2.8 Análises cromatográficas .....	59
3.3 Identificação bacteriana por técnicas moleculares.....	61
3.3.1 Extração do DNA cromossômico.....	61
3.3.2 Sequenciamento da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA.....	62
3.4 Análise estatística.....	63
4. Resultados.....	64
4.1 Seleção de um consórcio bacteriano.....	64
4.1.1 Pré-seleção microbiana por indicadores-redox e crescimento celular.....	63
4.1. 2 Produção de biossurfactantes.....	69
4. 1. 3 Avaliação do percentual de hidrofobicidade.....	73
4.1.4 Detecção de metabólitos.....	76
4.1.5 Determinação da atividade enzimática .....	78
4. 2 Biorremediação de misturas de diesel/biodiesel (B0, B20 e B100) em dois tipos de solo.....	82
4. 2. 1 Avaliação da atividade cumulativa da produção de CO <sub>2</sub> por micro-organismos presentes no solo.....	82
4. 2. 2 Avaliação da atividade de desidrogenase.....	85
4. 2. 3 Contagem de heterotróficos e de degradadores.....	89
4.2. 4 Degradação das misturas de diesel e biodiesel.....	92
5. Discussão.....	96
5.1 Seleção de um consórcio bacteriano.....	96
5. 1. 1 Curva de crescimento.....	96
5. 1. 2 Produção de biossurfactantes.....	97
5. 1. 3 Avaliação da hidrofobicidade celular.....	100
5. 1. 4 Produção de metabólitos.....	102

5. 1. 5 Avaliação da atividade enzimática.....	105
5. 1. 6. Seleção de um consórcio microbiano.....	109
5. 2 Biorremediação de misturas de diesel/biodiesel (B0, B20 e B100) em dois tipos de solos.....	111
5. 2. 1. Avaliação da atividade respiratória.....	111
5. 2. 2 Avaliação da atividade de desidrogenase.....	113
5. 2. 3 Estimativa da biodegradabilidade das misturas de diesel/biodiesel.....	116
6. Conclusões.....	121
7. Perspectivas.....	122
8. Referências Bibliográficas.....	124
9. Anexos.....	140
10. Vitta.....	145

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atributos físico-químicos dos dois solos avaliados .....	53
Tabela 2: Seleção Preliminar de Isolados Bacterianos, utilizando dois indicadores-redox, TTC e DCPIP, em meio mineral (MM1) e biodiesel puro como fonte de carbono (B100) .....	65
Tabela 3: Índice de Emulsificação (%) de 10 isolados bacterianos .....	72
Tabela 4: Presença das enzimas esterase em meio de cultura .....	79
Tabela 5: Determinação da atividade específica ( $U\ mg^{-1}$ de proteínas totais) de seis enzimas em três diferentes tempos de incubação (1, 7 e 14 dias) da mistura B20.....	81
Tabela 6: Percentagem de degradação das misturas de diesel/biodiesel (B0, B20 e B100) após 60 dias para as duas estratégias de biorremediação [Atenuação Natural (A) e Bioaugmentação (B)] nos dois solos (arenoso e argiloso).....	93
Tabela 7: Comparação dos métodos de biodegradação.....	95
Tabela 8: Comparação dos resultados obtidos por diferentes métodos de detecção da biodegradabilidade para selecionar um consórcio bacteriano.....	110
Tabela 9: Identificação dos isolados para compor um consórcio bacteriano por sequenciamento parcial da região 16S ribossômico.....	111

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Relação de acidentes ao transportar combustíveis derivados do petróleo/biodiesel. Fonte: FEPAM, 2010.....	6
Figura 2: Registros de Áreas Contaminadas para o estado de São Paulo (CETESB, 2009).....	7
Figura 3: Rotas da degradação de alcanos por oxidação terminal, subterminal e biterminal. (modificado de Berthe-Corti & Fetzner, 2002; Beilen et al., 2003).....	12
Figura 4: Estrutura do sistema alcano hidroxilase (Modificado de van Beilen et al., 2003).....	13
Figura 5: Rota metabólica de degradação de compostos aromáticos por dioxigenases (modificado de Dagley, 1986).....	14
Figura 6: Degradação de hidrocarbonetos aromáticos por micro-organismos (Bertini et al., 1995).....	15
Figura 7: Hidrólise de um éster catalisado por lipases ou esterases (Santos, 2009)...	16
Figura 8: Hidrólise de triacetina por lipases e esterases pancreáticas de acordo com a função da concentração do substrato (Modificado de Hasan et al., 2006).....	17
Figura 9: Comportamento da concentração de um biossurfactante em solução aquosa versus tensão superficial (Santos et al., 2007).....	21
Figura 10: Esquema global das interações entre micro-organismos, solo, contaminante e biossurfactantes (Volkering et al., 1998).....	23
Figura 11: Relação de Técnicas de Remediação Implantadas no Estado de São Paulo (CETESB, 2009).....	25
Figura 12: Curva padrão, utilizando solução de BSA, para determinação de proteínas totais.....	44
Figura 13: Curva padrão para avaliar produção de TPF.....	57
Figura 14: Demonstração da mudança de coloração a partir da reação de redução em dois indicadores-redox (DCPIP e TTC). [A] Controle TTC; [B] Isolado 9 após 144 horas com o indicador TTC; [C] Controle DCPIP; [D] Isolado 5 após 144 horas com o indicador DCPIP.....	65
Figura 15: Crescimento de <i>Bacillus megaterium</i> em meio aquoso sob três diferentes tratamentos (B0, B20 e B100) nos tempos 7 e 14 dias. CN (controle negativo): MM1 + 1% de combustível.....	66
Figura 16: Produção de proteínas totais de 10 isolados bacterianos, incubados em meio mineral + 1% de diesel (B0) por até 14 dias. ....	68

Figura 17: Produção de proteínas totais de 10 isolados bacterianos, incubados em meio mineral + 1% de diesel (B20) por até 14 dias. ....	68
Figura 18: Produção de proteínas totais de 10 isolados bacterianos, incubados em meio mineral + 1% de diesel (B100) por até 14 dias. ....	68
Figura 19: Tensão superficial de 10 isolados bacterianos com respectivo controle negativo (CN), incubados em meio mineral + 1% de diesel (B0) por até 14 dias. ....	70
Figura 20: Tensão superficial de 10 isolados bacterianos com respectivo controle negativo (CN), incubados em meio mineral + 1% de diesel (B20) por até 14 dias.....	71
Figura 21: Tensão superficial de 10 isolados bacterianos com respectivo controle negativo (CN), incubados em meio mineral + 1% de diesel (B100) por até 14 dias.....	71
Figura 22: Percentagem de hidrofobicidade da parede celular para 10 isolados bacterianos, utilizando solvente de baixa polaridade (clorofórmio), submetido ao tratamento B0.....	74
Figura 23: Percentagem de hidrofobicidade da parede celular para 10 isolados bacterianos, utilizando solvente de baixa polaridade (clorofórmio), submetido ao tratamento B20.....	75
Figura 24: Percentagem de hidrofobicidade da parede celular para 10 isolados bacterianos, utilizando solvente de baixa polaridade (clorofórmio), submetido ao tratamento B100.....	75
Figura 25: pH de 10 isolados bacterianos com respectivo controle negativo (CN), incubados em meio mineral + 1% de diesel (B0) por até 14 dias. ....	77
Figura 26: pH de 10 isolados bacterianos com respectivo controle negativo (CN), incubados em meio mineral + 1% de diesel (B20) por até 14 dias. ....	77
Figura 27: pH de 10 isolados bacterianos com respectivo controle negativo (CN), incubados em meio mineral + 1% de diesel (B100) por até 14 dias.....	78
Figura 28: Produção cumulativa de CO <sub>2</sub> por experimento respirométrico de Atenuação Natural em dois tipos de solos ao longo de 60 dias de incubação.....	84
Figura 29: Produção cumulativa de CO <sub>2</sub> por experimento respirométrico de Bioaumentação em dois tipos de solos ao longo de 60 dias de incubação.....	85
Figura 30: Atividade de desidrogenase em solo arenoso sob Atenuação Natural ao longo de 60 dias de incubação.....	86
Figura 31: Atividade de desidrogenase em solo argiloso sob Atenuação Natural ao longo de 60 dias de incubação.....	86
Figura 32: Atividade de desidrogenase em solo arenoso sob Bioaumentação ao longo de 60 dias de incubação.....	88

Figura 33: Atividade de desidrogenase em solo argiloso sob Bioaugmentação ao longo de 60 dias de incubação.....	88
Figura 34: Contagem de degradadores e de heterotróficos pelo NMP em solo arenoso sob Atenuação Natural.....	90
Figura 35: Contagem de degradadores e de heterotróficos pelo NMP em solo argiloso sob Atenuação Natural.....	90
Figura 36: Contagem de degradadores e de heterotróficos pelo NMP em solo arenoso sob Bioaugmentação.....	91
Figura 37: Contagem de degradadores e de heterotróficos pelo NMP em solo argiloso sob Bioaugmentação.....	91
Figura 38: Adição de solução de HCl ou NaOH 1M (mL) em 25 mL de meio mineral MM1 (Richard & Vogel, 1999).....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo
<b>ARE</b>	Arenoso
<b>ARG</b>	Argiloso
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>C: N: P</b>	Relação Carbono, Nitrogênio e Fósforo
<b>CMC</b>	Concentração Micelar Crítica
<b>CTC</b>	Capacidade de Troca Catiônica
<b>DCPIP</b>	2,6 diclorofenol indofenol
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>FAD</b>	Flavina Adenina Dinucleotídeo
<b>FEPAM</b>	Fundação Estadual de Proteção Ambiental
<b>IE<sub>24</sub></b>	Índice de Emulsificação após 24 h
<b>m<sup>3</sup></b>	Metro Cúbico
<b>mN.m<sup>-1</sup></b>	miliNewton por metro
<b>NAD</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
<b>nm</b>	nanômetro
<b>NMP</b>	Número Mais Provável
<b>r.p.m.</b>	rotações por minuto
<b>TPF</b>	Trifenilformazan
<b>TPH</b>	Total Petroleum Hydrocarbon
<b>TTC</b>	2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>W</b>	Watt

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes energéticas alternativas tem sido estimulada, devido à preocupação em diminuir os índices elevados de poluição e a dependência de combustíveis fósseis. Por esse motivo, vem sendo explorada cada vez mais a utilização de biocombustíveis, como o biodiesel cujas fontes são renováveis, podendo, desse modo, ser produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais. Esses substratos, por sua vez, são transformados em ésteres de cadeia longa por diferentes processos de esterificação ou por transesterificação (Fukuda et al., 2001; Ramandhas et al., 2005). Segundo a Lei 11097/2005, a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira foi autorizada e começou a ser comercializada em 2006. No entanto, somente em 2008, a mistura diesel/biodiesel foi tomada como obrigatória, sendo comercializado primeiramente o B2. Dependendo da percentagem de participação do biodiesel na mistura diesel/biodiesel, é dado o nome de B2 quando possui 2% de biodiesel; B5, 5% até chegar ao B100, que é o biodiesel puro (Silva & Freitas, 2008). No Brasil, já vem sendo adicionado 5% desse biocombustível ao diesel desde 2010.

O biodiesel traz algumas vantagens em relação aos combustíveis derivados do petróleo, pois apresenta alto potencial de biodegradabilidade,



devido à presença de cadeias de ácidos graxos com átomos de oxigênio altamente suscetíveis à oxidação, à ausência de hidrocarbonetos aromáticos e de enxofre na composição. Além disso, é atribuída ao biodiesel baixa toxicidade, em vista da redução relativa de emissões de CO, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e material particulado na atmosfera, contribuindo para a redução do efeito estufa (Bento et al., 2006; De Mello, 2007; Lermontov & Ushakova, 2008; Atadashi et al., 2010; Chao et al., 2010). A adição de biodiesel ao diesel pode promover efeitos sinérgicos, contribuindo para o aumento da biodegradabilidade de hidrocarbonetos à medida que a sua concentração é aumentada na mistura, devido ao fenômeno do cometabolismo (Zhang et al., 1998; Mudge & Pereira, 1999; Pasqualino et al., 2006), sendo que, em alguns estudos, foi relatado que a biodegradabilidade do biodiesel pode ser até cinco vezes mais rápida do que o diesel, inclusive em solos (Demirbas, 2008; Ferella et al., 2010).

Considerando a biodegradação da mistura diesel/biodiesel, vem sendo explorado um grupo de enzimas, como lipases, esterases e oxigenases, além de outras moléculas como biossurfactantes e bioemulsificantes, visto que são responsáveis, direta ou indiretamente, pela oxidação de cadeias metil ésteres de ácidos graxos e de hidrocarbonetos, sendo estes transformados em ácidos graxos e incorporados à célula por processos de  $\beta$ -oxidação (Amouric et al., 2010). No entanto, ainda muito pouco é sabido sobre como se dá a biodegradação das frações de diesel/biodiesel no solo, devido ao fato de essa nova mistura de combustível ter sido inserida recentemente na matriz energética mundial. Nessa mesma velocidade, vem se trabalhando em inúmeras pesquisas para desvendar o comportamento dessa mistura no solo,

uma vez que vazamentos e derrames acidentais durante o refino, o transporte e, principalmente, durante estocagem ainda são uma problemática constante.

Com o intuito de mitigar as ocorrências de contaminação de combustíveis dessa natureza no solo, vem se utilizando cada vez mais estratégias de remediação para descontaminar ambientes impactados. Dentre elas, a biorremediação utiliza a competência fisiológica de micro-organismos com potencial degradador (nativos ou introduzidos), associada, muitas vezes, à adição de nutrientes, principalmente o Nitrogênio e o Fósforo, no local contaminado, sendo considerada, dessa forma, uma alternativa de baixo custo-benefício e ambientalmente aceitável (Jacques et al., 2007). Em contrapartida, mesmo dispondo de uma microbiota competente, existem inúmeros fatores abióticos limitantes para que a biodegradação das misturas de diesel/biodiesel ocorra com sucesso. Fatores como água, oxigênio, nutrientes e pH podem ser decisivos para o estabelecimento estrutural das comunidades microbianas. A biodisponibilidade é um fator limitante, uma vez que depende da natureza físico-química do contaminante, da sua concentração, do seu tempo de permanência e das propriedades intrínsecas de cada solo, além do caráter hidrofóbico da célula degradadora. As características e o conteúdo de matéria orgânica e da argila poderão influenciar diretamente na capacidade de o contaminante sofrer sorção às partículas do solo, tornando-o menos disponível para a célula, principalmente aqueles de natureza apolar, como o diesel e o biodiesel, sendo constituídos de hidrocarbonetos e ésteres, respectivamente.

Diante desse contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a biodegradação das misturas de diesel/biodiesel (B0, B20 e B100) em dois tipos

de solo – um argiloso e outro arenoso – sob duas estratégias de biorremediação (atenuação natural e bioaugmentação), simulando um derrame superficial desses combustíveis.

Os principais objetivos específicos foram 1) selecionar bactérias de fontes de contaminação com potencial degradador para as misturas de diesel/biodiesel; 2) comparar o comportamento das comunidades microbianas nos diferentes solos para as diferentes concentrações de biodiesel nas mistura diesel/biodiesel e 3) verificar se houve um incremento da biodegradação nos solos a partir da estratégia de bioaugmentação ao adicionar os nutrientes e o consórcio bacteriano em comparação à atenuação natural.

A bioaugmentação recebeu adição de um consórcio bacteriano previamente selecionado, além da adição de nutrientes, a fim de comparar o seu potencial de biodegradabilidade com o da atenuação natural. Os quatro isolados que compuseram o consórcio bacteriano potencialmente biodegradador dessas misturas foram selecionados a partir dos melhores resultados para a produção de enzimas livres (alcano hidroxilase, C1,2O, C2,3O, P3,4O, esterase e lipase), de biossurfactantes (baixa/alta massa molecular), de metabólitos, de proteínas totais, além da avaliação da hidrofobicidade celular.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Cadeia produtiva, principais fontes de contaminação por combustíveis e legislação vigente**

Apenas no ano de 2008, o Brasil consumiu 1,8 milhão de barris de petróleo por dia (2,3% do total mundial), ocupando a 12ª posição entre os consumidores mundiais. Dentre os derivados energéticos do petróleo, foram produzidos 41 milhões de m<sup>3</sup> de óleo diesel, representando 44,3% da matriz energética para o mesmo ano em detrimento da produção de biodiesel puro (B100) que foi cerca de 3,3 milhões de m<sup>3</sup>. Até o final de 2008, operavam no país 36730 postos de abastecimento de combustíveis (ANP, 2009). Para o mesmo período, somente no município de Porto Alegre, RS, existiam 318 postos com cerca de 1600 tanques subterrâneos. Deles, 90% localizam-se em postos de abastecimento, sendo os demais situados em empresas de ônibus, transportadoras e clubes. Tendo em vista a grande cadeia de produção desses combustíveis na matriz energética, a probabilidade de vazamentos e de derrames durante o refino, o transporte, o armazenamento e a manipulação ainda é elevada.

Segundo um histórico de acidentes relacionados ao transporte de cargas perigosas no estado do Rio Grande do Sul, foram registrados, pela FEPAM, no período de 1994 a maio/2010, 475 acidentes com produtos químicos das mais diversas origens. Aproximadamente 25% desse montante estavam relacionados ao derramamento de combustíveis tanto derivados do petróleo quanto de origem renovável, como o biodiesel, apresentando maior prevalência de acidentes ocasionados por derrame de óleo diesel (Figura 1). Dentro desse histórico, aproximadamente 90% dos acidentes ocorreram em rodovias ou ferrovias, sendo o solo, portanto, o compartimento ambiental mais impactado.

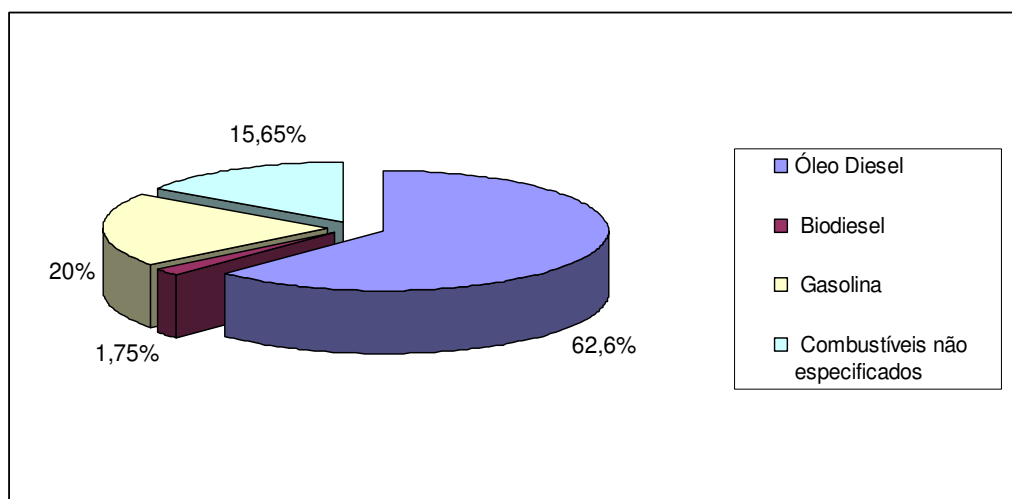


Figura 1: Relação de acidentes ao transportar combustíveis derivados do petróleo/biodiesel.

Fonte: FEPAM, 2010.

Durante o armazenamento das misturas de diesel/biodiesel, a maioria dos tanques subterrâneos apresenta problemas de corrosão e vazamentos nos primeiros 20 anos após a instalação, sendo que 50% dos vazamentos ocorrem antes de os tanques atingirem 15 anos de uso. Além

disso, é provável que ocorra problemas nas instalações das tubulações, principalmente nos 10 primeiros anos (ATLAS AMBIENTAL, 2006). Diante da fragilidade das instalações, dos locais de armazenamento e do manuseio de combustíveis, oficinas mecânicas, retíficas, transportadoras, empresas de ônibus e, sobretudo, postos de serviço e de lavagem são fontes de contaminação em potencial para solos e águas subterrâneas. Segundo monitoramento realizado no estado de São Paulo, do total de 2904 registros de sítios com algum histórico de contaminação, atribui-se aos postos de combustíveis a responsabilidade de gerar 79% dos locais impactados (Figura 2).

**Distribuição por atividade - novembro de 2009**

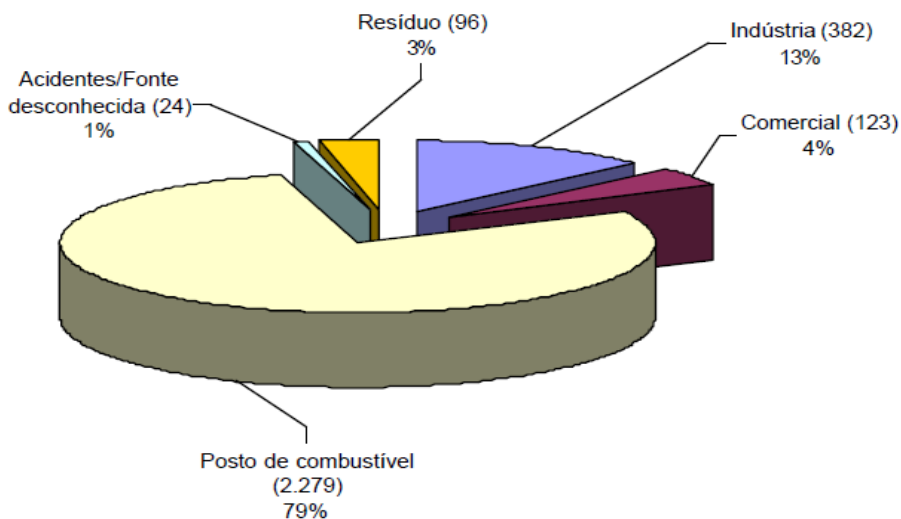


Figura 2: Registros de Áreas Contaminadas para o estado de São Paulo (CETESB, 2011).

De acordo com registros de contaminação por combustíveis, oriundos principalmente em decorrência de vazamentos em tanques

subterrâneos, vem se mostrando uma nítida preocupação, a fim de mitigar os danos causados ao ambiente, uma vez que grande parte dos postos de abastecimentos está localizada em grandes aglomerados urbanos, comprometendo a qualidade dos solos e das águas superficiais e subterrâneas. Diante desse contexto, vem se obtendo maior controle dessa situação, a partir de uma fiscalização mais permanente, devido à criação de novas leis, resoluções e decretos municipais. Em 1996, no município de Porto Alegre, foi sancionado o Decreto Municipal nº 11423/96 o qual instituiu a obrigatoriedade do licenciamento de novos postos de abastecimento e de outras empresas que utilizassem tanques subterrâneos de combustíveis, a fim de prevenir acidentes, sendo o empreendimento liberado para instalação somente após algumas exigências, dentre elas: (a) caracterização do solo e subsolo, (b) descrição do comportamento hidrológico do entorno do empreendimento, (d) discriminação dos equipamentos de monitoramento para detecção de vazamentos, (e) utilização de tanques atmosféricos subterrâneos de parede dupla e de tubulações flexíveis e encamisadas e (f) instalação de caixa separadora óleo/água. Anos depois, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu a Resolução nº 273 de novembro 2000, que estipula a obrigatoriedade do licenciamento ambiental para os empreendimentos que integram o setor de combustível em todo o território nacional, considerando que toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados do petróleo e outros combustíveis se configuram como empreendimentos potencial ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais.

## **2.2 Óleo diesel e biodiesel: composição química, toxicidade e exposição**

O biodiesel, definido como monoalquil (metil ou etil) éster de ácidos graxos de cadeia longa ( $C_{16} - C_{18}$ ), é produzido a partir de fontes renováveis de energia, como os óleos vegetais ou gorduras animais. No entanto, o biodiesel não é constituído por apenas esse tipo de composto. Após ocorrer a transesterificação, processo mais utilizado para a produção comercial do biodiesel, são gerados outros subprodutos em menores proporções, como mono, di e triglicerídeos, além da glicerina (Fangrui & Milford, 1999; Atadashi, et al., 2010). É dada grande atenção a esse último subproduto, uma vez 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. Estudos comprovam que o produto da combustão da glicerina em veículos automotores libera para atmosfera uma substância denominada acroleína, um aldeído insaturado, que apresenta alto potencial citotóxico e carcinogênico, por ser uma molécula bastante reativa, além de altamente inflamável (Beauchamp et al., 1985).

O óleo diesel, por sua vez, produto da destilação fracionada do petróleo, apresenta em sua composição principalmente hidrocarbonetos alifáticos de cadeia simples, não-ramificados, variando de  $C_9 - C_{28}$ . Na mistura, são encontrados também altos teores de enxofre, variando de 0,1 a 0,5%, além de produtos da combustão, como  $CO$ ,  $NO_x$ ,  $SO_x$ , material particulado, aldeídos, benzeno, cianetos, tolueno, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos,



sendo estes bastante perniciosos aos ecossistemas e à biota neles presente (ANP, 2009).

A toxicidade do contaminante para um organismo é definida pela sua composição química, sua concentração no ambiente, o período de contato, as condições ambientais gerais e a condição fisiológica da biota (Hatfiel & Stewart, 1994). Produtos oleosos, como o diesel, em pequenas quantidades no solo, podem provocar um aumento na população de micro-organismos, uma vez que hidrocarbonetos podem ser utilizados como fonte de carbono. No entanto, em altos níveis, o número de micro-organismos pode diminuir, alterando a composição das comunidades e, conseqüentemente, dos processos microbianos, como a atividade enzimática. Em contrapartida, mesmo em quantidades e concentrações elevadas de biodiesel no solo, tem se observado, inclusive, um aumento na atividade microbiana de um modo geral (Lapinskiene et al., 2006).

### **2.3 Aspectos fisiológicos da degradação**

Considerando a porção diesel da mistura, as oxigenases desempenham um papel significativo nas rotas do catabolismo de hidrocarbonetos em condições aeróbicas. Essas enzimas pertencem a dois subgrupos: as monoxigenases e as dioxigenases. Nas primeiras, uma classe de enzimas conhecidas como alceno hidroxilases catalisam a oxidação das cadeias mais lábeis dos hidrocarbonetos (alcenos). A oxidação por hidroxilação ocorre nas regiões terminais, subterminais ou biterminais de compostos

alifáticos lineares e ramificados, alicíclicos, alquil-cicloalcanos ou terpenos (van Beilen & Witholt, 2004; van Beilen & Funhoff, 2005; Funhoff & van Beilen, 2006) (Figura 3), atuando preferencialmente na clivagem das ligações C-H (van Beilen & Funhoff, 2007) e sendo, portanto, a molécula oxidada, primeiramente, a um álcool, depois a um aldeído e, finalmente, a um ácido graxo (Mercedes et al., 2001; Belhaj et al., 2002). Os alcanos sofrem a ação de um átomo de oxigênio, sendo incorporado à molécula, e o segundo átomo é reduzido à água por um agente redutor cuja presença é essencial para a reação enzimática, sendo as cadeias C<sub>12</sub> a C<sub>18</sub> ou maiores facilmente atacadas por uma ampla variedade de bactérias. Contudo, a degradação de cadeias menores como pentanos, hexanos, heptanos e octanos, os quais são tóxicos aos ecossistemas, é menos frequente (Leahy & Colwell, 1990; Tani et al., 2001). Além disso, as alcano hidroxilases podem ser divididas em dois grandes grupos: as AH1, que oxidam as cadeias relativamente curtas a médias de alcanos, enquanto que a maioria das enzimas AlkB, pertencentes ao grupo AH2, oxida cadeias longas (van Beilen, et al., 2007; Amouric et al., 2010).

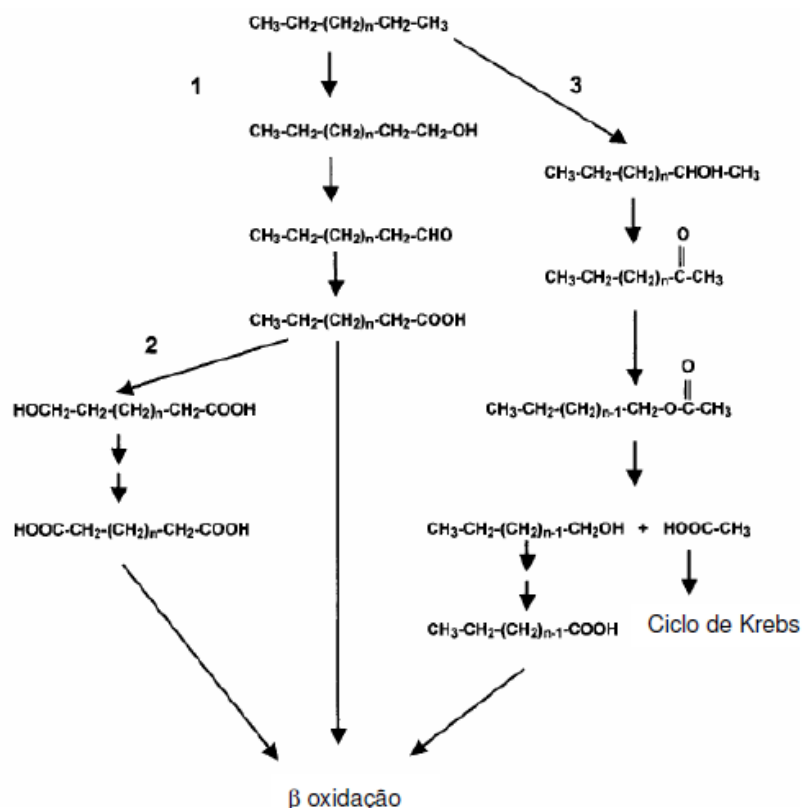


Figura 3: Rotas da degradação de alcanos por oxidação terminal, subterminal e biterminal. 1) A oxidação terminal conduz à formação de ácidos graxos pela rota de  $\beta$ -oxidação; 2) Alternativamente, uma alcano hidroxilase pode atuar por processo de  $\omega$ -oxidação, transformando intermediários a ácidos dicarboxílicos e 3) Por fim, a oxidação subterminal gera um álcool secundário, sendo este oxidado a cetonas. Estas, por sua vez, com auxílio de esterases, acabam sendo metabolizadas por  $\beta$ -oxidação (modificado de Berthe-Corti & Fetzner, 2002; van Beilen et al., 2003).

Muitos micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos crescem em uma ampla variedade de alcanos, uma vez que apresentam, da mesma forma, múltiplas alcano hidroxilases. A maioria dessas enzimas parece estar associada ao complexo de enzimas do citocromo P450 (van Beilen &

Funhoff, 2007). A primeira alcano hidroxilase ligada à membrana foi descoberta em *Pseudomonas putida*. Estudos bioquímicos revelaram que essas alcano hidroxilases consistem em uma membrana integral, uma ou duas rubredoxinas e uma rubredoxina redutase. Durante a degradação de alcanos por microorganismos, a rubredoxina, por sua vez, transfere elétrons do NADH, via cofator FAD à rubredoxina, a qual transfere elétrons à alcano hidroxilase (van Beilen et al., 2003) (Figura 4).

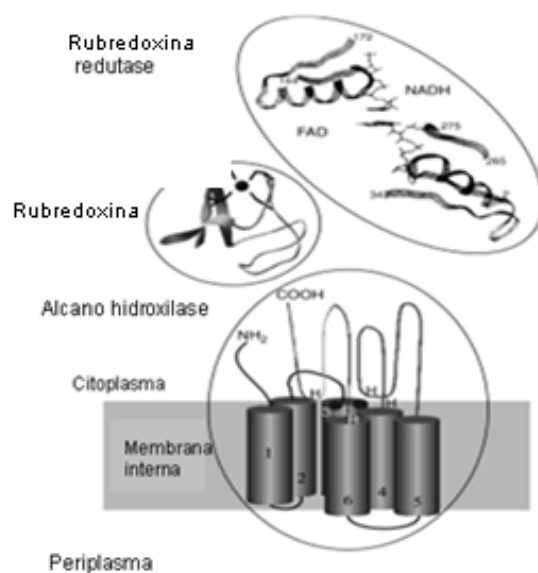


Figura 4: Estrutura do sistema alcano hidroxilase (Modificado de van Beilen et al., 2003)

Por sua vez, as dioxigenases são enzimas presentes em microorganismos, responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos, os quais são transformados pela inserção de dois átomos de oxigênio à molécula (Figura 5).

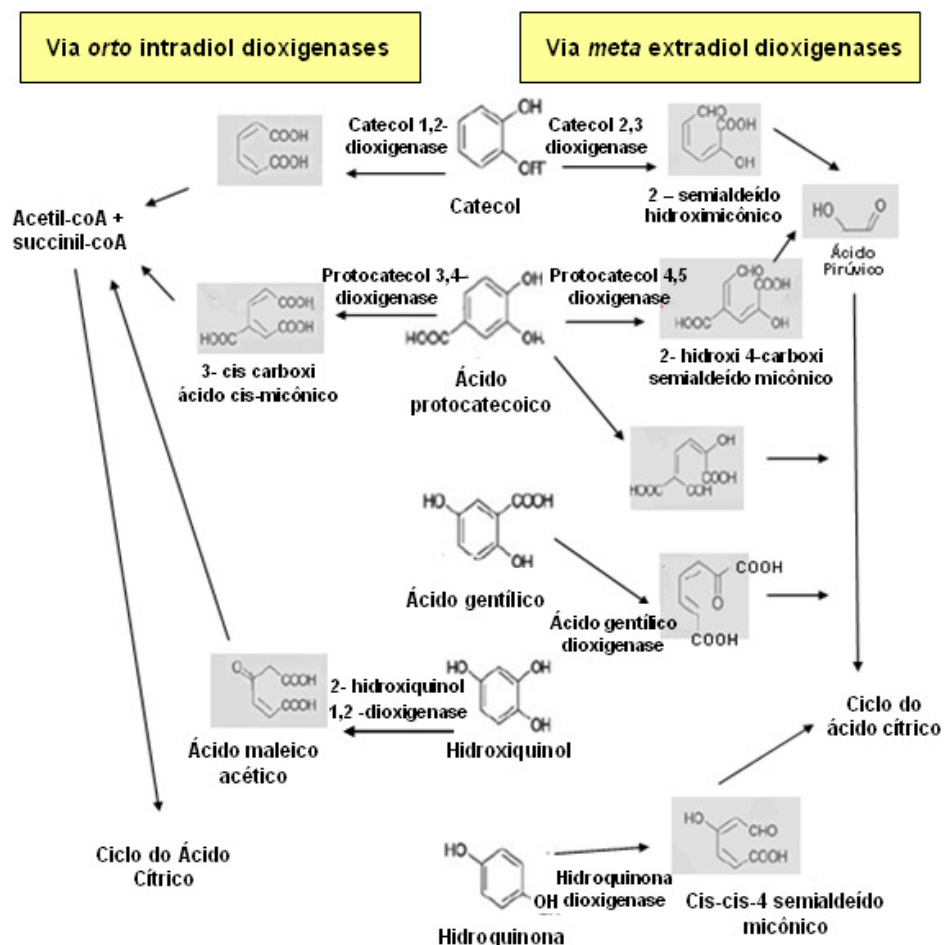


Figura 5: Rota metabólica de degradação de compostos aromáticos por dioxigenases (modificado de Dagley, 1986)

Essas enzimas podem ser divididas em dois grandes grupos: as periféricas e as de fissão. As primeiras participam inicialmente dos processos de inserção dos átomos de oxigênio à molécula, de hidroxilação do anel de ressonância e de rearomatização geral desses compostos, sendo estes oxidados a um número bastante limitado de intermediários centrais, como catecóis, galatos, protocatecóis e gentisatos (Harayama & Timmis, 1989) (Figura 5).

Estes, por sua vez, são reconhecidos e convertidos em moléculas degradáveis pelo segundo grupo de enzimas, as de fissão. (Mishra et al., 2001). As enzimas de fissão são responsáveis pela abertura do anel aromático que pode ocorrer de duas formas: 1) clivagem na posição *meta* entre radicais hidroxil e um átomo de carbono adjacente (extradiol dioxigenases); 2) clivagem na posição *orto* entre dois radicais hidroxil (intradiol dioxigenases) (Nozaki et al., 1970). Logo, as enzimas 1,2-Catecol Dioxigenases (C1,2O), 3,4-Protocatecol Dioxigenases (P3,4O) fazem parte do grupo das intradiol e as 2,3-Catecol Dioxigenases (C2,3O) representam as enzimas extradiol (Figura 6). Uma vez clivados, os compostos aromáticos são transformados em intermediários das rotas comuns do metabolismo microbiano, via ciclo do ácido cítrico (Bamforth & Singleton, 2005).

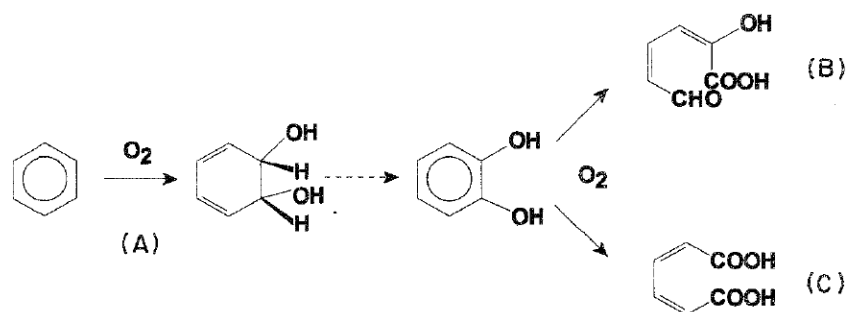


Figura 6: Degradação de hidrocarbonetos aromáticos por micro-organismos: (A) Hidroxilação de Dioxigenases (enzimas periféricas); Clivagem de intermediários centrais por diferentes dioxigenases (enzimas de fissão): (B) clivagem na porção *meta* por extradióis; (C) clivagem na posição *orto* por intradióis (Bertini et al., 1995).

Dada a degradação do biodiesel, enzimas extracelulares como lipases e esterases têm o potencial de hidrolisar ligações de éster, atuando em uma variedade de xenobióticos de origem lipídica (Boczar et al., 2001),

resultando, assim, em álcoois e ácidos graxos como produto da oxidação. O mecanismo de hidrólise a partir de uma lipase ou esterase é composto por quatro etapas principais. Primeiro, o substrato se liga a uma serina ativa da enzima; em segundo lugar, um álcool é liberado e um complexo acetil-enzima é formado. Em seguida, há um ataque de uma forma nucleofílica (água em hidrólise, álcool ou éster), transformando-se em um intermediário tetraédrico. Por último, este intermediário é convertido em produto (um ácido ou um éster), e a enzima se desprende do substrato, tornando-se livre novamente (Bornscheuer, 2002) (Figura 7).

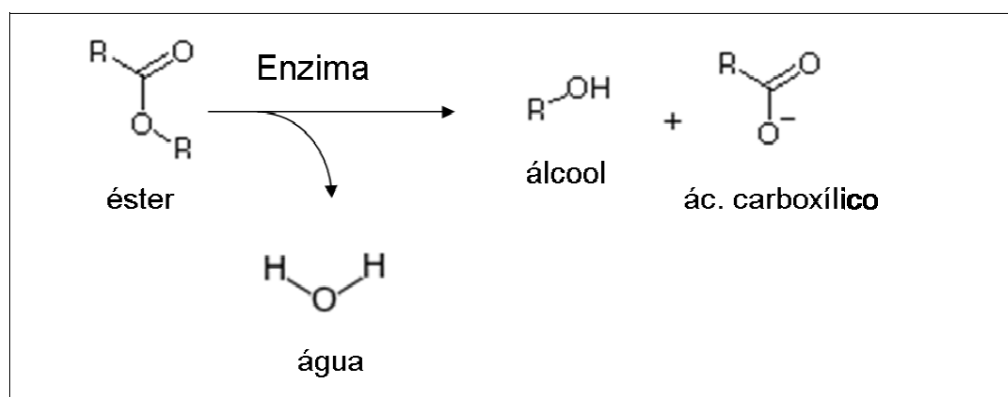


Figura 7: Hidrólise de um éster catalisado por lipases ou esterases (Santos, 2009).

Esterases e lipases pertencem a uma ampla família de enzimas denominadas de carboxilesterases. Entretanto, a diferenciação entre elas não é simples. Enquanto que as lipases atuam preferencialmente na degradação de ácidos graxos de cadeia longa, as esterases hidrolisam ésteres simples e triglicérides com cadeias relativamente mais curtas de, no máximo,  $\text{C}_6$ . Além disso, se por um lado, as esterases obedecem à cinética clássica de Michaelis-Menten e atuam em substratos somente solúveis em água; as lipases, ao

contrário, estão ativas em soluções hidrofóbicas saturadas e apresentam sua atividade drasticamente aumentada no momento em que começam a entrar em contato com uma concentração mínima desses substratos, sendo estes organizados em micelas ou em gotas de emulsão (Figura 8). Esse abrupto aumento na atividade enzimática é decorrente do fenômeno da ativação interfacial, ocorrendo apenas em lipases. Para que isso ocorra, a estrutura conformacional dessas enzimas que está relacionada a esse fenômeno é denominada de motivo *lid*. Esse domínio hidrofóbico recobre o sítio catalítico da enzima em concentrações abaixo do limiar de ação. No instante em que a concentração do substrato (triglicerídeos) aumenta, a estrutura *lid* muda de conformação e disponibiliza o sítio ativo da enzima para entrar em contato com o substrato, atuando na hidrólise deste (Jaeger et al., 1994; Tesch et al., 1996; Bornscheuer, 2002, Reis et al., 2009).

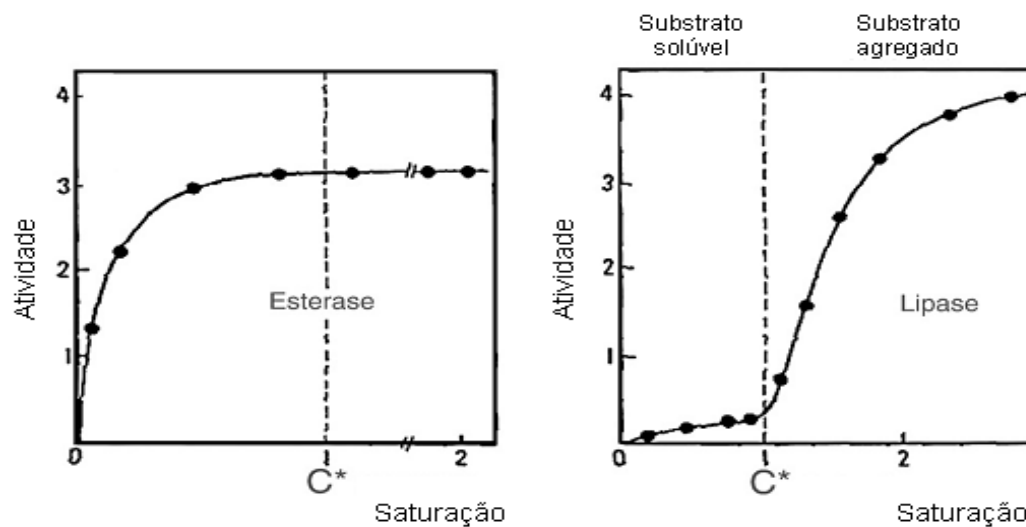


Figura 8: Hidrólise de triacetina por lipases e esterases pancreáticas de acordo com a função da concentração do substrato (Modificado de Hasan et al., 2006).



Sob condições aeróbicas, o potencial de oxidação de compostos orgânicos pode ser determinado pela capacidade de uma dada comunidade microbiana em produzir um grupo de enzimas designadas de desidrogenases. Essas enzimas apresentam alta afinidade por carreadores de elétrons como a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), permanecendo ligadas a ela (Alef, 1996). Além disso, a atividade de desidrogenases representa um fluxo intracelular de elétrons ao acceptor final como o  $O_2$ . Isso reflete a atividade de muitas dessas enzimas estarem envolvidas no catabolismo de xenobióticos de origem orgânica, sendo estes utilizados como fonte de carbono e energia pelas células, devido à transferência de prótons e elétrons até às lançadeiras de elétrons, como a ubiquinona e o citocromo b, por exemplo (Nannipieri et al., 1990). Lenhard (1956) introduziu, pela primeira vez, a técnica que envolve a incubação do solo com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) que é reduzido a trifenilformazan (TPF), sofrendo mudança de coloração de incolor a róseo em solução como parâmetro para determinar a atividade metabólica de micro-organismos presentes no solo e em outros ambientes (Stevenson, 1956; Casida, 1964). Embora nem todos os micro-organismos utilizem o TTC como um carreador artificial de elétrons no seu metabolismo, ele tem se mostrado uma ferramenta bastante sensível, visto que possui alta capacidade por competir com outros transportadores de elétrons da cadeia respiratória, como o  $NAD^+$  e o  $NADP^+$ , demonstrando resultados bastante fidedignos para atividade enzimática (Siedler, 1991). Dessa forma, como um grande grupo de desidrogenases tem alta afinidade pelo TTC, esse carreador artificial atua como um marcador metabólico adaptado com o intuito de avaliar tanto a

atividade dessas enzimas cuja presença e intensidade contribuem para determinação da qualidade dos solos, assim como parâmetro para caracterizar a presença e a quantidade de micro-organismos com potencial degradador de fontes de contaminação por misturas de diesel/biodiesel nesses mesmos ambientes.

#### **2.4 Produção de Biossurfactantes**

Inúmeros micro-organismos são potencialmente degradadores de compostos orgânicos hidrofóbicos, como os hidrocarbonetos e os ésteres. No entanto, a baixa biodisponibilidade desses contaminantes, sobretudo em solos, resulta em um fator limitante que interfere no processo de biorremediação. Por outro lado, o contato direto entre a célula e o contaminante hidrofóbico tem sido relatado em inúmeros estudos, e a hidrofobicidade da superfície celular foi reconhecida como um fator responsável por facilitar a adesão das interfaces água – composto orgânico apolar (van Loosdrecht et al., 1987; Watkinson & Morgan, 1990), havendo uma forte correlação entre a hidrofobicidade celular e a biorremediação de hidrocarbonetos (Obuekwe et al., 2009). Dessa forma, a maioria dos micro-organismos degradadores apresenta compostos ativos de superfície, conhecidos como biossurfactantes, facilitando, de certa forma, a solubilidade relativa do contaminante em meio aquoso e o seu subsequente transporte para dentro da célula microbiana, a fim de este ser catabolizado (Pijanowska et al., 2007).

Os biossurfactantes são moléculas orgânicas de caráter anfipático (uma porção polar e outra apolar), cujas moléculas podem ser estruturalmente diversas (glicolipídios, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos). Em termos de localização celular, esses compostos podem ser encontrados intracelularmente, permanecendo ligados à superfície celular ou, ainda, serem conduzidos para o meio extracelular (Ruggeri et al, 2009). Além disso, eles podem ser divididos em duas grandes categorias em função da massa molecular: 1) os surfactantes de baixa massa molecular, que apresentam a propriedade de diminuir a tensão superficial/interfacial quando presentes em meio aquoso, por apresentarem uma estrutura anfipática que os posiciona na interface água/óleo (Desai & Banat, 1997; Maier, 2003) e 2) os de alta massa molecular, denominados de bioemulsificantes, que são responsáveis pela formação de gotículas e pela estabilidade da emulsão (fase aquosa/fase oleosa), aumentando, assim, a solubilidade do contaminante com a fase aquosa. Assim, esses fenômenos possivelmente contribuem para o aumento da biodegradabilidade das misturas de diesel/biodiesel.

De acordo com a Figura 9, a produção de biossurfactantes liberados na fase aquosa tende a saturar todas as interfaces (situação C), de modo que, a partir de uma concentração denominada Concentração Micelar Crítica (CMC), é observada a completa saturação do meio e a formação de micelas (situação D).

Embora a tensão superficial seja estabilizada após atingir a CMC, é observado um aumento significativo na solubilidade aparente dos compostos

orgânicos hidrofóbicos, à medida que é aumentada a concentração do biossurfactante em solução após esse mesmo período.

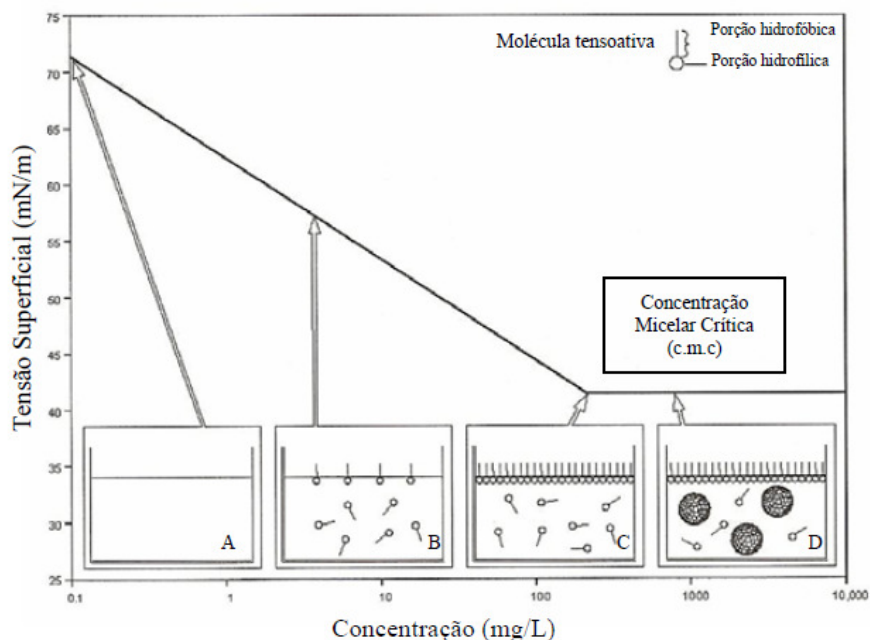


Figura 9: Comportamento da concentração de um biossurfactante em solução aquosa *versus* tensão superficial (Santos et al., 2007).

A biodisponibilidade de contaminantes orgânicos hidrofóbicos, na presença de biossurfactantes, pode ser aumentada em solos, devido a três principais mecanismos: 1) Emulsificação da fase líquida não aquosa, aumentando a área de contato entre o contaminante e a célula; 2) Aumento da solubilidade aparente do contaminante, onde os hidrocarbonetos são dissolvidos principalmente no núcleo das micelas e 3) Transporte facilitado do contaminante, devido à diminuição da tensão superficial entre o meio aquoso e as partículas do solo. Na Figura 10, é mostrada a interação entre microorganismos, solo, contaminante orgânico e biossurfactantes (Deitsch & Smith, 1995; Yeom et al., 1996; Volkering et al., 1998).

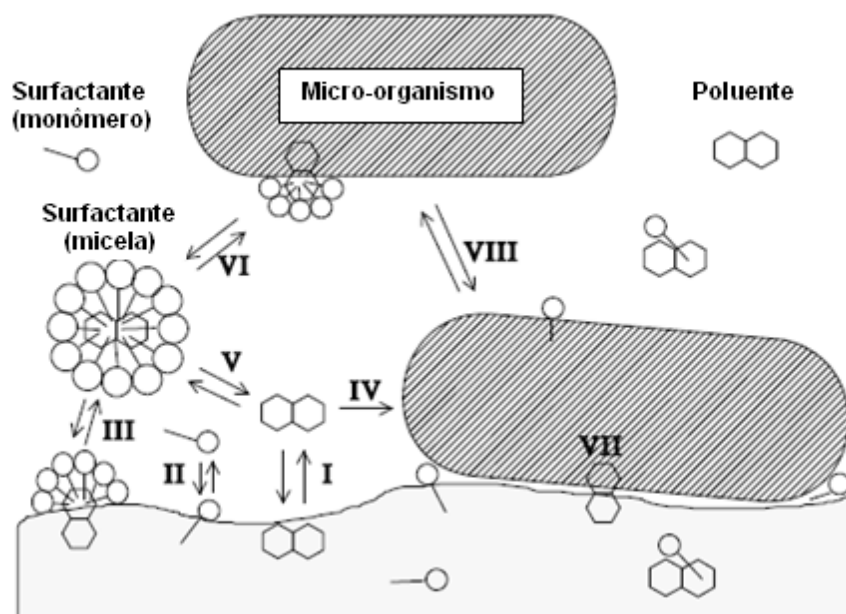


Figura 10: Esquema global das interações entre micro-organismos, solo, contaminante e biossurfactantes. I – sorção do contaminante; II – sorção das moléculas de biossurfactantes no solo; III – solubilização do contaminante; IV – transporte do contaminante da fase aquosa aos micro-organismos; V – transição do contaminante entre a fase aquosa e a micela; VI – sorção das micelas por micro-organismos; VII – transporte direto do contaminante da fase sólida por micro-organismos; VIII – sorção de micro-organismos no solo (Volkering et al., 1998).

## 2.5 Biorremediação de solos contaminados por combustíveis

Uma consequência da industrialização é a possibilidade de geração e de liberação de resíduos de produtos tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e/ou teratogênicos no ecossistema. Embora muitos desses resíduos sejam liberados na atmosfera e na hidrosfera, uma boa parte do descarte em solos, seja intencional seja acidentalmente, contribui para a contaminação direta da

superfície desse compartimento e dos aquíferos subterrâneos (White & Claxton, 2004; Silva-Junior & Vargas, 2007). Diante disso, existe uma preocupação cada vez mais crescente da sociedade em relação ao aumento de áreas contaminadas por xenobióticos, exigindo das autoridades mais soluções para os problemas ambientais atualmente enfrentados. Tal fato se confirma com a preocupação em controlar e monitorar áreas contaminadas, como vem sendo realizado no estado de São Paulo pela CETESB. Além disso, é observado um aumento na fiscalização, a fim de coibir acidentes ambientais, uma vez que os responsáveis vêm sendo punidos com mais rigor em relação a anos anteriores. Os órgãos ambientais responsáveis vêm sendo munidos de uma nova legislação ambiental mais sólida e específica, como a Resolução n° 420 do CONAMA e a Lei 13577 de 2009 do estado de São Paulo, que ditam sobre as diretrizes e procedimentos para a proteção do solo e gerenciamento de áreas contaminadas, tendo como referência a Lista Holandesa e a da CETESB. Além disso, no estado do Rio Grande do Sul, foi sancionada a Portaria n° 016 de abril de 2010 pelo órgão ambiental responsável, FEPAM, que dispõe sobre o controle da disposição final de resíduos Classe I com características de inflamabilidade do solo em sistemas de destinação final de resíduos denominados “aterros de resíduos classe I” e “central de recebimento e destinação de resíduos classe I”. A criação dessa Portaria representa um marco em relação à legislação ambiental do estado do Rio Grande do Sul, uma vez que apenas permite o recebimento de solos nesses locais, caso apresentem níveis aceitáveis de contaminação, estimulando a prestação de

serviços no campo da remediação pela iniciativa privada, com o objetivo de recuperar áreas impactadas por contaminantes.

Dessa forma, várias estratégias de remediação vêm sendo implantadas e desenvolvidas no Brasil e principalmente nos países desenvolvidos, a fim de tentar descontaminar inúmeros sítios impactados, sobretudo, por derivados do petróleo. Sendo assim, técnicas físicas, químicas e biológicas podem ser utilizadas em conjunto, com a finalidade de tentar reduzir a contaminação de compostos orgânicos em níveis de segurança aceitáveis, de acordo com a legislação vigente de cada país (Reddy et al., 1999). No entanto, embora muitas técnicas estejam disponíveis para o tratamento de áreas contaminadas, a seleção delas depende 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). Por esse motivo, a escolha de técnicas de remediação eficientes é demasiado difícil, no entanto primordial para o sucesso da descontaminação de uma determinada área impactada (Khan et al., 2004).

Processos de remediação têm sido classificados em três categorias: (1) *in situ*, (2) *ad situ* e (3) *ex situ*. Na primeira, a descontaminação é realizada no próprio local impactado, barateando os custos. Na segunda, os resíduos de solo são levados a um local ao lado da área impactada e finalmente, na terceira categoria, ocorre o transporte do resíduo até um local adequado para remediação, distante da fonte poluidora (Zhang et al., 2000). Geralmente, os casos 2 e 3 estão relacionados com altas concentrações de contaminantes

recalcitrantes, necessitando de estratégias mais eficientes de recuperação desses resíduos (Mohan et al., 2006).

De acordo com a CETESB (2011), inúmeros processos físicos, químicos e biológicos têm sido utilizados para descontaminação de 1275 áreas impactadas no estado de São Paulo, como solos e águas subterrâneas, sendo a biorremediação ainda uma ferramenta pouco utilizada no Brasil (Figura 11).

**Constatações de técnicas de remediação implantadas - novembro de 2009**

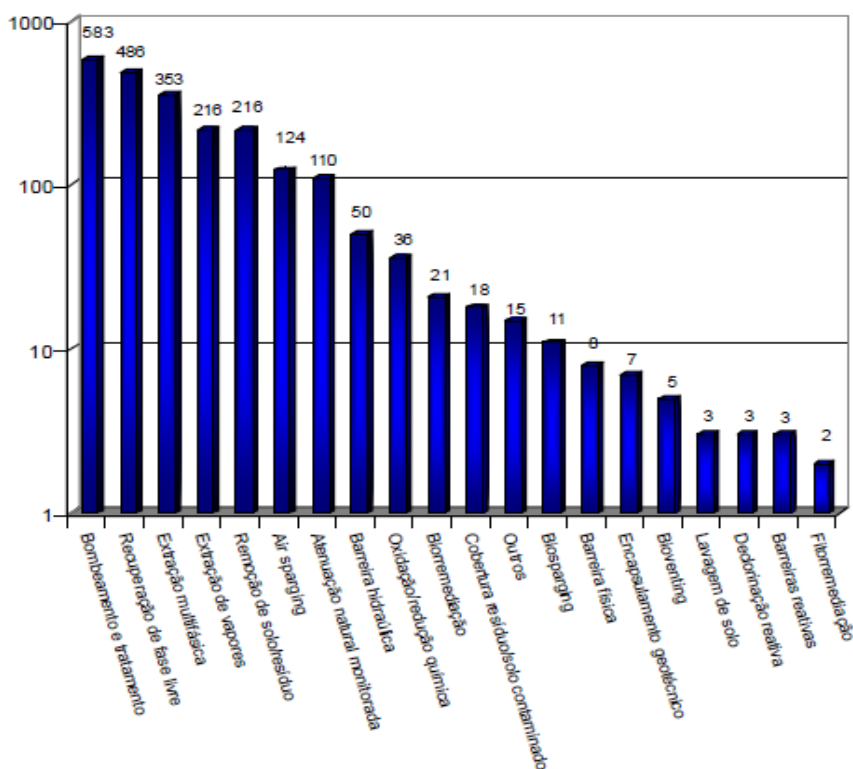


Figura 11: Relação de Técnicas de Remediação Implantadas no Estado de São Paulo (CETESB, 2011).

Por definição, a biorremediação é uma alternativa de descontaminação de áreas impactadas que oferece a possibilidade de degradar contaminantes tóxicos, utilizando principalmente micro-organismos,



como bactérias e fungos, com capacidade metabólica e fisiológica, a fim de obterem fonte de carbono e energia a partir de compostos orgânicos nocivos à saúde humana e aos ecossistemas (Atlas, 1981). Esse fenômeno ocorre, dado que micro-organismos degradadores são ubíquos na maioria dos ecossistemas onde contaminantes podem servir de fonte de carbono orgânico. Na maioria dos ambientes, a seleção e o enriquecimento das comunidades microbianas degradadoras autóctones acontecem assim que uma contaminação ocorre (Margesin & Schiner, 2001).

No campo da biorremediação, existem inúmeras estratégias para biodegradar o contaminante na presença de micro-organismos, dando destaque para algumas:

1) *Biosparging*: é uma técnica de biorremediação *in situ* na qual ocorre a injeção de ar na zona não saturada, a fim de fornecer oxigênio aos micro-organismos aeróbios para degradar os compostos orgânicos que estão dispostos na zona saturada das águas subterrâneas (Norris et al., 1994).

2) *Bioventing*: muito semelhante ao *Biosparging*, é uma técnica que também é utilizado o oxigênio para ativar a microbiota aeróbia presente em regiões subterrâneas para degradar compostos orgânicos adsorvidos no solo e em zonas não saturadas, com a diferença de que o fluxo de ar é fornecido em baixas taxas para impedir a volatilização de certos contaminantes (Kirtland & Aelion, 2000).

3) Biorreatores: é uma estratégia *ex situ* em que exige a remoção e transporte do solo contaminado para um local adequado. Além disso, como se constitui de um sistema fechado, apresenta maior controle das condições

bióticas e abióticas, podendo ser incrementado com adição de nutrientes, de inóculos microbianos potencialmente degradadores, de oxigênio e de umidade adequados. Geralmente, é misturado ao solo lodo ativado para acelerar as taxas de degradação, uma vez que é uma técnica bastante utilizada para descontaminar solos com altas concentrações de compostos orgânicos recalcitrantes (Khan et al., 2004).

4) *Landfarming*: é uma técnica de biorremediação que necessita de grandes extensões de solo, organizados em células e é bastante utilizada para reduzir a concentração de resíduos petroquímicos recalcitrantes das mais diversas fontes no solo por meio da ação de micro-organismos previamente selecionados, capazes de degradar xenobióticos de interesse. O sistema de operação reside em três etapas principais: 1) aplicação e mistura do resíduo no solo; 2) adição de corretivos e nutrientes no sistema e 3) revolvimento periódico para possibilitar aeração e homogeneidade da mistura, facilitando o contato entre a célula e o contaminante (Jacques, 2005). Além disso, é considerada uma técnica relativamente barata, mesmo tendo que apresentar um sistema de pré-tratamento de compostos voláteis, com o intuito de diminuir a poluição atmosférica (van Hamme, 2003; Khan et al., 2004).

5) Atenuação Natural ou Biorremediação Intrínseca: é uma estratégia de biorremediação *in situ* de baixo custo para solos e águas subterrâneas, na qual é utilizada a microbiota do próprio local para realizar a biorremediação. Essa estratégia pode-se resumir em três eventos básicos: 1) ocorrência de biotransformação dos contaminantes por populações microbianas indígenas; 2) sorção do contaminante com a matriz ou fases minerais que tornam o

composto menos biodisponível e, por conseguinte, menos tóxico aos ecossistemas e 3) perda da toxicidade por diluição ou volatilização (Frankenberger & Karlson, 1991). Dessa forma, todos os fatores bióticos e abióticos do sistema são responsáveis pelo sucesso da biodegradação, podendo reduzir, assim, a mobilidade, a massa e os riscos do contaminante no sítio impactado (Hinchee et al., 1995).

**Bioestimulação:** essa estratégia é semelhante à Atenuação Natural. A diferença é que são adicionados ao sistema alguns principais macronutrientes, como N e P, a fim de estabelecer relações C:N:P adequadas para o aumento das populações microbianas e, conseqüentemente, aumento significativo das taxas de degradação do contaminante orgânico (Evans et al., 2004; Trindade et al., 2005).

**Bioaugmentação:** é uma estratégia que ajuda a melhorar a capacidade de uma matriz contaminada, a fim de remover contaminantes por meio da adição de uma linhagem isolada ou de consórcios de micro-organismos potencialmente degradadores. O inóculo a ser utilizado pode ser selecionado do próprio local contaminado (autóctone) ou de outros ambientes impactados (exógeno). Muitos autores defendem a utilização de consórcios em detrimento de inóculos de apenas um isolado, dado que muitos micro-organismos têm o potencial de biotransformar um composto tóxico em intermediários da rota de degradação tanto que vários representantes da microbiota potencialmente degradadora participam de interações de sucessão ecológica à medida que o contaminante é biotransformado ao longo do tempo (Fantroussi & Agathos, 2005).

No entanto, existem muitas incertezas na literatura acerca de qual seria a melhor estratégia entre a atenuação natural, a bioestimulação, a bioaumentação ou as possíveis combinações entre elas. Alguns autores acreditam que a premissa básica do sucesso da bioaumentação, além do próprio inóculo adicionado ao sistema, seria a capacidade metabólica da população indígena em sofrer uma assimilação da diversidade genética exógena por mecanismos horizontais de transferência, conduzindo uma ampliação na competência biodegradadora (Gentry et al., 2004). Além disso, outros autores reforçam que a adição de um inóculo pode reduzir o impacto negativo que um contaminante tem sobre as populações microbianas indígenas (Gentry et al., 2001; Boon et al., 2003). Todavia, embora muitos autores defendam a bioaumentação com uma estratégia eficaz, existe outra parcela de pesquisadores que se questiona quanto à real viabilidade da técnica (Moller et al., 1995; McKew et al., 2007; Ueno et al., 2007; Hosokawa et al., 2009). O que faz gerar muitas dúvidas sobre o tema é porque existem ainda hoje poucos documentos que relatam as reais aplicações da bioaumentação a campo, mesmo que haja uma vasta literatura em escala laboratorial (Dybas et al., 2002). Diante disso, são inúmeras as sugestões para o insucesso da bioaumentação, uma vez que estudos demonstram que, após um tempo de incubação em solos, o inóculo é reduzido em tamanho populacional, não apresentando diferenças entre as outras estratégias, como a atenuação natural e a bioestimulação. Uma das hipóteses é que se acredita que a predação por protozoários seja a principal causa na falha da atividade do inóculo. Ainda, os inóculos de origem exógena apresentariam dificuldades de adaptação a

ambientes complexos como um solo, onde se devem considerar todos os fatores bióticos e abióticos (Hosokawa et al., 2009). Ponderando os fatores bióticos, muitas vezes micro-organismos exógenos sofrem competição por serem menos adaptados do que a microbiota indígena presente (Hosokawa et al., 2009).

Diante disso, inúmeros fatores bióticos tendem a afetar a biorremediação, dentre eles: mutações e transferências de genes por conjugação, transdução e transformação; indução enzimática; enriquecimento da população microbiana potencialmente degradadora; produção de metabólitos e/ou intermediários da degradação com potencial tóxico; disponibilidade de elétrons com o oxigênio para micro-organismos aeróbios e nitrato, sulfato, dióxido de carbono, ferro e manganês para micro-organismos anaeróbios; potencial de redução/oxidação; perfil da população do local contaminado, além das interações microbianas, tais como competição, predação e sucessão ecológica (Boopathy, 2000).

## **2.6 Fatores abióticos que influenciam a degradação microbiana de compostos orgânicos no solo**

A taxa de biodegradação de contaminantes de origem orgânica, como hidrocarbonetos e ésteres, depende das inúmeras características físico-químicas do contaminante, assim como várias propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, dentre elas:

Composição química e concentração do contaminante – a sequência geral dos hidrocarbonetos em ordem decrescente de biodegradabilidade é n-alcanos > alcanos ramificados > n-alkil-aromáticos de baixa massa molecular > monoaromáticos > cicloalcanos > aromáticos policíclicos > asfaltenos (van Hamme et al, 2003). Além da natureza química e do tempo de permanência do contaminante no solo, a relativa baixa solubilidade em água e sua concentração exercem influência importante no processo de biorremediação. Além disso, altas concentrações de combustíveis no solo podem causar inibição da biodegradação, devido à limitação de nutrientes como o Nitrogênio, o Fósforo e o Oxigênio e/ou aos efeitos tóxicos exercidos à célula microbiana pelos hidrocarbonetos voláteis principalmente (Atlas, 1981; Leavy & Colwell, 1990; van Hamme et al, 2003).

Umidade do Solo – a água é necessária para o crescimento microbiano, para a difusão dos nutrientes e para a eliminação de excretas. No entanto, em demasia, pode conduzir a um aumento da permeabilidade do solo. Normalmente, os teores de água no solo ideais para atividade microbiana são de 25 a 85% da capacidade de campo (Paul & Clark, 1989).

Temperatura – é um fator que influencia a biodegradação por seus efeitos na natureza física e composição química do combustível, além de estar diretamente relacionada com a taxa metabólica e a composição microbiana (Atlas, 1981). Como a atividade enzimática e o metabolismo microbiano são diretamente proporcionais ao aumento da temperatura, a taxa desses dois fatores dobra a cada aumento de 10 °C até atingir temperaturas inibitórias de aproximadamente 40 °C, uma vez que tendem a desnaturar a maioria das

estruturas proteicas da grande parcela dos micro-organismos considerados mesofílicos (Atlas, 1988; Leavy & Colwell, 1990). Por outro lado, com a diminuição da temperatura, a viscosidade dos óleos aumenta e sua solubilidade em água diminui ainda mais e a volatilização de alcanos tóxicos de baixa massa molecular é reduzida, retardando, assim, o início da biodegradação (Atlas, 1981).

pH – em contraste com os ecossistemas aquáticos, o pH do solo pode ser altamente variável, podendo apresentar valores de 2,5 a 11,0 (Bossert & Bartha, 1984). No entanto, a maioria dos fungos e bactérias de natureza heterotrófica possui preferência a valores de pH próximos à neutralidade, sendo os fungos mais tolerantes a pH mais baixos. Dessa forma, solos com pH extremos podem atuar como ambientes hostis para muitos micro-organismos, pois esse fator regula também a biodisponibilidade de nutrientes (Atlas, 1988).

Oxigênio – muitos micro-organismos aeróbios atuam no catabolismo dos hidrocarbonetos na presença de oxigenases, enzimas em que um ou dois átomos de oxigênio são exigidos. Ainda, o oxigênio é visto como um importante acceptor final de elétrons em sistemas aeróbicos, comportando-se como um agente oxidante em reações de oxirredução (Atlas, 1981; Leavy & Colwell, 1990). No solo, a disponibilidade de oxigênio é dependente das taxas de consumo da própria microbiana, do tipo de solo e da quantidade de saturação hídrica (Bossert & Bartha, 1984).

Nutrientes no solo – considerando a degradação microbiana de compostos orgânicos, é indispensável a presença tanto de macro quanto de micronutrientes. Embora todos os nutrientes sejam importantes para o sucesso

do desenvolvimento dos micro-organismos degradadores, a presença, em quantidades específicas, de N e P merece destaque, pois são essenciais principalmente para a síntese de proteínas e nucleotídeos, respectivamente. Dessa forma, assim como a escassez de nutrientes pode comprometer a biodegradação do contaminante, o excesso pode levar a célula à toxicidade (Atlas, 1981). As relações C: N: P são bastante utilizadas para otimizar a taxa de degradação de contaminantes ricos em carbono, pois expressam a razão desses elementos químicos encontrados na constituição celular de micro-organismos (Morgan & Watkinson, 1989; Margesin & Schinner, 2001). No entanto, essas relações variam muito na literatura. Apenas para a relação C: N, é possível encontrar valores recomendados que compreendem de 100:1 a 2,9:1 (Morgan & Watkinson, 1989; Atlas & Bartha, 1992; Komilis et al., 2010). Alguns autores relatam que a variabilidade nas taxas de C: N: P ótimo também pode ser atribuída aos níveis variáveis de contaminação inicial em termos de diferentes concentrações do contaminante no solo (Walworth et al., 1997; Walecka-Hutchison & Walworth, 2006; Aspray et al., 2008) e à baixa solubilidade do contaminante (Atlas, 1981).

Características intrínsecas do solo – a taxa de biodegradação do diesel e do biodiesel pode ser influenciada por diversos fatores intrínsecos do solo, como a natureza e a distribuição das partículas, a formação de agregados, o percentual de argila e a quantidade de matéria orgânica, pH, potencial redox, aporte nutricional e atividade micorbiana presentes (Haigh, 1996; Amellal et al., 2001). Primeiramente, níveis relativamente altos de matéria orgânica do solo contribuem para a manutenção da comunidade



microbiana em tamanho e diversidade. Esse constituinte do solo pode atuar como reservatório de micro-organismos potencialmente degradadores de compostos orgânicos, contribuindo para o sucesso da biodegradação (Franco et al., 2004; Cookson et al., 2005; Scherr et al., 2007). Por outro lado, tanto o conteúdo da argila quanto o da matéria orgânica contribuem na redução da biodisponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos à célula. Tal fato se dá pelas interações intermoleculares entre as partículas do solo, estando relacionadas a dois fatores principais: 1) sorção do contaminante às partículas do solo e 2) penetração do contaminante em nanoporos (Alexander, 2000; Trindade et al., 2005). Assim, o fenômeno da sorção depende fundamentalmente dos processos químicos específicos do contaminante, como solubilidade em água e polaridade das moléculas, assim como pH do solo, conteúdo de matéria orgânica, argila e capacidade de troca catiônica (von Oepen et al., 1991; Kuhnt, 1993).

Levando em conta todas essas considerações, muitos trabalhos de biorremediação de derivados do petróleo, como o de diesel em solos, vêm sendo desenvolvidos ao longo dos últimos anos (Bento et al., 2003; Bento et al., 2004; Mariano et al., 2007; Ostberg et al., 2007; Di Toro et al., 2008; Lin et al., 2008; Liu et al., 2009; Komilis, et al., 2010). Desde 2006, com a inserção do biodiesel na matriz energética brasileira, vem sendo observado um aumento constante da fração biodiesel na mistura diesel/biodiesel. Ainda que existam muitos trabalhos com essas misturas em meio líquido, avaliando a biodegradação em sistemas aquáticos (Pasqualino, et al., 2006; De Mello et al., 2007; Prince et al., 2008; Owsianiak et al., 2009), ainda é encontrada uma

menor proporção de trabalhos sobre biorremediação de diesel/biodiesel para ecossistemas terrestres (Mariano et al., 2008a, 2008b; Júnior et al., 2009). Diante desse fato, ao simular derramamentos superficiais em escala laboratorial e, sobretudo, a campo, tem-se como finalidade avaliar a biodegradabilidade das misturas de diesel/biodiesel em solos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi subdividido em duas etapas: na primeira foi realizado o processo de isolamento e de seleção dos isolados bacterianos potencialmente degradadores das misturas de diesel/biodiesel, a fim de eleger um consórcio bacteriano para inocular nos tratamentos de bioaumentação em solos; na segunda etapa do trabalho, foram realizados os experimentos de biorremediação (atenuação natural e bioaumentação) em dois solos (um arenoso e outro argiloso).

#### **3.1 Isolamento e seleção de Micro-organismos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biorremediação do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia/UFRGS, no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde e no Laboratório de Cromatografia Gasosa do Departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química/UFRGS.

##### **3.1.1 Combustível**

Foram utilizadas amostras de diesel metropolitano e biodiesel de soja, fornecidas pelas empresas Ipiranga Distribuidora de Petróleo e BSBios, respectivamente. A esterilização dos combustíveis (diesel e biodiesel) foi realizada por filtração a vácuo por meio de membrana com poros de 0,22 µm, utilizando-se um frasco *kitassato* esterilizado. Após esse procedimento, os combustíveis foram armazenados em frascos estéreis e hermeticamente fechados. Para evitar a foto-oxidação, os frascos foram protegidos da luz com papel-alumínio e armazenados à temperatura ambiente. Foram preparadas diferentes concentrações de diesel/biodiesel: 100% diesel (B0); 80% diesel e 20% biodiesel (B20) e 100% biodiesel (B100).

### **3.1.2 Coleta das amostras contaminadas**

As amostras foram coletadas de dois locais com um histórico de contaminação: a primeira coleta foi realizada em uma das 12 células de 30 m x 100 m de *landfarming* do Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes (SITEL) com recebimento de resíduo petroquímico há 20 anos da Companhia Petroquímica do Sul (COPESUL), situada no município de Triunfo, Rio Grande do Sul, cujas amostras compostas foram coletadas de 5 pontos equidistantes (30 m x 100 m) a uma camada superficial de 0 - 15 cm de profundidade. Para cada ponto, foram coletadas, aproximadamente, 50 g de solo. Após, foi realizada a mistura, perfazendo 250 g. Posteriormente, as amostras compostas foram trazidas ao Laboratório de Biorremediação do Departamento de Solos do Departamento de Agronomia da UFRGS e mantidas sob refrigeração a 4° C; a

segunda coleta foi realizada a partir de um sedimento formado durante a centrifugação de biodiesel de uma empresa de transporte coletivo, Rio de Janeiro, Brasil. O material foi trazido ao laboratório e mantido sob refrigeração de 4° C.

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

Para o solo da célula de *landfarming*, foram realizados dois procedimentos para selecionar micro-organismos com potencial biodegradador de combustíveis (diesel/biodiesel): na Presença do Processo de Transferência (PPT) e na Ausência do Processo de Transferência (APT). Para a seleção na PPT, cada frasco de erlenmeyer 125 mL foi hermeticamente fechado, no qual foi inoculado 1 g de amostra de solo contaminado + 1% de diesel (B0) ou 1% de biodiesel (B100) em 50 mL de meio mineral esterilizado (MM1) (Richard & Vogel, 1999) (Anexo 1), com cinco repetições para cada combustível. O inóculo foi incubado sob agitação orbital a 180 r.p.m. à temperatura de 28° C, realizando-se transferências de 1 mL do inóculo para novos frascos nas mesmas condições anteriores. Essas transferências foram realizadas a cada 7 dias, durante 3 semanas, com o objetivo de assegurar que o crescimento microbiano ocorresse às expensas do diesel ou do biodiesel como única fonte de carbono, uma vez que o meio mineral utilizado é constituído por micro e macronutrientes indispensáveis para o crescimento de micro-organismos. Para os experimentos na APT, foram inoculados os mesmos substratos, sendo o

inóculo (1 g de solo contaminado) agitado por 1 h nas mesmas condições. Esses dois diferentes procedimentos de seleção, com duas fontes de carbono distintas (diesel/biodiesel), foram adotados para aumentar a probabilidade em isolar diferentes perfis de micro-organismos presentes nesse solo contaminado. Para o sedimento formado durante a centrifugação de biodiesel (B100), a seleção dos micro-organismos foi realizada, utilizando 1 mL da borra oleosa diretamente adicionada em 97 mL de água destilada estéril e 2 mL de surfactante comercial, o Tween 80 %. Este último é um detergente eficiente para aumentar a solubilidade do biodiesel (fase oleosa) em água (fase aquosa), aumentando, assim, a probabilidade de isolar um maior número de micro-organismos presentes na mistura. Essa suspensão foi mantida sob agitação a 200 r.p.m. por 12 horas.

Tanto para a amostra de solo da célula de *landfarming* quanto para a amostra de sedimento formado pela centrifugação do biodiesel, o isolamento dos micro-organismos foi realizado por meio de diluições decimais em solução salina 0,85%, sendo inoculadas em placa de *Petri* as diluições de  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  em Ágar Nutriente (Anexo 2), sendo incubado por 48 h a 28° C. Após essa etapa, foi realizada a purificação dos isolados com auxílio da alça de platina, selecionando apenas bactérias. Posteriormente, os isolados foram caracterizados pela morfologia celular e coloração de Gram (Anexo 3), sendo armazenadas em ágar inclinado (Ágar Nutriente) à temperatura de 4° C e em glicerol 20% a – 18° C.

#### **3.1.4 Preparo do pré-inóculo**

Ao preparar o pré-inóculo, os isolados bacterianos foram transferidos da cultura estoque para um frasco de erlenmeyer, contendo 50 mL de Caldo Nutriente (Anexo 4), com auxílio de uma alça de platina. Os frascos foram incubados a 180 r.p.m. a 28° C por 24 h. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 6000 r.p.m. por 10 min. e lavadas com 20 mL de MM1, sendo o extrato celular homogeneizado com o meio mineral em vórtex por 10 segundos. Esse procedimento foi repetido por três vezes com o intuito de remover o excesso de caldo nutriente presente no material celular. Com o escopo de avaliar o potencial de biodegradador em biodiesel a partir de indicadores-redox, foi utilizado um inóculo inicial padronizado com absorvância de 0,07 para cada isolado em MM1, sendo realizada a leitura em espectrofotômetro, ajustado em comprimento de onda de 600 nm.

### **3.1.5 Avaliação preliminar da capacidade biodegradadora do biodiesel (B100), utilizando dois indicadores redox**

Para avaliar, previamente, a capacidade de biodegradação em biodiesel comercial (B100), foram realizados testes utilizando os indicadores redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e 2,6 diclorofenol indofenol (DCPIP). O princípio dessa técnica está baseado na oxidação microbiana de uma dada fonte de carbono, onde elétrons são transferidos para aceptores artificiais, tendo estes a mesma função que o oxigênio, o nitrato ou o sulfato têm na cadeia transportadora de elétrons. Pela incorporação de aceptores

artificiais como o DCPIP ou o TTC ao MM1, é possível prever a capacidade de um micro-organismo em utilizar o substrato, no caso, o B100, pela observação da mudança de cor do meio mineral. Os dois indicadores foram adicionados ao meio mineral esterilizado. O TTC, quando em contato com um micro-organismo capaz de utilizar, por exemplo, o biodiesel como única fonte de carbono e de energia, reage, sofrendo redução a trifetil-formazan (TFP). Ainda, o TTC é um importante sinalizador da presença de desidrogenases, enzimas intracelulares responsáveis por catalisar reações de oxirredução de compostos orgânicos, uma vez que estas apresentam alta afinidade pelos carreadores de elétrons (NAD, FAD, TTC) (Bitton & Koopman, 1982). Nas mesmas condições, o DCPIP muda a coloração de roxa (oxidado) para incolor (reduzido) (Hanson et al., 1993). Essa técnica tem sido utilizada em vários trabalhos realizados nas mais diversas áreas da Microbiologia (Cormack & Fraile, 1997; Roy et al., 2002; Vieira et al., 2007; Mariano et al., 2008a; Mariano et al., 2008b; Pirolo et al., 2008; Júnior et al., 2009). A mudança de coloração do meio de cultura indica que os dois indicadores-redox atuam como aceptores artificiais da cadeia transportadora de elétrons, informando sobre a oxidação de diesel/biodiesel pelos micro-organismos. Para cada indicador, os experimentos foram realizados em triplicata em frascos de penicilina de 25 mL. Em cada frasco, foram adicionados 10 mL de meio mineral na presença do indicador correspondente (TTC ou DCPIP) (Anexo 5). Antes de autoclavar, o pH do meio foi medido e ajustado a 7,2. Depois de o meio ser autoclavado, foram adicionados 100 µL de biodiesel (1%) ao MM1 e o inóculo em 0,07 de absorbância. Foram utilizados dois controles negativos: 1) foram adicionados



10 mL de meio mineral com cada indicador redox, além de 100 µL de biodiesel, a fim de verificar a mudança de coloração do meio, caso houvesse degradação abiótica; 2) foram adicionados o meio mineral e o inóculo nas mesmas condições acima para avaliar se havia reservas de fontes de carbono nas células. Os frascos de penicilina foram recobertos por papel-alumínio para evitar a foto-oxidação dos indicadores-redox e do próprio biodiesel. O inóculo foi incubado em mesa agitadora a 180 r.p.m. a 30° C por até 144 h. Foi acompanhada a mudança de coloração dos indicadores por 24, 48, 72 e 144 h.

### **3.1.6 Preparação do inóculo para os ensaios de biodegradabilidade em meio líquido**

Dos 24 morfotipos bacterianos, foram selecionados 10 isolados, a partir de dois indicadores redox, para a próxima etapa de seleção. O pré-inóculo foi preparado e lavado com descrito acima, sendo adicionado 1% de B0, B20 ou B100 em 180 mL de MM1, como única fonte de carbono. O inóculo inicial foi padronizado em aproximadamente  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, a partir do ajuste da absorbância de cada isolado em MM1 em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. A incubação foi realizada sob agitação (180 r.p.m.) a 28°C por 14 dias. Para avaliar a capacidade de biodegradação, os ensaios realizados foram monitorados em 3 diferentes períodos na curva de crescimento (tempos: 1, 7 e 14 dias).

Para a obtenção do inóculo inicial padrão ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>), primeiramente estimou-se o número de células viáveis a partir de diversas

densidades ópticas por espectrofotômetro, por tentativa e erro, de modo que se chegasse a um valor de  $\text{UFC.mL}^{-1}$  equivalente para todos os isolados. Posteriormente, o inóculo sofreu diluições seriadas em solução de NaCl (0,85%), sendo as diluições  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  inoculadas em placa e incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  por até 48 h. Foi realizada a contagem do número de células viáveis em placas de *Petri*.

### **3.1.7.1 Determinação da concentração de proteínas totais**

A concentração de proteínas totais ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976). Para a preparação do reagente de proteína, dissolveu-se 100 mg de Coomassie Blue BG250 (Merck, Alemanha) em 50 mL de etanol 95%. A essa solução adicionou-se 100 mL de ácido fosfórico 85%. Por fim, a solução final foi diluída com água destilada em volume de 1 L e, posteriormente, filtrada. A absorbância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro. Uma curva padrão foi construída, tendo como base as seguintes concentrações de Albumina Sérica Humana (BSA): 10, 20, 30 e 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 12).

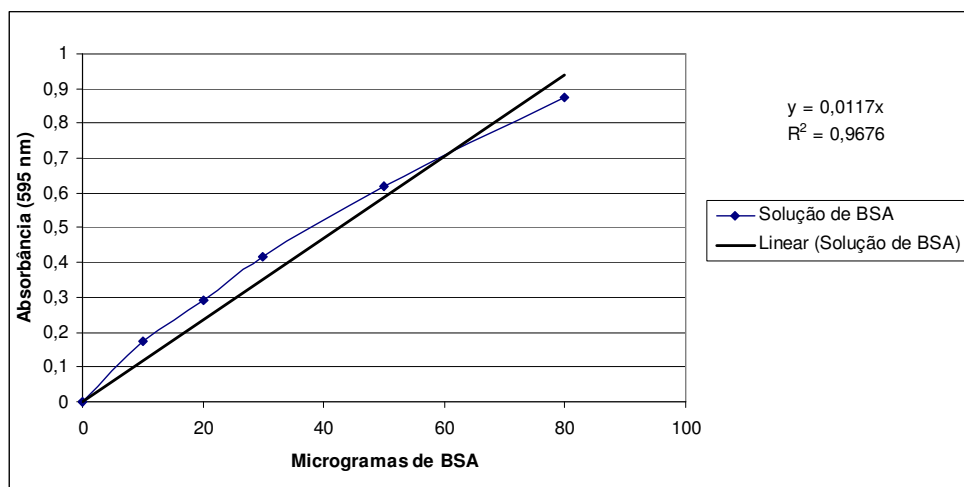


Figura 12: Curva padrão, utilizando solução de BSA, para determinação de proteínas totais.

### 3.1.7.2 Medida da tensão superficial

A medida da tensão superficial do meio aquoso foi avaliada na ausência de células microbianas, removidas por meio de centrifugação a 6000 r.p.m. por 15 min. A medida da tensão superficial das amostras foi determinada em um medidor de tensão superficial digital (Gibertini, Milão, Itália), utilizando-se o método da placa de Wilhelmy. Foram utilizados a água destilada ( $72 \text{ mN.m}^{-1}$ ) e o etanol 98% ( $22,5 \text{ mN.m}^{-1}$ ) como padrões.

### 3.1.7.3 Medidas de pH

Durante as análises de crescimento microbiano, foram monitoradas as medidas de pH do sobrenadante, sendo antes centrifugadas a 6000 r.p.m. por 15 min, a fim de se verificar a natureza dos metabólitos (ácida ou básica) oriundos da degradação dos combustíveis sob avaliação. As medidas foram

realizadas com o auxílio de um eletrodo de pH acoplado a um pHmetro da marca Digimed DM-22.

#### **3.1.7.4 Índice de emulsificação (IE<sub>24</sub>)**

A avaliação do índice de emulsificação foi realizada na ausência de células (centrifugação a 6000 r.p.m. por 15 min) e na presença de células microbianas. O índice de emulsificação foi determinado pela adição de 2 mL do meio de cultura, misturados a 2 mL de diesel puro em tubos de ensaio com fundo chato (100 mm x 15 mm), sendo a mistura agitada em vórtex por 2 minutos e os frascos deixados em repouso por 24 horas. Após esse período, o índice de emulsificação (%) foi obtido pela medida da coluna emulsificada, dividida pela altura total (4 mL) e multiplicada por 100 (IE<sub>24</sub>) (Cooper & Goldenberger, 1987).

#### **3.1.7.5 Avaliação da hidrofobicidade celular**

Após 14 dias de incubação nas condições descritas anteriormente, os isolados foram centrifugados a 6000 r.p.m. por 10 min. a 10°C. Posteriormente o *pellet* foi lavado duas vezes com 20 mL de solução tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7. Por fim, as células foram ressuspensas em 15 mL de solução tampão KNO<sub>3</sub> 10 mM, pH 6,2. Em seguida, foi adicionado a frascos de penicilina 4 mL de suspensão bacteriana e 1 mL de clorofórmio (solvente apolar), sendo a solução homogeneizada em agitador vórtex por 2

min. Após esse procedimento, os frascos foram mantidos em repouso por 30 min., a fim de que as fases se separassem completamente. Por fim, foi realizada a leitura da fase aquosa por espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. Foi estimada a percentagem de hidrofobicidade a partir da fórmula abaixo, sendo:

DO<sub>A</sub>: 5 mL de suspensão celular em solução de KNO<sub>3</sub>;

DO<sub>B</sub>: 4 mL de suspensão celular em solução de KNO<sub>3</sub> + 1 mL de clorofórmio;

Logo, a porcentagem de adesão bacteriana ao solvente apolar deu-se do seguinte modo:

$$\% \text{ de hidrofobicidade} = \frac{(DO_A - DO_B) \times 100}{DO_A}$$

### **3.1.8.1 Preparo do sobrenadante para avaliação da atividade enzimática**

O *pellet* foi lavado duas vezes com tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), centrifugado a 6000 r.p.m. por 10 min, 10°C. Posteriormente, o inóculo foi ressuspendido com 10 mL do mesmo tampão. As células foram submetidas a um aparelho de ultrassom (Sonics & Materials Inc Vibra cell, USA) por 2 ciclos de 40 s com um intervalo de 1 minuto, sendo utilizada uma potência de 50-60 W. Além disso, foi adicionado gelo para evitar aquecimento e possivelmente ocasionar inativação e/ou desnaturação das enzimas. Após, o *pellet* foi

centrifugado novamente sob as mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi utilizado para realização das leituras da atividade enzimática em espectrofotômetro com comprimentos de onda específicos. As enzimas foram expressas como unidades da atividade enzimática por miligrama de proteínas totais ( $U. mg^{-1}$ ). Para as enzimas monoxigenases, dioxigenases, lipases e esterases, foi avaliado o tratamento B20. As demais avaliações foram realizadas para B0, B20 e B100. O cálculo da atividade das enzimas (esterase, C1,2O, C2,3O e P3,4O) foi realizado conforme as equações 1 e 2.

Equação 1:

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

Sendo:

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar;

A = absorvância no tempo zero;

c = concentração do substrato ( $\mu M$ );

L = caminho percorrido pela luz (cm).

Equação 2:

$$U. mg^{-1} = \frac{\Delta A. V_1}{\Delta T. \epsilon. V_2. mg}$$

Sendo:

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar;

$V_1$  = volume total da reação;

$V_2$  = volume da suspensão enzimática;

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

$\Delta T$  = variação do tempo (15 min – 0 min.);

mg = miligramas de proteínas totais.

### **3.1.8.2 Determinação da atividade de Alcano Hidroxilase (monoxigenase)**

A mistura da reação consistiu em 740  $\mu\text{L}$  de tampão TRIS-HCl (27 mM, pH 7,4), 100  $\mu\text{L}$  de NADH 1 mM, 10  $\mu\text{L}$  de iso-octano (1% de iso-octano em DMSO 80%); 50  $\mu\text{L}$  de CHAPS (3%) e 100  $\mu\text{L}$  de extrato. A atividade da alcano hidroxilase foi medida pelo decréscimo da absorbância a 340 nm de NADH em espectrofotômetro. A unidade da atividade enzimática (U) foi expressa pela quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{M}$  de NADH por minuto, conforme Lee et al. (1996).

### **3.1.8.3 Determinação da atividade das enzimas 1,2-Catecol; 2,3-Catecol e 3,4-Protocatecol (Dioxigenase)**

A atividade da catecol 1,2 dioxigenase foi determinada pelo aumento da absorbância a 260 nm pela formação de cis-muconato. A mistura da reação foi composta por 1 mL de catecol 0,1 mM, 0,8 mL de tampão tris-HCl 50 mM (pH 8,0), 0,2 mL de 2-Mercaptoetanol 0,1 mM e 1 mL do extrato celular conforme descrito por Hegman (1966). A atividade da catecol 2,3 dioxigenase foi determinada pelo aumento da absorbância a 375 nm pela formação de hidroximucônico semialdeído. A mistura da reação foi composta por 1 mL de catecol 0,3 mM, 1 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e 1 mL do extrato celular, conforme Baggi et al. (1987). A atividade da protococatecol 3,4 dioxigenase foi determinada pelo decréscimo da absorbância a 290 nm, devido à formação de cis-muconato. A mistura de reação é composta por 1 mL ácido protocatecólico 0,12 mM, 1 mL de tampão tris-HCl (pH 7,5) e 1 mL do extrato celular, conforme descrito por Fujisawa & Hayaishi (1968). A unidade da atividade enzimática (U) foi expressa pela quantidade de enzima necessária para degradar 1 $\mu$ M de catecol ou protococatecol por minuto.

#### **3.1.8.4 Determinação qualitativa da atividade de esterase**

A atividade de esterase foi determinada pelo método em placa utilizando o meio de cultura descrito por Sierra (1957), contendo (g L<sup>-1</sup>): peptona 5,0; NaCl 5,0; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,01; extrato de levedura 1,0; extrato de carne 1,0; ágar 15,0; pH 7.4. Após a esterilização do meio de cultura, foi adicionado Tween 80 (previamente esterilizado) numa concentração final de 1% (v/v). A hidrólise dos ésteres é demonstrada pela adição de tween solúvel



em água ao meio nutriente. Ao redor das colônias é formado um halo, devido à formação de cristais (sais de cálcio dos ácidos graxos formados) liberados pela ação esterásica.

#### **3.1.8.5 Determinação quantitativa da atividade de esterase**

A atividade de esterase foi avaliada utilizando p-nitrofenil-acetato (p-NPA) como substrato. A mistura da reação foi preparada com 0,8 mM de p-NPA em isopropanol: 0,1 mM tampão fosfato, pH 7,0, (1:10), contendo 2% (v/v) Triton-X-100. A mistura da reação consistiu de 2,6 mL de solução e 0,4 mL de extrato celular e a leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 415 nm. A unidade da atividade enzimática (U) foi expressa pela quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ M de p-nitrofenol por minuto, de acordo com Casaburi et al. (2006).

#### **3.1.8.6 Determinação da atividade de lipase**

A preparação do extrato enzimático foi idêntico a do preparo para avaliar a medida de tensão superficial. Para a medida da atividade lipolítica foi utilizada uma emulsão preparada com 75 mL de goma arábica (7%) e 25 mL de óleo de oliva (Azeite “Gallo”, Victor Guedes, Ind. E Com., S.A., Portugal), homogeneizados em centrífuga por 5 min. a 500 r.p.m.. A mistura da reação consistiu em 5 mL de emulsão, 2 mL de tampão fosfato 10 mM (pH 7) e 1 mL de extrato enzimático. A solução de reação foi incubada em mesa agitadora a

37° C por 30 min a 180 r.p.m.. Após o período, a reação foi paralisada com a adição de 15 mL de solução álcool-acetona (1:1). Os ácidos graxos produzidos foram titulados com NaOH 0,05 M, utilizando 4 gotas de fenolftaleína (0,5% em etanol) como indicador. Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µM de ácido graxo por minuto, nas condições descritas acima. O cálculo da atividade de lipases foi realizado de acordo com a equação:

$$U. \text{ mg}^{-1} = \frac{\Delta V. [\text{NaOH}]. \text{fc}}{\Delta T. V_1. \text{mg}}$$

Sendo:

$\Delta V$  = variação do volume consumido de NaOH (Volume da amostra – Volume do branco);

$[\text{NaOH}]$  = concentração utilizada de base em µM;

$\Delta T$  = variação do tempo em min.;

$V_1$  = volume da solução enzimática (mL);

$\text{fc}$  = fator de correção do NaOH ( $\text{fc}$  = volume solução preparada (enzima)/volume solução consumida (NaOH));

$\text{mg}$  = miligrama de proteínas.

### 3. 2 Experimento de Biorremediação

### 3.2.1 Amostras de solos não contaminados

Foram coletadas amostras superficiais representativas de dois tipos de solo de uma área sem histórico de contaminação a uma profundidade de 0 - 20 cm (Horizonte A), classificados pelo Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos (EMBRAPA, 2006) como 1) Nitossolo Vermelho distrófico (NVd), substrato basáltico (argiloso - ARG) e 2) Argissolo Vermelho distrófico (AVd), substrato arenítico, (arenoso - ARE), coletados em áreas junto à Rodovia Federal BR 386, localizadas geograficamente nos municípios de Fazenda Vilanova, RS (29° 34' 43,6" S, 51° 50'33,8" W) e de Triunfo, localidade de Coxilha Velha, RS (29° 44' 09" S, 51° 37' 44,7" W), respectivamente.

A escolha dos solos foi baseada nas diferenças em relação aos teores de matéria orgânica, argila e capacidade de troca catiônica (CTC).

Após a coleta, o material foi peneirado em malhas de 2 mm. A umidade do solo foi padronizada, apresentando capacidade de campo em torno 60%. No decorrer do experimento, foi adicionada água destilada nos frascos respirométricos para manter os mesmos padrões de umidade durante todo o processo de incubação.

Os atributos físico-químicos dos solos foram determinados pelo laboratório de Análises do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e pelo Laboratório de Solos da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária de Porto Alegre, RS, de acordo com as metodologias descritas por Tedesco et al. (1995) (Tabela 1).

Tabela 1: Atributos físico-químicos dos dois solos avaliados.

Atributo	Profundidade (0- 20 cm )	
	AVd (ARE)	NVd (ARG)
Matéria Orgânica (g Kg <sup>-1</sup> )	1,1	2,5
Argila (%)	9	45
Areia Fina (%)	41	19
Areia Grossa (%)	42	13
Silte (%)	8	23
Carbono Orgânico (g Kg <sup>-1</sup> )	5	17
Nitrogênio Total (g Kg <sup>-1</sup> )	0,5	1,6
P disponível (mg dm <sup>-3</sup> )	0	0,4
K disponível (mg dm <sup>-3</sup> )	68	165
CTC efetiva (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ) <sup>1</sup>	2,3	6,4
CTC pH7 (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ) <sup>2</sup>	5,4	10,2
Al (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,8	0,1
Ca (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,9	4,6
Mg (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,4	1,2
H + Al (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	3,9	3,9
pH (H <sub>2</sub> O)	4,8	5,5
Índice SMP	6,1	6,1

<sup>1</sup> Quantidade de cargas ao pH original do solo.

<sup>2</sup> Quantidade de cargas em pH 7

### 3.2.2 Biorremediação dos solos

Foram incubados 300 g de solo com 60% de capacidade de campo em frascos respirométricos (1 L) para avaliar a atividade de biodegradação das diferentes concentrações de combustíveis, B0, B20 e B100 com os respectivos tratamentos controle (sem adição de combustível), em duas estratégias de biorremediação (atenuação natural e bioaugmentação), totalizando 16 tratamentos. O solo foi contaminado por 30 mL de combustível/Kg solo úmido, simulando um derramamento superficial de combustível em 0,5 hectare por um caminhão-tanque com capacidade para armazenar 30000 L. A fim de garantir

que as amostras de solo estivessem homogeneizadas com o combustível, a contaminação foi realizada em três diferentes parcelas de solo (100 g) até completar o total de 300 g no frasco de incubação. Para avaliar a atividade microbiológica durante a degradação, foram realizados os experimentos de respirometria, de desidrogenase, de contagem de heterotróficos e de biodegradadores, além da cromatografia gasosa para estimar o percentual de combustível que foi degradado. Os experimentos, todos realizados em triplicata, foram incubados por um período de 60 dias. Para estimar a atividade de biodegradação por atenuação natural, foram considerados apenas os microorganismos presentes no solo, sem que houvesse a adição de nutrientes. Para a estratégia de bioaugmentação, foi introduzida uma suspensão de um consórcio bacteriano (quatro isolados), selecionado na primeira etapa do trabalho: [isolado 1 (*Bacillus megaterium*), isolado 2 (*Bacillus pumilus*), isolado 5 (*Pseudomonas aeruginosa*) e isolado 6 (*Stenotrophomonas maltophilia*)], de forma a introduzir uma população de  $2 \cdot 10^8$  UFC g<sup>-1</sup> (Modificado de Bento et al, 2003). Teve-se o cuidado de a solução que suspendia o inóculo ser constituída por apenas água destilada, a fim de que nenhuma fonte de nutrientes alterasse o microcosmo. Além disso, além do inóculo, foi adicionada uma solução de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, de modo que foi ajustada a relação de C:N:P para 120:10:1 (Jiménez et al., 2007). Os volumes de inóculo do consórcio e de solução de nutrientes também foram ajustados para se que mantivesse a capacidade de campo em torno de 60%.

### 3.2.3 Análise Respirométrica

As amostras de solo (300 g) foram colocadas em frascos hermeticamente fechados de 1 L. Os experimentos de respirometria foram equipados com um aparato de captação de CO<sub>2</sub>, contendo copos plásticos com 20 mL de solução de NaOH 0,75 M. Os frascos respirométricos foram hermeticamente fechados por tampa vedada com borracha e incubados à temperatura ambiente dentro de uma casa de vegetação, sendo as temperaturas mínimas e máximas monitoradas a cada avaliação durante 60 dias (de 19 de setembro a 22 de novembro de 2010) (Anexo 6). Periodicamente, os frascos foram ligeiramente abertos, sendo retirada a solução de NaOH em que recebia 3 mL de BaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O 30%, a fim de precipitar o CO<sub>2</sub> em solução. Logo após, utilizando o indicador de fenolftaleína, a solução foi titulada com HCl 0,5 M. Uma amostra de solo de umidade igual aquelas presentes nos experimentos foi utilizada para determinação da massa seca, sendo a produção de C-CO<sub>2</sub> expressa por mg Kg<sup>-1</sup> de solo seco. A produção de C-CO<sub>2</sub> foi determinada de acordo com Stotzky (1965).

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

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

T = volume (em mL) da solução de HCl gasto para titular os tratamentos;

eq = equivalente-grama do C, que é 6;

M = molaridade da solução padronizada do HCl;

FC = Fator de Correção da normalidade de ácido/base = M HCl/M NaOH;

M<sub>c</sub> = massa do solo seco em Kg.

### 3.2.4 Atividade enzimática do solo

A atividade das desidrogenases foi determinada conforme método proposto por Thalmann (1968), descrito em Alef (1995) com modificações. Foram coletados 2 g de solo úmido de cada amostra presente nos frascos respirométricos e adicionados à solução de 2 mL de cloreto de 2,3,5 – trifeniltetrazólio (TTC) 0,9% em tampão TRIS-HCl pH 7,8. A mistura foi colocada em um tubo de centrifuga e incubada a 30 °C por 24 h. Foram realizadas amostras-controle, apenas com a adição de solução TRIS-HCl e solo. Após a incubação foram adicionados 16 mL de acetona p.a. para paralisar a reação, deixando o homogeneizado no escuro por mais 2 horas. Após, foi filtrada a suspensão de solo e mediu-se a absorbância do filtrado em comprimento de onda de 546 nm em espectrofotômetro. Foi construída uma curva padrão das seguintes concentrações: 0, 5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{g}$  de TFP  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 13).

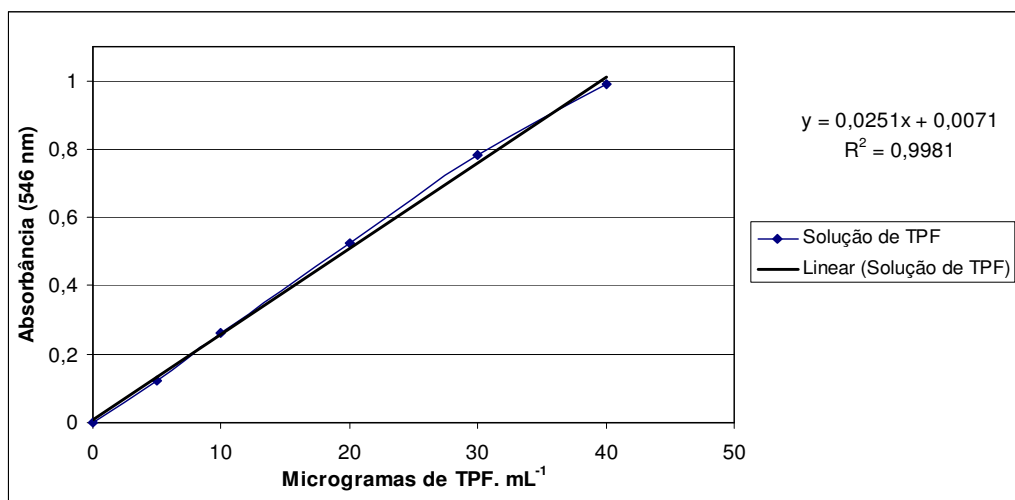


Figura 13: Curva padrão para avaliar produção de TPF.

### 3.2.5 Contagem de heterotróficos totais

Foi coletado 1g de solo úmido de cada amostra dos frascos respirométricos. As amostras de solo sofreram diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$  em tubos de ensaio. Foram translocados 100  $\mu$ L das respectivas diluições para placas estéreis de poliestireno de 96 poços. Em cada poço, foi adicionado, além do inóculo correspondente de cada diluição ( $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ ), 100  $\mu$ L de meio TSB (marca Himedia). As placas foram incubadas por 48h a 28°C, sendo recobertas com papel alumínio para evitar o ressecamento do meio. Antes da inoculação, elas foram esterilizadas por 1 h em luz ultravioleta. Foi determinado o NMP a partir da turbidez do meio, indicando a presença de micro-organismos presentes nas respectivas diluições. Foi determinado o NMP de cada amostra a partir de uma tabela de NMP (Adaptado de Food & Drug Administration,



2001). A quantificação de micro-organismos foi expressa por UFC g<sup>-1</sup> de solo seco.

### **3.2.6 Contagem de degradadores**

O método é baseado na utilização do indicador redox TTC para determinar o NMP a partir da utilização do B50 como fonte de carbono padrão, uma vez que este corresponde às misturas de diesel/biodiesel utilizada nos ensaios. O meio mineral com o indicador redox TTC foi preparado de acordo o proposto por Braddock & Catterall (1999) (Anexo 5). As amostras foram diluídas como descrito acima, sendo adicionados 100 µL de meio mineral, 100 µL de inóculo da diluição correspondente e 10 µL de B50 em cada poço. As placas foram incubadas a 28°C por 10 - 14 dias, a fim de detectar micro-organismos capazes de utilizar o B50 como fonte de carbono pela mudança de cor da solução de incolor a róseo, resultado da redução de TTC a TPF. A determinação do NMP e a estimativa de UFC g<sup>-1</sup> de solo seco foram obtidas pela mesma metodologia descrita acima.

### **3.2.7 Extração do combustível das amostras de solo**

Para verificar o percentual de biodegradabilidade dos hidrocarbonetos e ésteres (B0, B20 e B100) presentes nos frascos respirométricos com 300g de solo, foram realizadas duas análises cromatográficas ao longo dos 60 dias de incubação: a primeira no tempo zero e

a segunda no final do experimento (60 dias). Antes da coleta, o solo foi revolvido com uma espátula para garantir a homogeneidade da mistura, visto que uma parcela do combustível pode migrar para o fundo do frasco. Posteriormente, foram coletadas amostras compostas a partir de 5 pontos equidistantes dentro de cada frasco, sendo que, para cada ponto, foi retirado 5g de solo, a fim de perfazer 25 g. As amostras de solo permaneceram à temperatura de -18°C até a extração do combustível. Posteriormente, as amostras passaram por um processo de extração por *Soxhlet* durante 12 h., utilizando metanol/diclorometano grau pesticida (1:3) (v/v) como solventes orgânicos (USEPA, 1996). O material extraído foi concentrado em rotavapor (RV 05 – ST IKA - WERKE), com rotação de 50 r.p.m. Por sua vez, a quantidade de água residual da amostra foi retirada, adicionando-se sulfato de sódio. Em seguida, o extrato foi lavado com diclorometano grau pesticida e repassado para um novo frasco. Posteriormente, o extrato permaneceu evaporando na capela de exaustão até obter massa constante. Conseqüentemente, as amostras foram armazenadas em temperatura de -18°C até serem submetidas à análise cromatográfica.

### **3.2.8 Análises cromatográficas**

As amostras já extraídas foram levadas à empresa Econsulting Laboratório e Gestão Ambiental para que fossem analisadas quanto aos valores de TPH e de ésteres totais.

Para o cálculo percentual de biodegradação dos diferentes tratamentos (B0, B20 e B100) em dois diferentes tipos de solo, foram avaliadas a quantidade de TPH (hidrocarbonetos totais do petróleo), sendo esses compostos compreendidos entre C<sub>8</sub> – C<sub>28</sub>, e de ésteres totais no início (tempo zero) e no final do experimento (após 60 dias de incubação). No tratamento B0, foi quantificado apenas TPH; no tratamento B100, apenas ésteres totais e, no B20, ambas as avaliações foram realizadas. As análises foram comparadas ao padrão primário dos mesmos lotes dos combustíveis utilizados nos experimentos de biodegradação. O cálculo do percentual de degradação após 60 dias de incubação foi de acordo com a fórmula:

$$\% = \frac{DTF - DTI}{DTF} \times 100$$

Sendo DTF = valores do tempo final (60 dias) e DTI – valores do tempo zero.

Para a determinação de ésteres totais, foi utilizado o cromatógrafo Dani GC 1000 Digital Pressure Control (DPC), detector FID, injetor Linear Programmed Temperature Vaporizer (L-PTV), apresentando programação de temperatura e pressão durante a injeção com *split* de 1:15 (injetor L-PTV: 118°C/0.75 min., aq 999°C/min. 175°C/20min.) e com coluna DB-Wax (30 m x 0.32 mm X 0.25 um); e forno (*oven*) com temperatura inicial da coluna de 50°C/6 min. e temperatura final 230°C, com taxa de 5°C/min.; tempo de retenção de 6 min.; temperatura de detecção de 260°C; fluxo de gás (N<sub>2</sub>) de 10 mL/min. e tempo de corrida de 50 min., seguindo a metodologia ASTM D 6584 e EN 14110.

Para a determinação de TPH, foi utilizado o mesmo cromatógrafo descrito acima, apresentando programação de temperatura e pressão durante a injeção com *split* de 1:2 (injetor L-PTV: 70°C/0.75min., aq 999°C/min., 350°C/3min.); e forno (*over*) com temperatura inicial da coluna de 45°C/1min. e temperatura final de 300°C; temperatura de detecção de 325°C; fluxo de gás (N<sub>2</sub>) 2.0mL/min. e tempo de corrida de 41min., utilizando a metodologia EPA 8015 B.

### **3.3 Identificação bacteriana por técnicas moleculares**

Foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificar um fragmento da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA, a fim de identificar quatro isolados que compuseram um consórcio bacteriano.

#### **3.3.1 Extração do DNA cromossômico**

Os procedimentos de extração seguiram o protocolo de Sambrook et al. (1989). As células foram inoculadas em erlenmeyer, contendo 20 mL de meio BHI (Anexo 7), sendo incubadas a 37 °C em agitação de 120 r.p.m. durante 24 h.. Posteriormente, as células foram centrifugadas durante 10 min. a 5000 r.p.m. O sobrenadante foi desprezado, e as células bacterianas foram lavadas com NaCl 1 M. As células centrifugadas foram ressuspensas em TE 1X (Anexo 8), sendo adicionado SDS a uma concentração final de 1% e lisozima (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>). A mistura foi incubada a 37 °C em banho com água por

1 h. Após o banho, foi adicionada proteinase K (0,6 mg/mL) e novamente incubada na mesma temperatura por 15 min.. Posteriormente, um volume de fenol foi adicionado na mistura, homogeneizado e centrifugado por 10 min. a 5000 r.p.m. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífugas, sendo realizada uma nova extração com fenol, uma com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1) e duas extrações com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após, foi adicionado isopropanol (0,7 volumes) ao sobrenadante, sendo a mistura armazenada à temperatura de – 18°C durante a noite e, depois, centrifugada. O isopropanol foi desprezado, e o DNA foi seco à temperatura de 28 °C, sendo logo após ressuspendido em 50 µL de TE 1X.

### **3.3.2 Sequenciamento da região do DNA que codifica o gene 16S**

#### **rRNA**

As bactérias selecionadas foram identificadas com base nas características morfológicas e bioquímicas conforme Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989) e MacFaddin (2000) (Anexo 9). Além disso, para corroborar os resultados por determinação bioqu, foi realizada a amplificação parcial do gene 16S rRNA por técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, empregando os oligonucleotídeos universais 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'). A mistura da reação foi constituída por tampão 1X, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U *Taq* polimerase, 0.2 mM de cada oligonucleotideo, 0.3 mM desoxinucleotideo, e 20

ng DNA. O volume final da reação foi de 25 mL. As condições de amplificação sofreram desnaturação inicial por 5 min. a 94 °C; 35 ciclos a 1 min. a 94 °C; 1 min. a 52 °C e 2 min. a 72 °C; com uma extensão final a 72 °C por 10 min. O produto da reação foi detectado em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. As reações de PCR foram lidas em sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* no Laboratório ACTGene do Centro de Biotecnologia da UFRGS. As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas, utilizando o programa ChromaPro 1.5 e sendo as sequências comparadas com as sequências de nucleotídeos de espécies de referência obtidas EMBL/GenBank database, usando NCBI BLAST.

### **3.4 Análise estatística**

Os dados foram interpretados a partir da análise da variância (ANOVA) e pelo *teste t* de Tukey com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) para comparar as médias entre os tratamentos, sendo utilizado o programa estatístico Sisvar, versão 4.6 (Build 60).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Seleção de um consórcio bacteriano

#### 4.1.1 Pré-seleção microbiana por indicadores-redox e crescimento celular

Das 24 bactérias isoladas de fontes de contaminação por hidrocarbonetos e ésteres, 10 (7 isolados a partir de uma célula de *landfarming* e 3 isolados a partir de um sedimento formado pela centrifugação de biodiesel) foram selecionadas por indicadores-redox (TTC e DCPIP) (Tabela 2 e Figura 14), a fim de avaliar a capacidade de biodegradação das misturas de diesel/biodiesel (B0, B20 e B100), por meio do crescimento celular, da produção de biossurfactantes de baixa massa molecular, de biossurfactantes de alta massa molecular (bioemulsificantes), da produção de metabólitos por meio da medição de pH e da hidrofobicidade durante 14 dias (Figura 15). Além disso, pela razão de no tratamento B20 existir tanto a fração diesel quanto a fração biodiesel, foi determinada a atividade enzimática específica de seis enzimas (alcano hidrocaxilase, catecol 1,2 dioxigenase, catecol 2,3 dioxigenase, protocatecol 3,4 dioxigenase, esterase (hidrólise do p-NPA) e

lipase (liberação de ácidos graxos), além de todas as outras análises realizadas em B0 e B100 citadas acima.

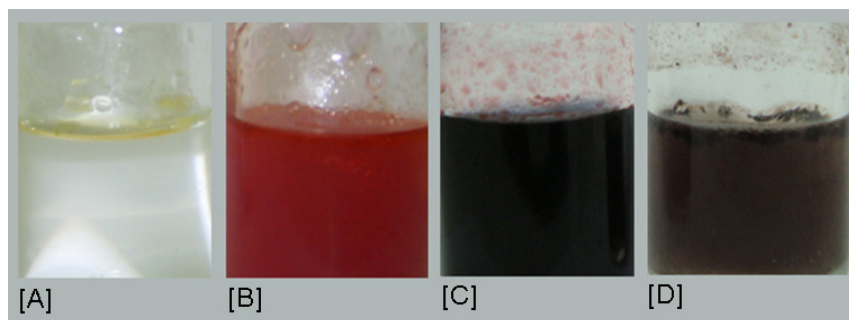


Figura 14: Demonstração da mudança de coloração a partir da reação de redução em dois indicadores-redox (DCPIP e TTC). [A] Controle TTC; [B] Isolado 9 após 144 horas com o indicador TTC; [C] Controle DCPIP; [D] Isolado 5 após 144 horas com o indicador DCPIP.

Tabela 2: Seleção Preliminar de Isolados Bacterianos, utilizando dois indicadores-redox, TTC e DCPIP, em meio mineral (MM1) e biodiesel puro como fonte de carbono (B100).

Indicador-redox Isolados	TTC		DCPIP		
	24h	72h	48h	72h	120h
1 <sup>b</sup>	+ <sup>a</sup>				
2 <sup>b</sup>	+		+		
3 <sup>b</sup>	+				
4 <sup>b</sup>	+		+		
5 <sup>b</sup>	+		+		
6 <sup>b</sup>					+
7 <sup>b</sup>	+		+		
8 <sup>c</sup>	+		+		
9 <sup>c</sup>	+			+	
10 <sup>c</sup>	+				

<sup>a</sup> Início da mudança de coloração do indicador-redox nas primeiras 24 h (TTC)/48 h, 72 h e 120 h (DCPIP);

<sup>b</sup> Isolado a partir de uma célula de *Landfarming*, contaminada por resíduos petroquímicos há 20 anos;

<sup>c</sup> Isolado a partir de um sedimento formado pela centrifugação de biodiesel.



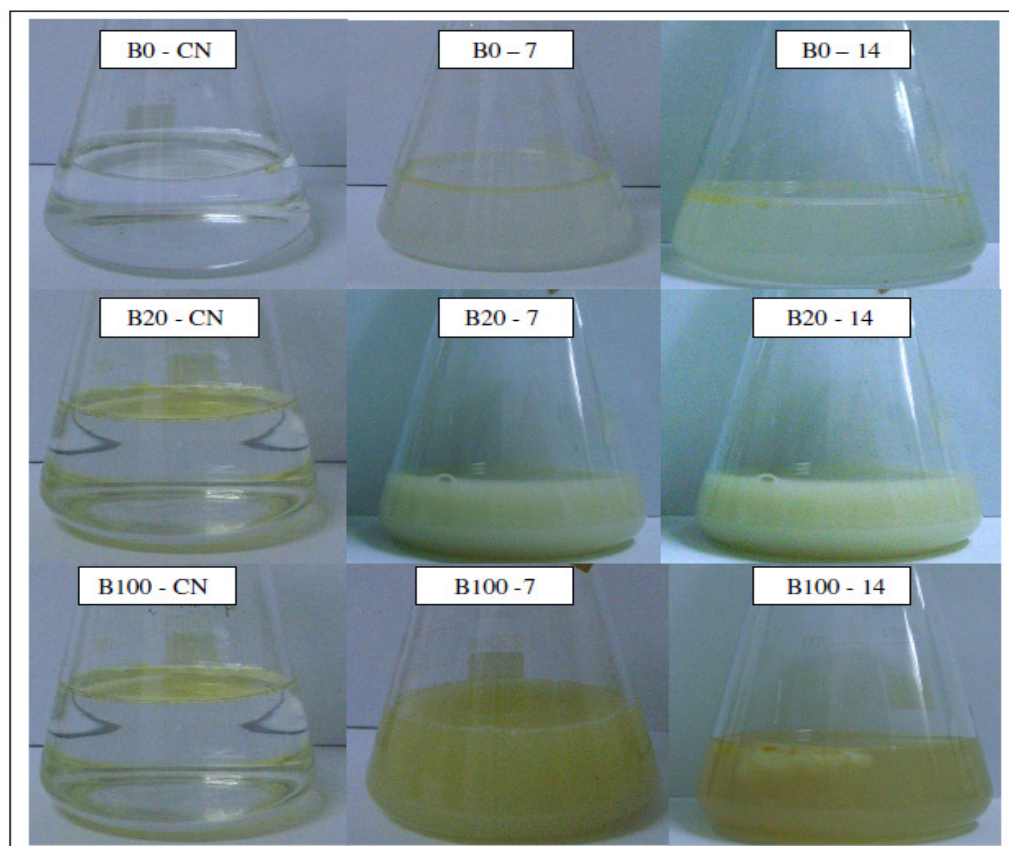


Figura 15: Crescimento de *Bacillus megaterium* em meio aquoso sob três diferentes tratamentos (B0, B20 e B100) nos tempos 7 e 14 dias. CN (controle negativo): MM1 + 1% de combustível.

Em relação ao crescimento celular, observou-se que todos os isolados avaliados utilizaram, de alguma forma, as fontes de carbono encontradas nas misturas B0, B20 e B100. Isso pode ser verificado, uma vez que houve um aumento na produção de proteínas totais avaliadas nos tempos 1, 7 e 14 dias. Além disso, observou-se aumento na produção de proteínas totais ( $\text{mg de proteínas} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) para seis isolados, 1, 4, 6, 7, 8 e 10, à medida que foi aumentada a concentração de biodiesel na mistura no tempo 14 dias, quando foram comparados os valores entre os tratamentos ( $B100 > B20 > B0$ )

(Figuras 16 – 18). Também é importante considerar o crescimento dentre os 10 micro-organismos para cada tratamento no final do experimento (14 dias): para B0, houve os maiores crescimentos para os isolados 8 (0,102) e 5 (0,090), embora entre eles não tenham sido observadas diferenças significativas (Figura 16). Para B20, foi detectado um crescimento mais expressivo em seis isolados: 1 (0,339), 2 (0,314), 7 (0,215), 6 (0,171), 8 (0,168) e 5 (0,122) (Figura 17). Para B100, os isolados 1 (0,997), 5 (0,373), 7 (0,334) e 2 (0,289) foram os que apresentaram maior produção para proteínas (Figura 18). Além disso, é perceptível que o isolado 1 obteve o maior crescimento tanto para o tratamento B20 quanto para o B100. Por outro lado, três isolados bacterianos (3, 9 e 10) obtiveram redução significativa de crescimento ao comparar a quantidade de proteínas detectadas entre os tempos 7 e 14 dias em B20 (Figura 17), e o mesmo isolado 10 sofreu redução significativa no mesmo período para o tratamento B100 (Figura 18).

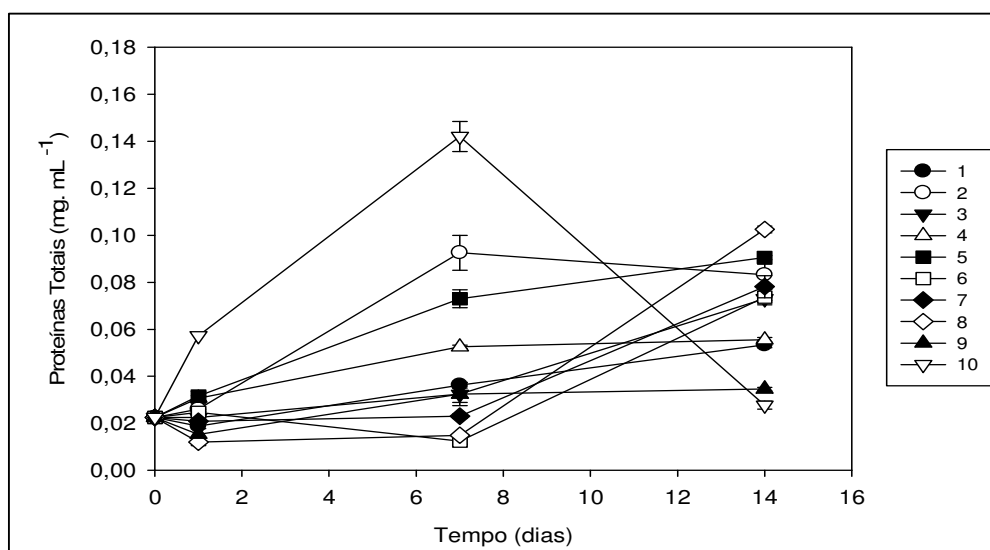


Figura 16: Produção de proteínas totais de 10 isolados bacterianos, incubados em meio mineral + 1% de diesel (B0) por até 14 dias.

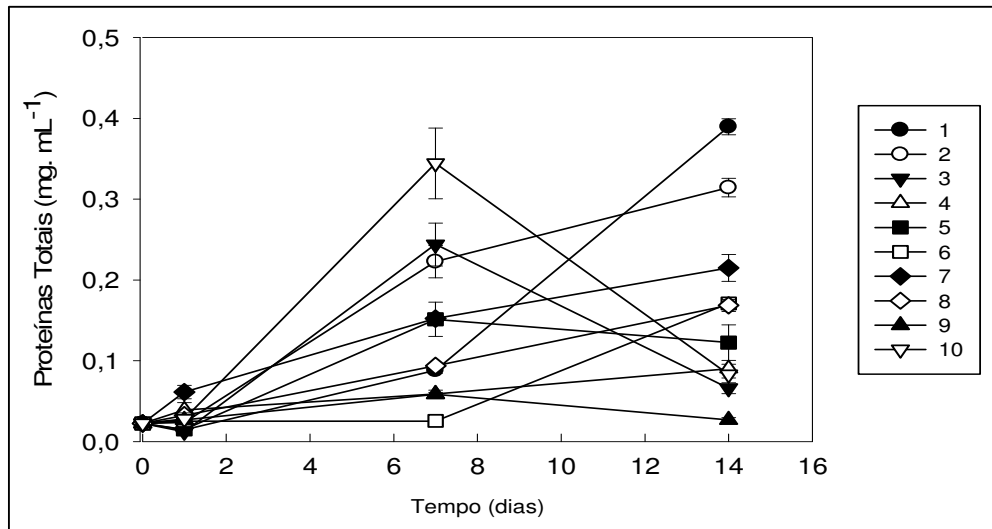


Figura 17: Produção de proteínas totais de 10 isolados bacterianos, incubados em meio mineral + 1% de diesel (B20) por até 14 dias.

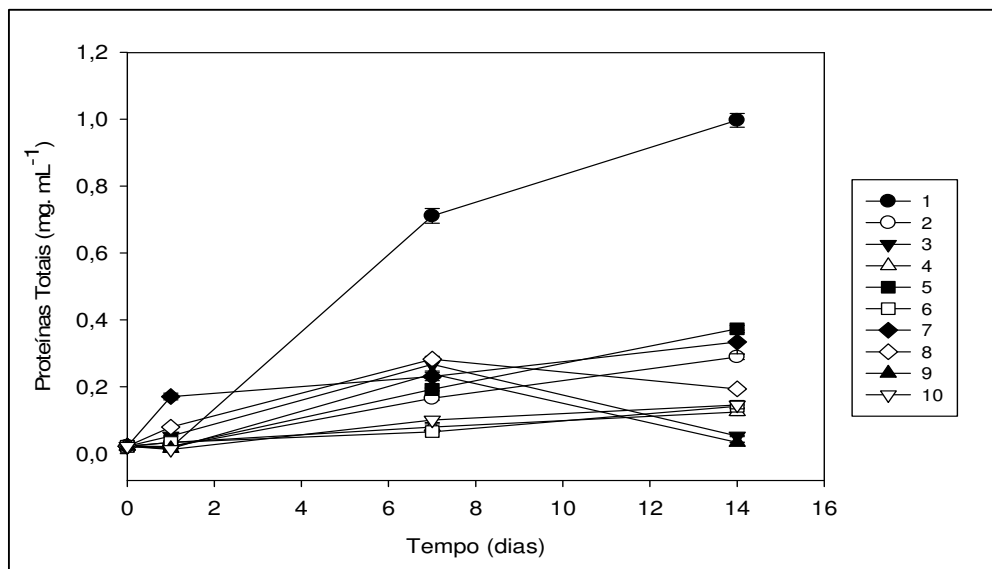


Figura 18: Produção de proteínas totais de 10 isolados bacterianos, incubados em meio mineral + 1% de diesel (B100) por até 14 dias.

#### 4.1. 2 Produção de biossurfactantes

Dos resultados obtidos para avaliar a produção de biossurfactantes de baixa massa molecular, utilizou-se a medida de tensão superficial. É importante considerar, antes de mais nada, que o biodiesel, presente nos tratamentos B20 e B100, apresenta propriedades físico-químicas que contribuem para a redução intrínseca da tensão superficial, dificultando, de certa forma, identificar variações na produção de surfactantes sintetizados por micro-organismos. Essa constatação é reforçada nos trabalhos de Bücken et al. (2009, 2011). Estudos têm indicado que o tipo de meio de cultivo e as condições de crescimento podem influenciar o tipo e a produção dessas macromoléculas (Makkar & Cameotra, 1998). Para B0, não foi observada diminuição na tensão superficial para nenhum dos 10 isolados até 14 dias de incubação, tendo em consideração o valor de  $41,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para o controle negativo e uma variação de  $41 - 58 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  entre os isolados (Figura 19). Neste estudo, entretanto, para o tratamento B20, três isolados (1, 2 e 5) obtiveram níveis significativos para a redução da tensão superficial em relação ao controle negativo (somente combustível ao MM1) e aos demais isolados (Figuras 20). Observou-se uma redução relativa da tensão superficial quando amostras com biodiesel presente em solução aquosa são comparadas com medidas de tensão superficial da água (de  $69$  a  $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) (Bodour et al., 2003) e do próprio meio mineral (em torno de  $65 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Mesmo diante dessas circunstâncias, os isolados 1, 2 e 5 apresentaram menores médias para a tensão superficial ( $28,8$ ;  $29,8$  e  $30,6$  para 7 dias;  $30$ ;  $30,2$  e  $30,26$  para 14

dias, respectivamente) em relação ao controle ( $39,7 \text{ mN.m}^{-1}$  no final do experimento). Finalmente para B100, houve uma redução significativa a partir do sétimo dia de incubação para os isolados 5 ( $29,46$ ), 1 ( $29,80$ ), 2 ( $30,33$ ), 8 ( $31,26$ ) em relação ao controle negativo ( $43,46 \text{ mN.m}^{-1}$ ). Para o mesmo tratamento no 14º dia, houve a redução na tensão superficial também para o isolado 4 ( $30,70$ ) em relação ao controle negativo ( $39,36$ ), mantendo os baixos índices de tensão superficial ( $< 31 \text{ mN.m}^{-1}$ ) para os demais isolados (Figura 21).

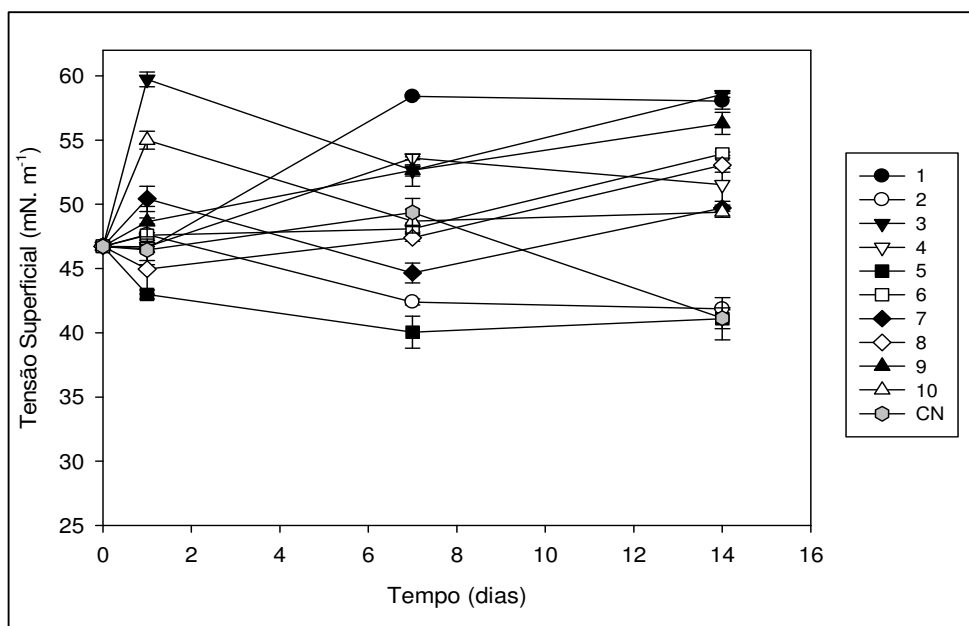


Figura 19: Tensão superficial de 10 isolados bacterianos com respectivo controle negativo (CN), incubados em meio mineral + 1% de diesel (B0) por até 14 dias.

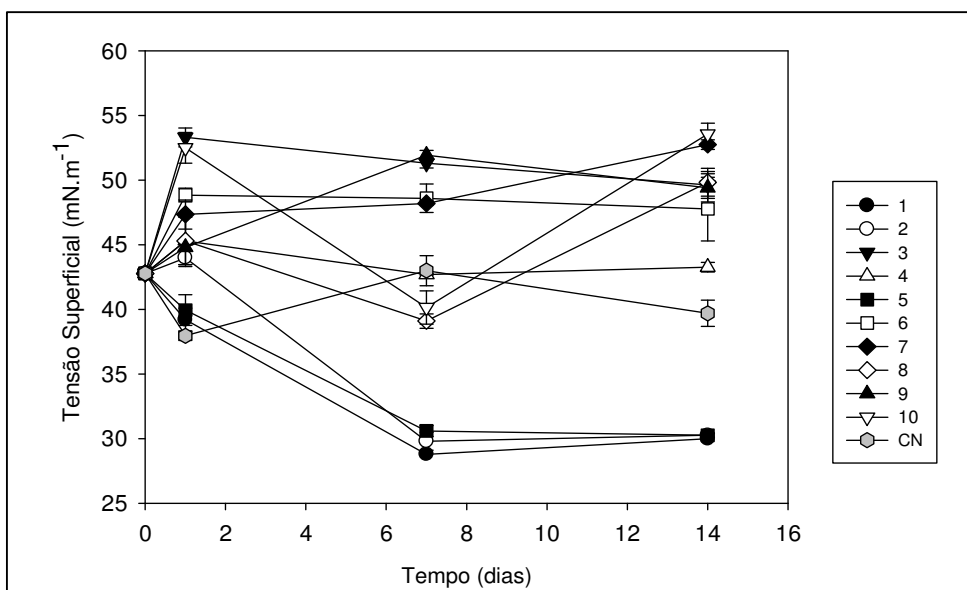


Figura 20: Tensão superficial de 10 isolados bacterianos com respectivo controle negativo (CN), incubados em meio mineral + 1% de diesel (B20) por até 14 dias.

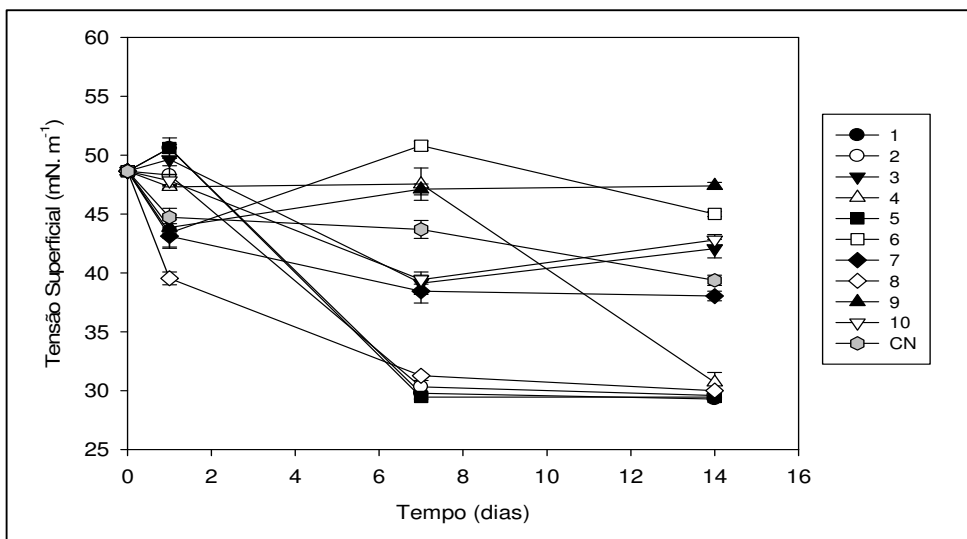


Figura 21: Tensão superficial de 10 isolados bacterianos com respectivo controle negativo (CN), incubados em meio mineral + 1% de diesel (B100) por até 14 dias.

Os isolados que apresentaram baixos valores para tensão superficial foram bons produtores de biossurfactantes nessas condições, uma vez que os

resultados encontrados foram consonantes com a literatura (Van Dyke et al., 1993; Makkar & Cameotra, 1998).

Ao avaliar a presença de biossurfactantes de alta massa molecular, observou-se uma prevalência de 80% dos isolados por apresentarem algum valor para o Índice de Emulsificação (Tabela 3). Dos resultados positivos, pode-se observar que dos bioemulsificantes tanto ligados à parede celular quanto àqueles liberados extracelularmente (sobrenadante na ausência de células), foi verificado um aumento no número de isolados que sofreram emulsificações com índice superior a 40% à proporção que a concentração do biodiesel foi aumentada na mistura diesel/biodiesel. Dado os resultados para biossurfactantes ligados à parede, esses valores com  $IE_{24} > 40\%$  foram detectados para o isolado 10 (tratamento B0); para os isolados 1, 7 e 10 (B20) e para 1, 7, 8, 9 e 10 (B100). Por outro lado, a fim de avaliar os biossurfactantes liberados extracelularmente, o isolado 7 obteve resultados expressivos para B0; 1, 7 para B20 e 1, 7, 9 e 10 para B100, considerando todos esses valores após 14 dias de incubação, embora, para alguns isolados, índices de emulsificação superiores a 40% puderam ser observados a partir do sétimo dia de experimento (Tabela 3).

Tabela 3: Índice de Emulsificação (%) para 10 isolados bacterianos

Isolado	Tempo (dias)	Índice de Emulsificação % ( $IE_{24}$ )		
		Com células		
		B0	B20	B100
1	14	22,45 ± 3,32	60,86 ± 0	56,51 ± 12,29
3	14	18,15 ± 0		11,16 ± 3,49
6	7			23,91 ± 9,22
	14		27,27 ± 0	
7	1			11,72 ± 4,91
	7		43,18 ± 9,64	

	14		40,11 ± 7,54	62,31 ± 5,01
8	7		34,78 ± 6,15	
	14		26,08 ± 0	44,46 ± 1,40
9	7			47,82 ± 0
	14	13,04 ± 0		63,04 ± 0
10	7	4,54 ± 0	9,09 ± 0	44,92 ± 2,50
	14	54,54 ± 0	49,99 ± 6,12	63,63 ± 0
Isolado		Sem células		
Tempo (dias)		B0	B20	B100
1	14	20,28 ± 2,50	65,21 ± 0	63,03 ± 3,07
3	14		26,08 ± 0	24,15 ± 2,73
4	14	8,69 ± 0	8,69 ± 0	
6	7			31,81 ± 0
	14		38,4 ± 7,17	
7	1			36,36 ± 0
	7		34,78 ± 0	58,95 ± 13,49
	14	65,21 ± 0	43,47 ± 0	65,21 ± 0
8	7		22,72 ± 0	
	14		9,09 ± 0	
9	7			47,82 ± 0
	14			60,86 ± 0
10	7			13,04 ± 0
	14		18,18 ± 0	46,96 ± 14,61

#### 4. 1. 3 Avaliação do percentual de hidrofobicidade

O percentual de hidrofobicidade celular é um método indireto para avaliar a degradação do contaminante orgânico hidrofóbico, como o diesel e o biodiesel, dado que, quanto maior a hidrofobicidade celular, maior a possibilidade de a célula produzir um biossurfactante e estar ligado à sua parede, interagir com o contaminante e/ou aderir-se a superfícies hidrofóbicas, formando biofilmes para iniciar uma biodegradação. Assim, ao avaliar a hidrofobicidade celular dos 10 isolados após 14 dias de incubação, foram detectados altos percentuais relativos nos três tratamentos (B0, B20 e B100), variando de 82,11 -100,0 (B0), 53,22 – 96,50 (B20) e 69,04 – 98,21 (B100),



sendo observadas taxas para a hidrofobicidade mais elevadas para B0 quando cada um dos 10 isolados foi comparado entre os tratamentos. Dessa forma, o tratamento B0 mostrou-se estatisticamente mais hidrofóbico para, pelo menos, um tratamento (B20 e/ou B100), considerando sete isolados (1, 2, 5, 6, 7, 8 e 9). Além disso, os maiores índices de hidrofobicidade celular foram encontrados para os isolados 1, 6, 7, 8 e 9 (B0), 1, 2, 3 e 5 (B20) e 5 e 9 (B100) (Figuras 22 – 24).

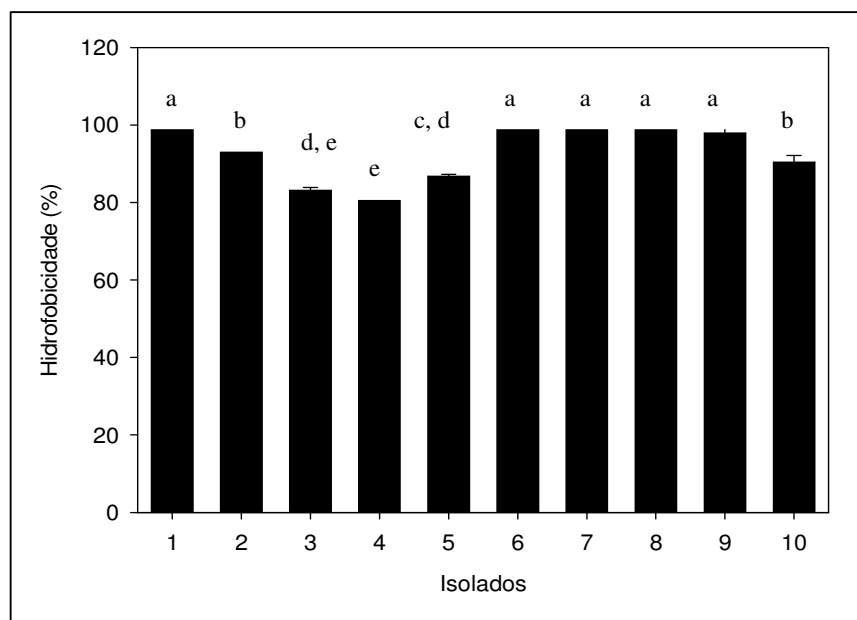


Figura 22: Percentagem de hidrofobicidade da parede celular para 10 isolados, utilizando solvente de baixa polaridade (clorofórmio), submetido ao tratamento B0.

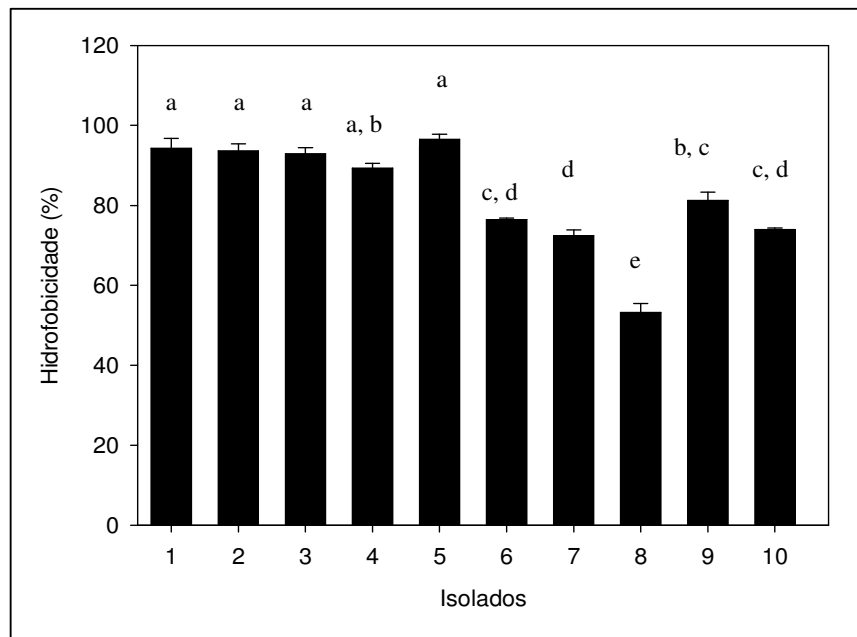


Figura 23: Percentagem de hidrofbicidade da parede celular para 10 isolados, utilizando solvente de baixa polaridade (clorofórmio), submetido ao tratamento B20.

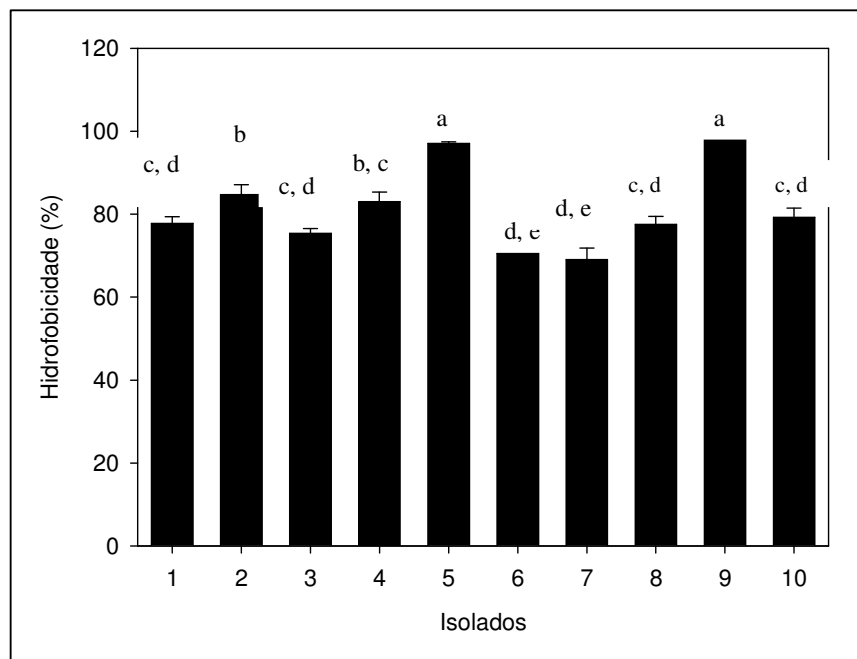


Figura 24: Percentagem de hidrofbicidade da parede celular para 10 isolados, utilizando solvente de baixa polaridade (clorofórmio), submetido ao tratamento B100.

#### 4.1.4 Detecção de metabólitos

Para avaliar a produção de metabólitos ácidos como uma forma indireta de verificar a atividade da biodegradação das misturas de diesel e biodiesel, foi realizada a medida do pH em meio aquoso (meio mineral MM1 + combustível + micro-organismo) nos tempos 1, 7 e 14 dias. De acordo com os resultados, não foram encontrados valores estatisticamente distintos dentre os tratamentos B0, B20 e B100 após os 14 dias de incubação, tampouco foram observadas diferenças de pH entre os isolados avaliados para cada tratamento. Além disso, não foi constatada nenhuma diferença de pH entre os isolados em relação ao controle depois de 14 dias (Figuras 25 – 27).

Antes da montagem do experimento de biodegradação, o meio mineral foi ajustado a pH 7,2 e posteriormente autoclavado a 120 °C por 20 minutos. Após a esterilização do meio mineral, foram observadas leves variações de pH. Segundo os resultados após 14 dias de incubação, foram detectadas variações nos valores de pH de 6,91 – 7,19 (B0), 6,86 – 7,12 (B20) e 6,71 – 7,07 (B100), sendo que os valores dos controles negativos foram respectivamente 7,38; 7,44 e 7,44 para o mesmo período de avaliação (Figuras 25 – 27).

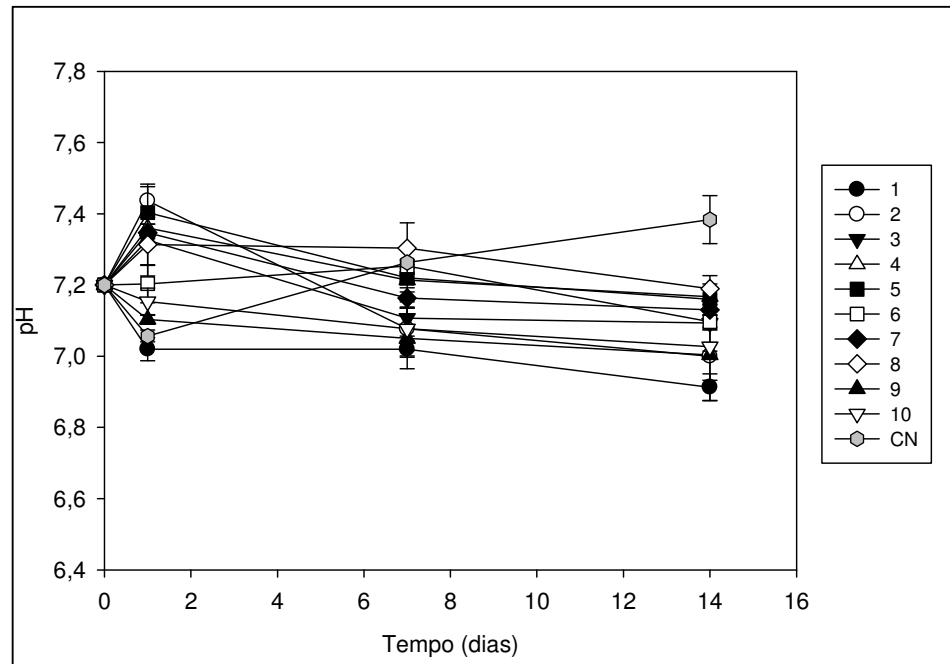


Figura 25: pH de 10 isolados bacterianos com o respectivo controle negativo (CN), incubados em meio mineral + 1% de diesel (B0) por até 14 dias.

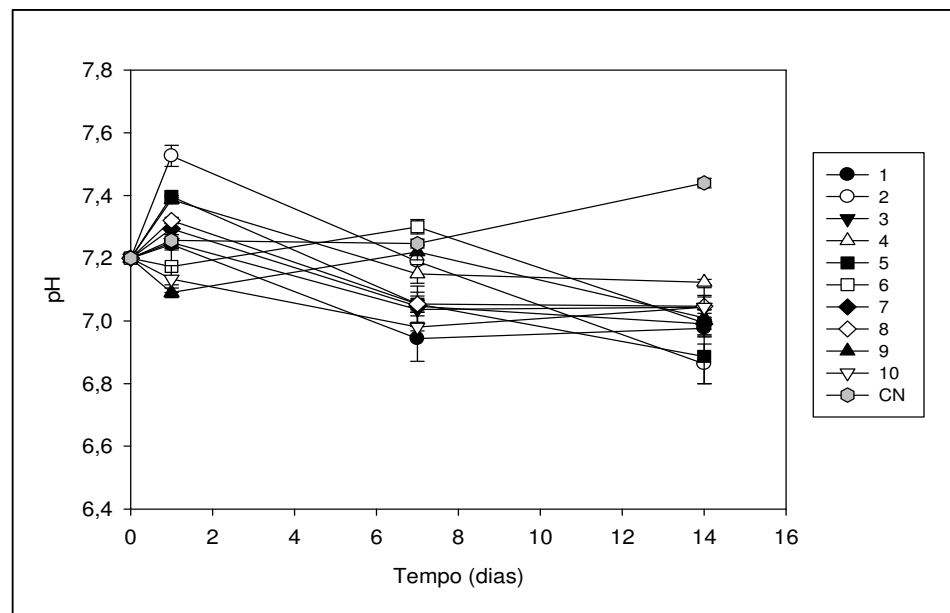


Figura 26: pH de 10 isolados bacterianos com o respectivo controle negativo (CN), incubados em meio mineral + 1% de diesel (B20) por até 14 dias.

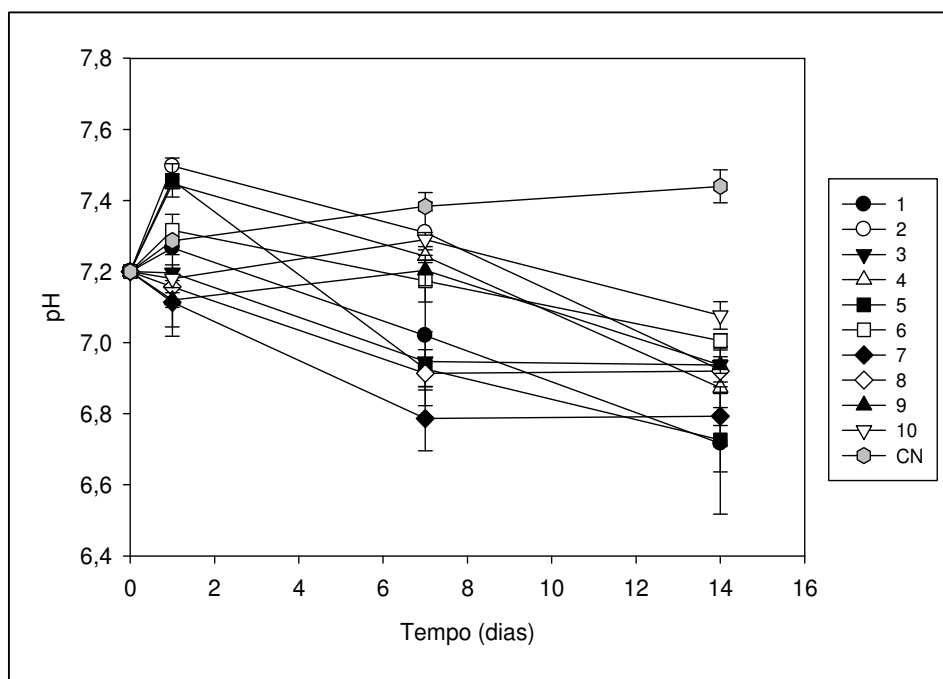


Figura 27: pH de 10 isolados com o respectivo controle negativo (CN), incubados em meio mineral + 1% de diesel (B100) por até 14 dias.

#### 4.1.5 Determinação da atividade enzimática

Para avaliar a capacidade de hidrólise de ésteres, os 10 isolados dos tratamentos B20 e B100 foram incubados em placa de *petri* e monitorados nos tempos 1, 7 e 14 dias. O resultado positivo para a atividade enzimática pode ser verificado quando, ao redor da colônia bacteriana, formou-se um halo de emulsão opaco, devido à interação das esterases produzidas e o substrato tween 80. Segundo consta na Tabela 4, a maioria dos isolados apresentou resultado positivo após 14 dias, salvo os isolados 3 e 7. Este último, apenas para o tratamento B20. Todavia, os isolados 4, 8 e 9 apresentaram capacidade de hidrolisar ésteres a partir do primeiro dia de avaliação após a incubação.

Tabela 4: Presença das enzimas esterase em meio de cultura.

Tratamento	Esterase (dias)		
	1	7	14
1 <sup>a</sup> (B20)	-	-	+
(B100)	-	-	+
2 (B20)	-	+	+
(B100)	-	+	+
3 (B20)	-	-	-
(B100)	-	-	-
4 (B20)	+	+	+
(B100)	+	+	+
5 (B20)	-	+	+
(B100)	-	+	+
6 (B20)	-	-	+
(B100)	-	+	+
7 (B20)	-	-	-
(B100)	-	+	+
8 (B20)	+	+	+
(B100)	+	+	+
9 (B20)	+	+	+
(B100)	+	+	+
10 (B20)	-	+	+
(B100)	-	+	+

<sup>a</sup> isolado

Foi avaliada a atividade enzimática específica apenas para o tratamento B20, uma vez que nessa mistura é encontrada tanto a fração diesel quanto a do biodiesel. Dessa forma, as enzimas alceno hidroxilase, C1,2O, C2,3O e P3,4O fazem parte do processo de degradação de hidrocarbonetos presentes na fração diesel da mistura. Ao avaliar a atividade relativa da alceno hidroxilase, enzima responsável por degradar preferencialmente alcanos, foram observados maiores valores médios para três isolados: 1 (100%), 6 (72,36%) e 2 (47,9%). Dos resultados para a enzima C12O, foi observada uma produção mais expressiva para os isolados 1 (100%), 2 (38,5%), 6 (36%) e 5 (29%). Considerando a enzima C2,3O, os isolados 6 (100%), 5 (91%) e 2 (88%) foram

os que apresentaram uma melhor desempenho para a produção dessa enzima degradadora de hidrocarbonetos aromáticos, embora não tenha se encontrado diferença significativa para a expressão entre elas. Para a P3,4O, quatro isolados bacterianos se destacaram: 1 (100%), 5 (94%), 9 (55,6%) e 2 (50%).

Além disso, foi monitorada a biodegradabilidade do conteúdo lipídico da fração biodiesel por enzimas de natureza esterásica e lipásica, sendo obtidos níveis mais representativos da atividade de esterases para os isolados 2 (100%) e 1 (6,5%). Embora o isolado 1 não tenha apresentado diferença significativa em relação aos demais, ele apresentou o segundo maior valor para a atividade de hidrólise do *p*-NPA. Já os isolados 9 (100%), 1 (94%), 6 (63%), 2 (60%) e 5 (53%) foram os que mais se destacaram na produção de lipases pelo método titulométrico, ainda que os três últimos isolados não tenham apresentado diferenças significativas entre si.

Realizando uma comparação entre as diferentes atividades para enzimas que são responsáveis por degradar a fração diesel, pode-se observar que todos os isolados apresentaram altos níveis médios de expressividade para a atividade de alceno hidroxilase (1996 – 23983,31 U. mg<sup>-1</sup>), quando comparados aos valores para C1,2O (3,16 – 59,33 U. mg<sup>-1</sup>), C2,3O (31,96 – 159,09 U. mg<sup>-1</sup>) e P3,4O (2,78 – 67,12 U. mg<sup>-1</sup>). Já dentre as dioxigenases, verificou-se que a C2,3O apresentou valores mais elevados para a atividade enzimática, considerando os resultados dos isolados 6, 5 e 2, respectivamente. Dada a degradação da porção biodiesel na mistura, foi possível comparar os melhores níveis de atividade enzimática para a degradação de ésteres e para a

liberação de ácidos graxos, destacando os isolados 1, 6 e 9, os quais apresentaram os maiores valores para ambas as enzimas (Tabela 5).

Tabela 5: Determinação da atividade específica (U mg<sup>-1</sup> de proteínas totais) de seis enzimas em três diferentes tempos de incubação (1, 7 e 14 dias) da mistura B20.

	AH <sup>1</sup>	C1,20	C2,30	P3,40	pNPA	AG <sup>2</sup>
1 <sup>a</sup>	69407 ± 0 <sup>b</sup>	177 ± 35,8	0 ± 0	188,6 ± 38,4	5104 ± 854	403 ± 62,2
	2449 ± 558 <sup>c</sup>	0,28 ± 0	6,37 ± 0,46	11,85 ± 5,14	171,8 ± 46,2	48,2 ± 13,8
	93,37 ± 4,4 <sup>d</sup>	0,72 ± 0,11	3,22 ± 0,16	0,91 ± 0,37	489,3 ± 0	8,65 ± 3,75
	<b>23983,31<sup>e</sup></b>	<b>59,33</b>	<b>3,19</b>	<b>67,12</b>	<b>1921,7</b>	<b>153,28</b>
2	33034 ± 718	64,62 ± 14	323,3 ± 0	91,67 ± 15,8	88289 ± 966	254,4 ± 57
	1103 ± 78	1,41 ± 0,02	15,2 ± 12,6	4,07 ± 0,92	217,7 ± 2,44	21,5 ± 6,07
	334,87 ± 0	2,5 ± 0,34	81,5 ± 25,3	5,05 ± 1,74	59,41 ± 2,94	14,89 ± 0
	<b>11490,62</b>	<b>22,84</b>	<b>140</b>	<b>33,59</b>	<b>29522,03</b>	<b>96,93</b>
3	6117 ± 1407	10,4 ± 0,96	22,6 ± 2,7	3 ± 2,2	312,55 ± 0	23,03 ± 0
	245 ± 13,4	1,06 ± 0,24	7,64 ± 1,26	1,27 ± 0,13	93,4 ± 37,24	20,9 ± 7
	2952 ± 392	2,54 ± 0,12	25,6 ± 2,01	4,08 ± 1,35	373 ± 57,36	16,5 ± 0
	<b>3104,66</b>	<b>4,66</b>	<b>18,61</b>	<b>2,78</b>	<b>259,65</b>	<b>20,14</b>
4	6132 ± 285	13,4 ± 0,82	6,97 ± 1,39	14,34 ± 2,24	38,1 ± 11,06	78,9 ± 23,4
	2504 ± 796	5,04 ± 1,8	16,9 ± 2,89	4,24 ± 2,55	351,18 ± 85	65,08 ± 0
	476 ± 134	5,91 ± 2,09	35,4 ± 4,38	6,56 ± 3,96	80,02 ± 2,77	16,5 ± 0
	<b>3037,33</b>	<b>8,11</b>	<b>19,75</b>	<b>3,38</b>	<b>156,43</b>	<b>53,49</b>
5	2982 ± 0	34,7 ± 12	335 ± 67,5	153,5 ± 0	413,5 ± 98,8	210,04 ± 0
	2444 ± 0	2,2 ± 1,34	13,1 ± 4,76	7,64 ± 0,09	1012,08 ± 0	26,79 ± 0
	562 ± 0	14,4 ± 4,36	85,1 ± 41,8	28,95 ± 7,89	310 ± 52,96	22,09 ± 0
	<b>1996</b>	<b>17,1</b>	<b>144,4</b>	<b>63,36</b>	<b>578,52</b>	<b>86,30</b>
6	43222 ± 0	59,9 ± 7,66	392,9 ± 0	15,52 ± 1,77	1368 ± 32,6	162,4 ± 54
	6770 ± 0	3,49 ± 1,15	80,5 ± 13,3	10,13 ± 1,79	1871,5 ± 0	127,2 ± 55
	2075 ± 302	1,07 ± 0,04	3,87 ± 0,71	1,58 ± 0,65	39,83 ± 3,5	18,51 ± 0
	<b>17355,66</b>	<b>21,48</b>	<b>159,09</b>	<b>9,12</b>	<b>1093,11</b>	<b>102,70</b>
7	9471 ± 237	18,53 ± 0	22,4 ± 7,96	9,24 ± 0,7	533 ± 1,13	51,33 ± 0
	2510 ± 0	1,52 ± 0	1,87 ± 0,56	4,36 ± 0,85	56,38 ± 4,41	0 ± 0



	1373 ± 165	1,09 ± 0,34	0,47 ± 0	0,63 ± 0,07	12,22 ± 3,87	0 ± 0
	<b>4451,33</b>	<b>7,04</b>	<b>8,25</b>	<b>4,74</b>	<b>200,53</b>	<b>17,11</b>
8	9241 ± 95,2	7,46 ± 2,98	70,03 ± 0	46,4 ± 16,7	960,4 ± 31	29,3 ± 0
	4620 ± 0	0,57 ± 0,11	14,7 ± 1,27	3,04 ± 0,88	587,6 ± 25,4	0 ± 0
	440 ± 0	1,79 ± 1,66	2,2 ± 0,65	1,23 ± 0,1	70,2 ± 17,4	33,77 ± 0
	<b>4767</b>	<b>3,27</b>	<b>28,97</b>	<b>16,89</b>	<b>539,4</b>	<b>21,02</b>
9	3927 ± 458	0 ± 0	87,36 ± 0	62,6 ± 0	63 ± 32,2	221 ± 37,9
	2602 ± 530	5,16 ± 0	19 ± 10,03	34,67 ± 20,02	2752 ± 196	25,46 ± 0
	2915 ± 0	19,8 ± 8,09	8,76 ± 0	14,72 ± 7,57	1145 ± 0	242,25 ± 0
	<b>3148</b>	<b>8,32</b>	<b>38,37</b>	<b>37,33</b>	<b>1320</b>	<b>162,9</b>
10	7906 ± 974	7,19 ± 0,26	49,73 ± 0	38,77 ± 8,86	1586 ± 98	100,34 ± 0
	1272 ± 208	0,30 ± 0,02	1,62 ± 0,24	0,46 ± 0,06	67,09 ± 4,26	13,94 ± 0
	8335 ± 436	1,99 ± 0,47	19,7 ± 3,43	2,09 ± 0,14	731 ± 96,5	35,9 ± 0
	<b>5837,66</b>	<b>3,16</b>	<b>23,68</b>	<b>13,77</b>	<b>794,69</b>	<b>50,06</b>

<sup>1</sup> atividade de alcano hidroxilase;

<sup>2</sup> atividade lipásica pela liberação de ácidos graxos por método titulométrico;

<sup>a</sup> isolado;

<sup>b</sup> média e desvio padrão da atividade enzimática após 24 h de incubação;

<sup>c</sup> média e desvio padrão da atividade enzimática após 7 dias de incubação;

<sup>d</sup> média e desvio padrão da atividade enzimática após 14 dias de incubação;

<sup>e</sup> média dos valores para os três diferentes dias de incubação (1°, 7° e 14° dias).

## 4. 2 Biorremediação de misturas de diesel/biodiesel (B0, B20 e B100) em dois tipos de solo

### 4. 2. 1 Avaliação da atividade cumulativa da produção de CO<sub>2</sub> por micro-organismos presentes no solo

Ao avaliar a produção cumulativa de CO<sub>2</sub> após 60 dias de incubação, foi observado que todos os resultados analisados apresentaram níveis de

atividade respiratória superiores aos respectivos controles negativos (ausência de combustível). Além disso, ao ponderar os níveis de produção cumulativa de CO<sub>2</sub> para as diferentes concentrações de diesel e biodiesel (B0, B20 e B100) e considerando os tratamentos com o mesmo solo e a mesma estratégia de biorremediação, pode-se verificar que tanto para o solo arenoso quanto para o solo argiloso, ambos sob Atenuação Natural, não foi observado aumento na taxa de liberação de CO<sub>2</sub> à medida que houve o aumento da concentração de biodiesel na mistura diesel/biodiesel, com exceção para o ARG B100 (Figura 28). No entanto, para a estratégia de Bioaugmentação nos dois solos analisados, verificaram-se diferenças na atividade microbiana entre as concentrações de combustível (B100 > B20 > B0) (Figura 29). Ao considerar a mesma concentração de combustível, observa-se um aumento progressivo na atividade cumulativa respiratória apenas para os tratamentos contendo B100 (B ARG > B ARE > A ARG > A ARE). Já para B0 e B20, foi observada a seguinte atividade respiratória, respectivamente: B ARG > B ARE = A ARG > A ARE e B ARG > B ARE = A ARG > A ARE (Figuras 28 e 29). Em linhas gerais, foi observado um incremento na atividade de liberação de CO<sub>2</sub> para o solo argiloso em comparação ao arenoso, não se esquecendo de considerar a presença/ausência de consórcio e dos nutrientes entre as duas estratégias de biorremediação.

Ainda, é importante levar em conta o progressivo aumento das taxas respiratórias dos micro-organismos no solo para cada tratamento em relação ao tempo de incubação. A partir das análises estatísticas ( $p < 0,05$ ), foram observados aumentos significativos ao longo do tempo a partir do 4º dia de

incubação até o final do experimento para os tratamentos para todos os quatro tratamentos B20. Da mesma forma, após 8 dias de incubação, foram observados taxas crescentes de liberação de  $\text{CO}_2$  para os tratamentos B ARE B0 e A ARG B0. Por outro lado, para todos os tratamentos B100, não foram verificados aumentos significativos da taxa respiratória ao longo do tempo, apresentando, dessa forma, taxas de produção de  $\text{CO}_2$  constantes ao longo do tempo. Mesmo assim, três dos tratamentos contendo B100 estiveram dentre os quatro maiores valores de produção cumulativa em mg de  $\text{CO}_2$ . Kg de solo seco<sup>-1</sup> no final dos 60 dias: B ARG B100 (3886,92), B ARG B20 (3661,26), B ARE B100 (3255,72), A ARG B100 (2982,56) (Figuras 28 e 29).

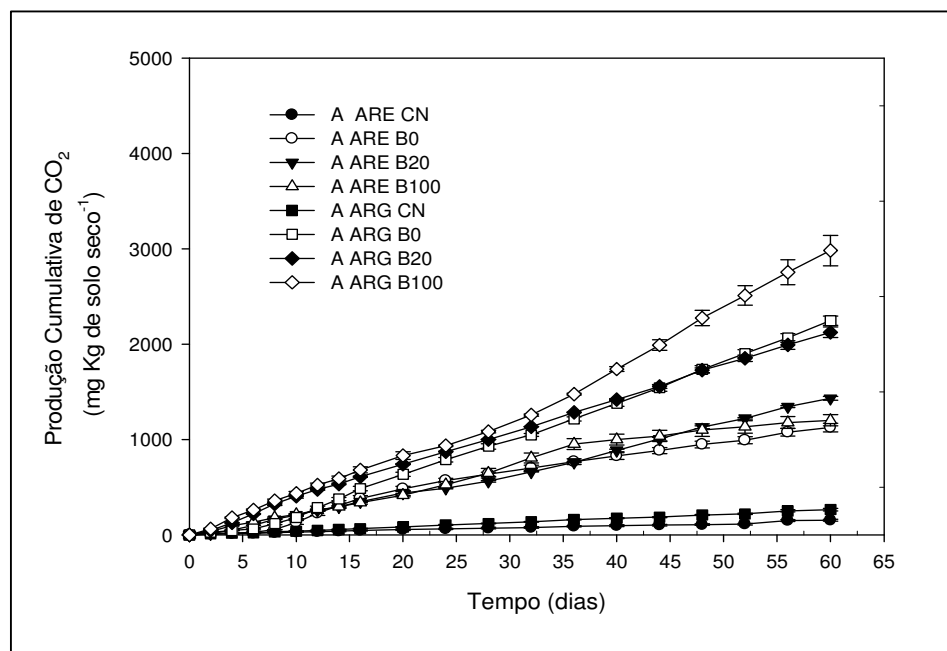


Figura 28: Produção cumulativa de  $\text{CO}_2$  por experimento respirométrico de Atenuação Natural em dois tipos de solos ao longo de 60 dias de incubação

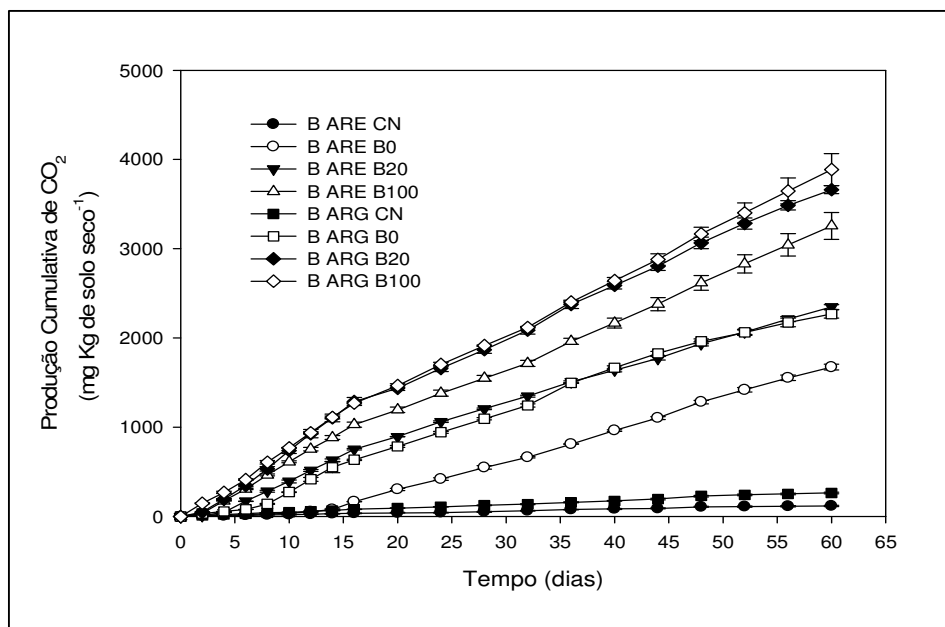


Figura 29: Produção cumulativa de CO<sub>2</sub> por experimento respirométrico de Bioaumentação em dois tipos de solos ao longo de 60 dias de incubação.

#### 4.2.2 Avaliação da atividade de desidrogenase

Os resultados da atividade enzimática do grupo das desidrogenases estão resumidos nas Figuras 30 – 33. Avaliando o comportamento dessas enzimas para a estratégia de Atenuação Natural de um modo geral foi observada uma tendência de diminuição da atividade de desidrogenase principalmente para os tratamentos ARE B100 e ARG B100 ao longo dos 60 dias de incubação (Figuras 30 e 31). Por outro lado, para o tratamento A ARG B20 e considerando ainda a mesma estratégia de biorremediação, verificaram-se valores enzimáticos expressivos tanto para o tempo zero quanto para tempo de 7 dias, seguido por uma redução abrupta na atividade enzimática no vigésimo primeira dia de incubação. No entanto, após essa queda repentina na

atividade, houve um aumento progressivo da expressão enzimática para esse tratamento ao longo do tempo até o final da incubação (Figura 31).

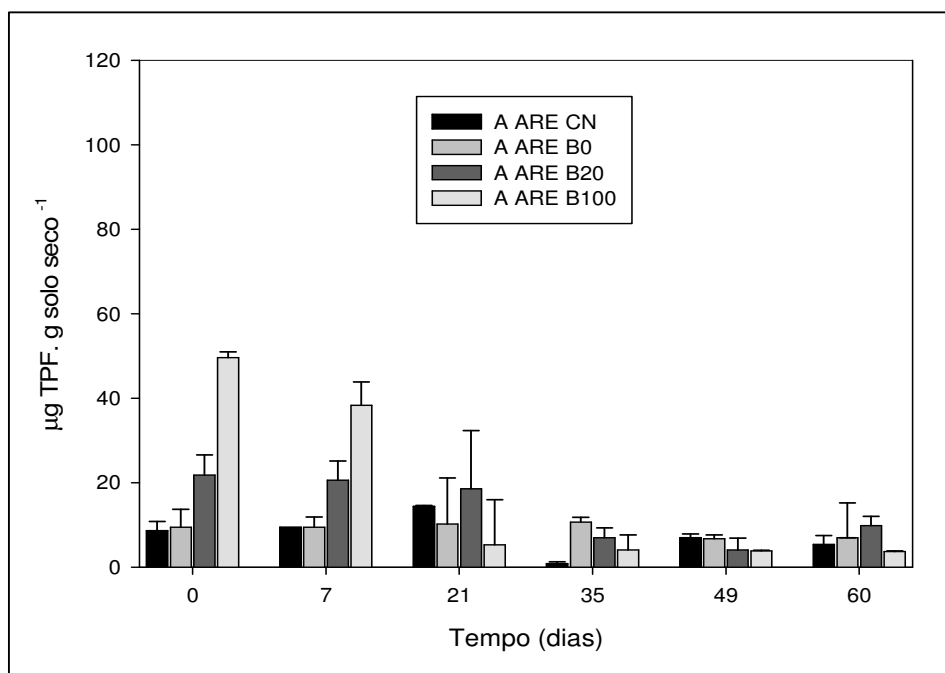


Figura 30: Atividade de desidrogenase em solo arenoso sob Atenuação Natural ao longo de 60 dias de incubação.

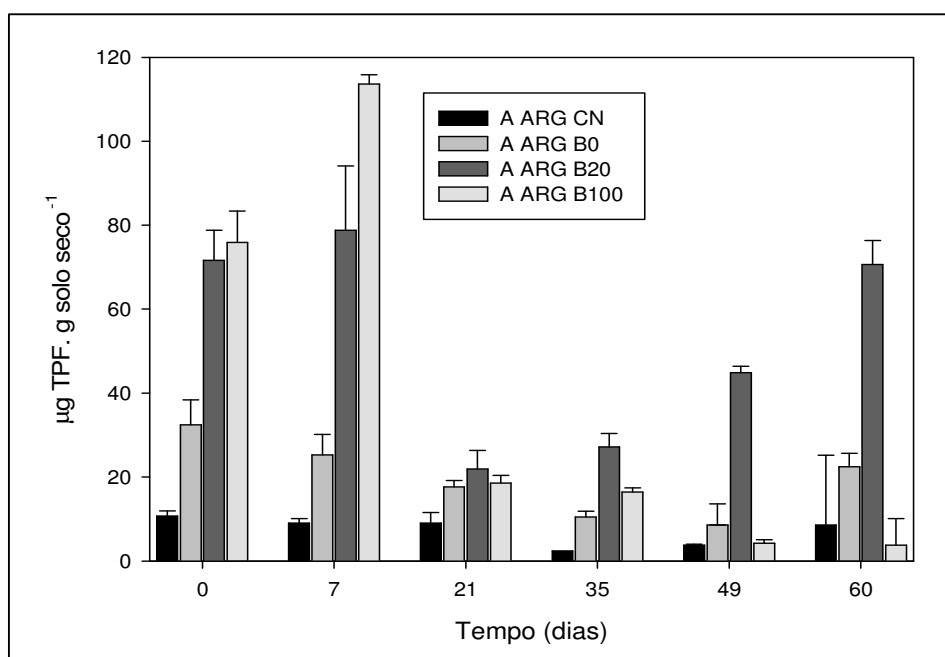


Figura 31: Atividade de desidrogenase em solo argiloso sob Atenuação Natural ao longo de 60 dias de incubação.

Foi observado, para a estratégia de Bioaugmentação, um aumento progressivo na atividade de desidrogenase para os tratamentos ARE B100 e ARG B100 ao longo do tempo de incubação (Figuras 32 e 33). Isso ficou evidente nos dois últimos pontos de monitoramento, principalmente para o solo argiloso (Figura 33). Além disso, também devem ser observados valores relativamente altos na atividade enzimática para o tratamento ARE B20, principalmente para os tempos 21, 49 e 60 dias (Figura 32).

A atividade de desidrogenase ao longo do tempo (0, 7, 21, 35, 49 e 60 dias), destacou-se para 11 tratamentos, sendo seis deles tratamentos contendo B100. Para o tempo zero de incubação, obtiveram os melhores resultados em  $\mu\text{g}$  de TPF  $\text{g}$  solo seco<sup>-1</sup> para A ARG B100 (76,06), A ARG B20 (74,30), B ARG B100 (56,79) e A ARE B100 (49,63). Para o tempo 7 dias, destacaram-se A ARG B100 (101,69) e A ARG B20 (84,82); no tempo 21, B ARG B100 (70,39) e B ARE B20 (33,56); no tempo 35, B ARG B100 (116,10); no tempo 49, B ARG B100 (368,12), B ARG B0 (48,64) e B ARG B20 (48,37) e, finalmente, no tempo 60 dias, os tratamentos que obtiveram o melhor desempenho foram B ARG B100 (312,15), B ARG B0 (92,31), A ARG B20 (65,39) e B ARE B100 (56,24). Os dados mostraram que o tratamento B ARG B100 apresentou maiores resultados para atividade enzimática desde o monitoramento do dia 21 até o final do experimento (Figura 33). Além disso, é importante considerar também que, de todos os 11 maiores resultados para a

atividade de desidrogenase durante os períodos de monitoramento, oito deles corresponderam à estratégia de Bioaumentação (Figuras 32 e 33).

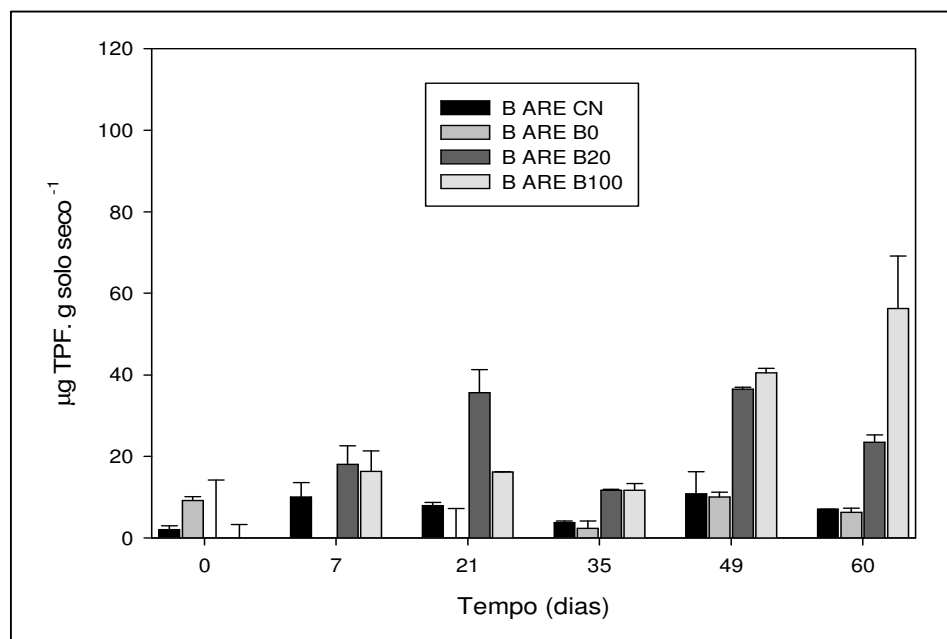


Figura 32: Atividade de desidrogenase em solo arenoso sob Bioaumentação ao longo de 60 dias de incubação.

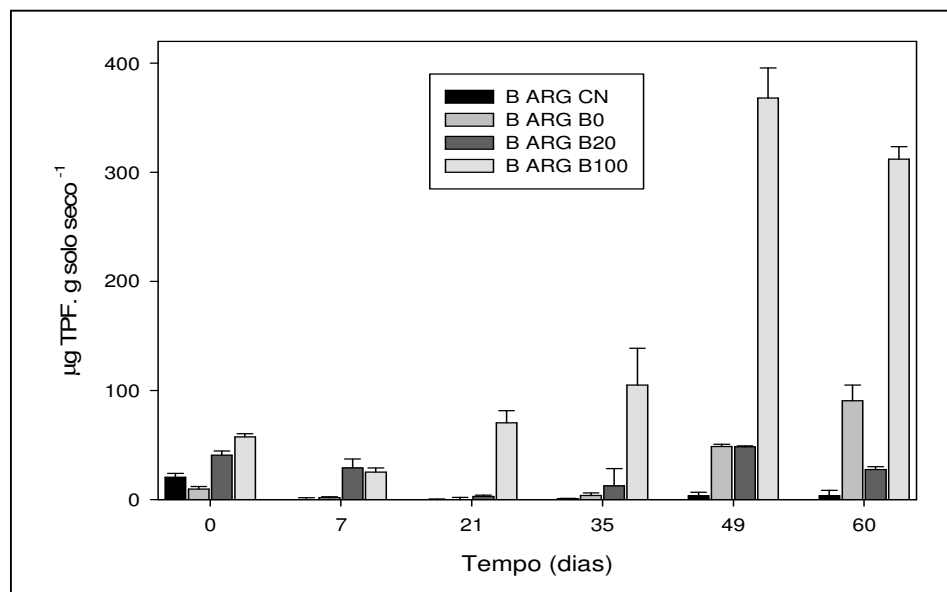


Figura 33: Atividade de desidrogenase em solo argiloso sob Bioaumentação ao longo de 60 dias de incubação.

#### **4. 2. 3 Contagem de heterotróficos e de degradadores**

Os resultados de degradadores e de heterotróficos estão resumidos nas Figuras 34 – 37. Na maioria dos tratamentos, considerando as duas estratégias de Biorremediação e os dois solos, não foi observado aumento significativo dos valores ao longo dos 60 dias de incubação e entre os tratamentos. Entretanto, foi observada uma redução significativa das populações de degradadores no tempo 60 dias em relação ao início da incubação (tempo zero) para os seguintes tratamentos: A ARG CN, B ARE CN, B ARG CN, A ARE B100 e B ARE B0. Para esses dois últimos tratamentos, a população microbiana apresentou queda a partir do trigésimo quinto dia de monitoramento. No entanto, a maioria dos degradadores apresentou populações com log entre 7 e 8 UFC por grama de solo seco. Considerando os valores de NMP para os heterotróficos, assim como para os degradadores, não se observaram diferenças no tamanho das populações microbianas dos solos ao longo do tempo de incubação para uma grande parcela dos resultados, embora se tenha verificado a redução para B ARG CN e B ARG CN. Por outro lado, ocorreu aumento na população microbiana para os seguintes tratamentos: B ARE B0, B ARE B20, B ARG B20 e B ARG B100. Pode-se concluir que não houve diferenças entre as populações de heterotróficos e de degradadores.



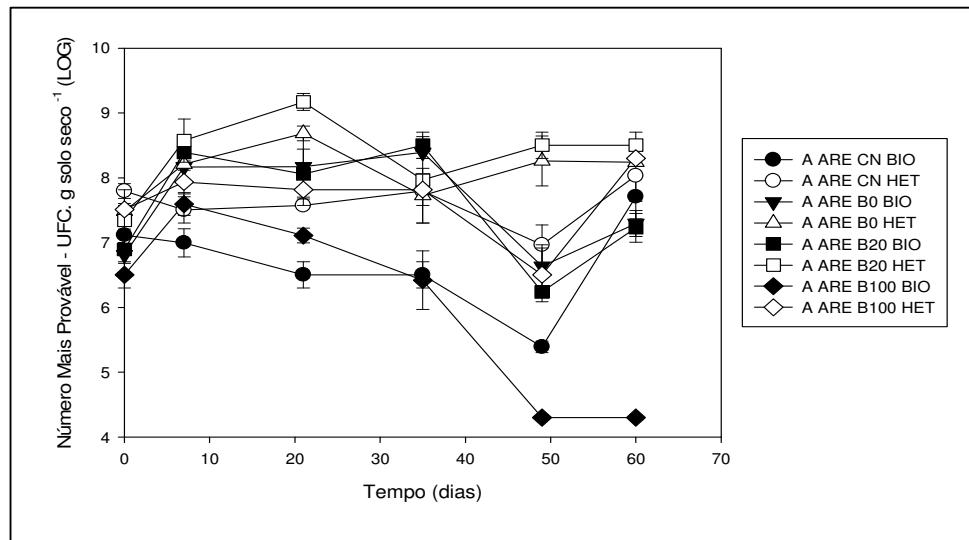


Figura 34: Contagem de degradadores e de heterotróficos pelo NMP em solo arenoso sob Atenuação Natural.

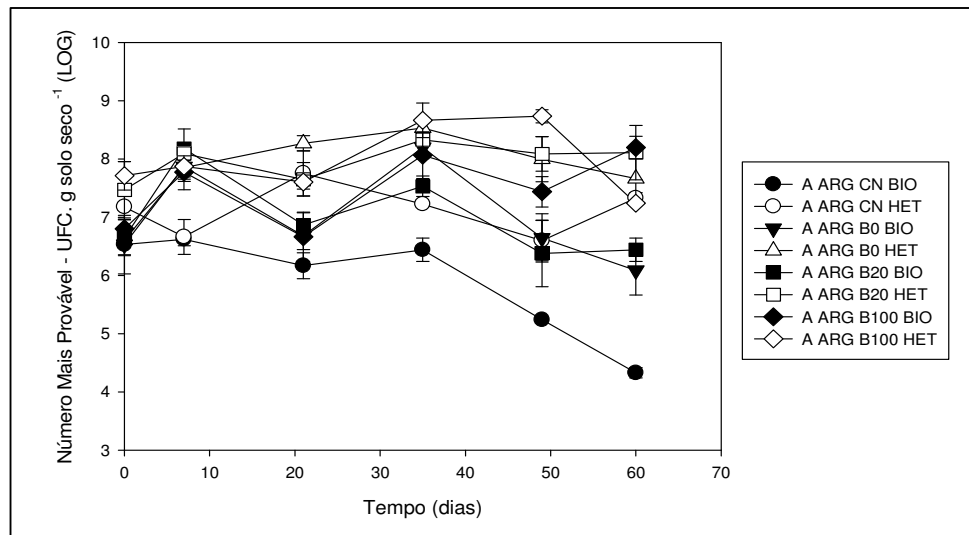


Figura 35: Contagem de degradadores e de heterotróficos pelo NMP em solo argiloso sob Atenuação Natural.

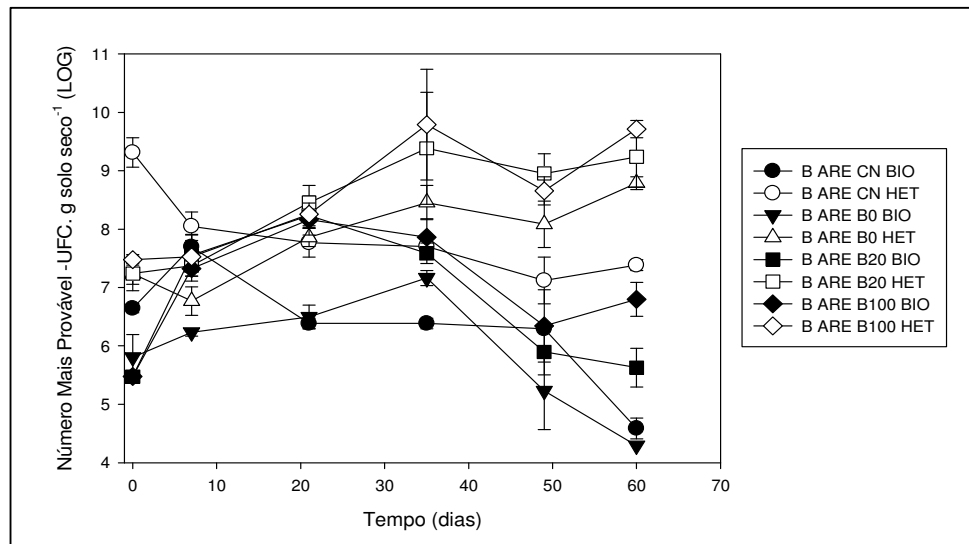


Figura 36: Contagem de degradadores e de heterotróficos pelo NMP em solo arenoso sob Bioaumentação.

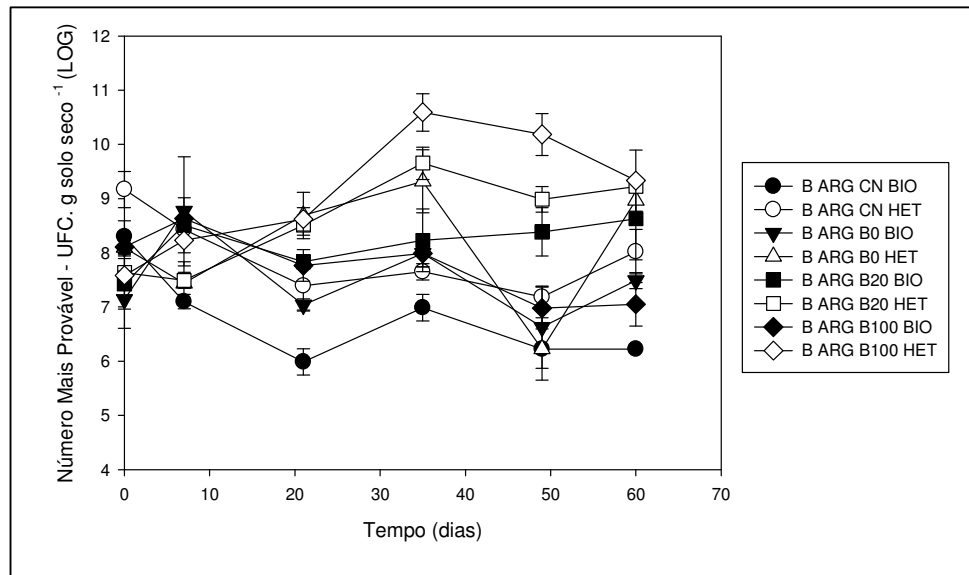


Figura 37: Contagem de degradadores e de heterotróficos pelo NMP em solo argiloso sob Bioaumentação.

#### 4.2.4 Degradação das misturas de diesel e biodiesel

Os resultados da degradação de hidrocarbonetos e de ésteres, após 60 dias de incubação, podem ser visualizados na Tabela 6. Os percentuais de degradação foram calculados pela diferença de concentração de hidrocarbonetos e/ou ésteres detectados por cromatografia gasosa do tempo zero em relação ao tempo 60 dias de incubação. Para avaliar a degradação do diesel, foi estimada a concentração de TPH (Hidrocarbonetos Totais do Petróleo) no solo, considerando apenas a fração leve ( $C_9 - C_{28}$ ), que compreende grande parte dos hidrocarbonetos alifáticos e, em menor quantidade, aromáticos. Para a fração biodiesel, o único parâmetro para avaliar a degradação foi a partir da detecção de ésteres totais, mesmo sabendo que existem outros componentes em menor proporção na mistura, como mono, di, triglicerídeos e glicerina. Considerando os tratamentos B0 e B20, os resultados tanto para Atenuação Natural quanto para Bioaugmentação apresentaram valores em torno de 90% para a degradação dos combustíveis avaliados. Ao comparar a degradação para os dois tipos de solo sob Atenuação Natural, verificou-se que para os tratamentos B0 e B20, não houve diferenças de degradação entre o solo arenoso e o argiloso. Contudo, para o tratamento B100, o solo arenoso obteve maior degradação (59,77%) em comparação ao argiloso (50,75%) (Tabela 6). Já para a Bioaugmentação, os tratamentos em solo argiloso, contendo B20 (94,05%) e B100 (97%), apresentaram maior degradação em relação aos mesmos tratamentos para o solo arenoso (84,65 e 74,52, respectivamente). Além disso, ao relacionar as duas estratégias de Biorremediação, pode-se verificar que o B100 apresentou maiores percentuais

de degradação para a Bioaumentação em relação à Atenuação Natural, tanto para o solo arenoso quanto para o argiloso, sendo o tratamento B ARG B100 apresentando o maior percentual de degradação para ésteres (97%). É importante salientar que os demais tratamentos com biodiesel puro (B100) apresentaram baixos percentuais de degradação de ésteres ao comparar com a taxa de degradação das misturas de diesel e biodiesel (B20) e, principalmente, de somente diesel (B0).

Tabela 6: Percentagem de degradação das misturas de diesel/biodiesel (B0, B20 e B100) após 60 dias para as duas estratégias de biorremediação [Atenuação Natural (A) e Bioaumentação (B)] nos dois solos (arenoso e argiloso).

<b>Tratamento</b>	<b>% de degradação</b>	<b>% de degradação das frações</b>
A ARE B0 <sup>a</sup>	96,47 ± 1,20 <sup>1</sup>	
A ARE B20 <sup>a</sup>	90,56 <sup>2</sup> ± 5,38	92,20 ± 8,03 <sup>3</sup> 84,03 ± 5,21 <sup>4</sup>
A ARE B100 <sup>c</sup>	59,77 ± 14,08	
A ARG B0 <sup>a</sup>	90,42 ± 6,49	
A ARG B20 <sup>a</sup>	91,10 ± 0,17	93,90 ± 1,40 79,92 ± 4,77
A ARG B100 <sup>d</sup>	50,75 ± 9,60	
B ARE B0 <sup>a</sup>	98,15 ± 0,80	
B ARE B20 <sup>b</sup>	84,65 ± 5,13	97,33 ± 1,01 33,92 ± 21,60
B ARE B100 <sup>b</sup>	74,52 ± 27,11	
B ARG B0 <sup>a</sup>	99,16 ± 0,41	
B ARG B20 <sup>a</sup>	94,05 ± 1,49	96,26 ± 1,04 85,25 ± 3,26
B ARG B100 <sup>a</sup>	97,00 ± 4,27	

a, b, c, d ANOVA p < 0,05;

<sup>1</sup> médias e desvio padrão da degradação total. B0: TPH; B20: TPH + ésteres totais; B100: ésteres totais;

<sup>2</sup> Média ponderada da degradação da mistura B20 [valores de TPH x 0,8 (fração diesel) + valores de ésteres totais x 0,2 (fração biodiesel)];

<sup>3</sup> Médias e desvio padrão da degradação da fração diesel da mistura B20;

<sup>4</sup> Média e desvio padrão da degradação da fração biodiesel da mistura B20.

ARE CN e ARG CN [controles (sem adição de combustível)]: níveis de TPH não-detectados.

A Tabela 7 compara três experimentos, a fim de estimar a biodegradação. Considerando cada estratégia de Biorremediação, todos os tratamentos para solo argiloso apresentam maior atividade de desidrogenase e de produção cumulativa de CO<sub>2</sub> em relação ao solo arenoso, com exceção dos controles (CN). Ao comparar as duas estratégias de Biorremediação, a Bioaugmentação se mostrou mais vantajosa em relação à Atenuação Natural apenas em ARG B100 para desidrogenase e em relação ao ARG B100, ARG B20, ARE B100, ARE B20 e ARE B0 para atividade respiratória. Ainda para a atividade de desidrogenase, para o solo argiloso sob Bioaugmentação, houve aumento da atividade média da enzima à medida que o percentual de biodiesel foi sendo aumentado. É importante observar também que o tratamento B ARG B100 apresentou os maiores índices de atividade microbiana associado ao alto percentual de degradação (Tabela 7).

Tabela 7: Comparação dos métodos de biodegradação

Tratamento	Desidrogenase <sup>1</sup>	Produção cumulativa de CO <sub>2</sub> (mg. Kg solo seco) (60 dias)	Percentual de Degradação (%)
A ARE CN	7,03 <sup>e</sup>	154,44 <sup>g</sup>	ND <sup>2</sup>
A ARE B0	10,30 <sup>e</sup>	1126,42 <sup>f</sup>	96,47 <sup>a</sup>
A ARE B20	14,99 <sup>d,e</sup>	1433,76 <sup>e,f</sup>	90,56 <sup>a</sup>
A ARE B100	18,07 <sup>d,e</sup>	1202,91 <sup>f</sup>	59,77 <sup>c</sup>
A ARG CN	8,40 <sup>e</sup>	265,77 <sup>g</sup>	ND
A ARG B0	20,51 <sup>d</sup>	2247,53 <sup>d</sup>	90,42 <sup>a</sup>
A ARG B20	57,83 <sup>b</sup>	2125,03 <sup>d</sup>	91,10 <sup>a</sup>
A ARG B100	37,00 <sup>c</sup>	2982,56 <sup>c</sup>	50,75 <sup>d</sup>
B ARE CN	6,88 <sup>e</sup>	119,88 <sup>g</sup>	ND
B ARE B0	5,30 <sup>e</sup>	1674,02 <sup>e</sup>	98,15 <sup>a</sup>
B ARE B20	21,26 <sup>d</sup>	2347,40 <sup>d</sup>	84,65 <sup>b</sup>
B ARE B100	23,90 <sup>c,d</sup>	3255,72 <sup>b</sup>	74,52 <sup>b</sup>
B ARG CN	5,61 <sup>e</sup>	264,63 <sup>g</sup>	ND
B ARG B0	26,49 <sup>c,d</sup>	2268,98 <sup>d</sup>	99,16 <sup>a</sup>
B ARG B20	28,58 <sup>c,d</sup>	3661,26 <sup>a,b</sup>	94,05 <sup>a</sup>
B ARG B100	158,24 <sup>a</sup>	3886,93 <sup>a</sup>	97,00 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> média dos 6 pontos de monitoramento ao longo dos 60 dias de incubação;

<sup>2</sup> valores para TPH não-detectados no solo;

ND: não detectado.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção de um consórcio bacteriano

#### 5. 1. 1 Curva de crescimento

Comparando o crescimento celular nos diferentes tratamentos (B0, B20 e B100), foi verificado um aumento significativo na produção de proteínas totais para seis isolados [*Bacillus megaterium* (1), 4, *Stenotrophomonas maltophilia* (6), 7, 8 e 10] à medida que o biodiesel foi adicionado na mistura diesel/biodiesel. Diante disso, quando esses resultados são comparados com outros estudos encontrados na literatura, existe cada vez mais a comprovação de que o biodiesel, por apresentar constituintes de mais fácil degradação, comparado ao diesel, seja mais bem assimilado pela célula microbiana, a fim de ser utilizado como fonte de carbono e energia (Zhang et al., 1998; Pasqualino et al., 2006; Mariano et al., 2008a, b; Júnior et al., 2009). Ainda considerando a produção de proteínas totais nos diferentes tratamentos em meio aquoso, pode-se verificar melhores desempenhos de biodegradabilidade nas diferentes misturas de diesel/biodiesel principalmente para os isolados *Bacillus megaterium* (1), *Bacillus pumilus* (2), *Pseudomonas*

*aeruginosa* (5), *Stenotrophomonas maltophilia* (6), 7 e 8, de um modo geral, sugerindo que esses micro-organismos pudessem apresentar um aporte enzimático favorável para degradar não só a fração mais lábil da mistura, como também a mais recalcitrante. Por outro lado, os isolados 3, 9 e 10 obtiveram decréscimos significativos no crescimento entre o 7° e o 14° dias de incubação para B20, sendo essa mesma situação recorrente com o isolado 10 para B100. Tal fato pode estar relacionado aos níveis relativamente mais baixos para atividade enzimática, podendo ser comprovado no caso de B20, indicando que esses micro-organismos pudessem degradar apenas fontes de carbono mais disponíveis, presentes nos primeiros momentos da incubação. Essa observação pode ser confirmada pelo isolado 9, que apresentou a melhor performance para a produção de ácidos graxos, que pode ser considerada uma fração de fácil assimilação pela célula ( $162,9 \text{ U.mg}^{-1}$ ) (Tabela 5).

### 5. 1. 2 Produção de biossurfactantes

Ao relacionar os resultados significativos entre os dois métodos de detecção de biossurfactantes em meio aquoso, observou-se que os isolados 7 e 10 (B0), *Bacillus megaterium* (1), 7 e 10 (B20) e *Bacillus megaterium* (1), 7, 9, 8 e 10 (B100) apresentaram índices de emulsificação superiores a 40%. Todavia, dentre estes, com exceção de *Bacillus megaterium* (1) para os tratamentos B20 e B100 e o isolado 8 para o tratamento B100, não se observaram reduções significativas para a tensão superficial, permanecendo com valores na faixa de  $52,75 - 53,56$  (B20) e  $38,03 - 47,4 \text{ mN.m}^{-1}$  (B100)



após 14 dias de incubação. Ainda é importante ressaltar que, para o tratamento B0, embora os isolados 7 e 10 tenham apresentado baixa produção relativa de proteínas totais, comparando aos valores para os tratamentos B20 e B100, foram constatados índices de emulsificação bastante elevados (>40%). Da mesma forma, foram verificados índices de emulsificação elevados para o isolado 10 em B20 e B100 a partir do sétimo dia de incubação, embora, nos dois casos, tenha-se observado um decréscimo no crescimento celular entre o 7º e o 14º dias. Segundo alguns autores, o índice de emulsificação vem sendo utilizado mais como um método para triagem do que para confirmação de micro-organismos produtores de biossurfactantes (Cooper & Goldenberg, 1987; Denger & Schink, 1995), visto que a capacidade de uma molécula em formar emulsão estável nem sempre está relacionada com a diminuição da tensão superficial (van Dyke et al., 1993; Willumsen & Karlson, 1997). Diante disso, os resultados positivos obtidos apresentaram-se bastante semelhantes em relação ao encontrados na literatura (Figuras 19 - 21 e Tabela 3). No entanto, para o tratamento B0, não foi constatada nenhuma diminuição significativa da tensão superficial para nenhum dos 10 isolados. Isso provavelmente esteja relacionado aos baixos níveis de crescimento bacteriano quando comparado com os tratamentos B20 e B100, uma vez que é necessária uma produção mínima de micelas pelas células para começar a diminuir a tensão superficial. Há exemplos na literatura que biossurfactantes são geralmente produzidos durante o crescimento exponencial ou em fase estacionária, sendo controlados pelo *quorum sensing* (Swift et al., 2007; Dusane et al., 2010). Além disso, com relação aos dois tipos de biossurfactantes avaliados, houve um aumento no

número de resultados positivos à medida que a concentração do biodiesel foi aumentada (B100 > B20 > B0), acompanhando, dessa forma, o crescimento celular para os mesmos tratamentos avaliados. Considerando os biossurfactantes de alta massa molecular, pode-se sugerir que o aumento da incidência de emulsão estável relacionado ao aumento da adição do biodiesel na mistura possa estar relacionado, além do progressivo aumento do crescimento celular e, conseqüentemente, pela hidrólise dos lipídios, às próprias características intrínsecas do biocombustível. Mesmo que se tenha utilizado o diesel com agente emulsificante para os testes e encontrado ausência de emulsificação nos experimentos-controle (sem inóculo com B20 ou B100), o próprio biodiesel pode ter contribuído para o aumento dos índices de emulsificação, uma vez que existe uma forte correlação entre a concentração de lipídios e o índice de emulsificação (Cooper & Goldenberg 1987). Diante de todas essas observações, é importante ressaltar, sobretudo, que muitos autores têm advertido que o método que mede a tensão superficial deve ser utilizado para confirmar os resultados, sendo ele considerado padrão para detecção de biossurfactantes (Youssef et al., 2004). Sendo assim, ao realizar uma análise comparativa da produção de biossurfactantes com a enzimática para o tratamento B20, é provável que a significativa redução da tensão superficial para os isolados *Bacillus megaterium* (1), *Bacillus pumilus* (2) e *Pseudomonas aeruginosa* (5) tenha contribuído para o aumento da disponibilidade do combustível à célula, podendo ter influenciado a obtenção de elevados níveis enzimáticos. Isso provavelmente é possível, devido às reduções significativas da tensão superficial, alcançando valores próximos a 30

$\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , já detectados nos 7 primeiros dias de incubação para os três isolados. Esse valor permaneceu constante até o final do experimento, sugerindo que os três isolados já teriam atingido uma taxa de redução máxima para a tensão superficial, dado que sua constância é alcançada quando a produção de biossurfactantes excede sua concentração micelar crítica (Youssef et al., 2004). Para reforçar essa hipótese, muitos autores ressaltam que, pelo menos para hidrocarbonetos, os biossurfactantes podem influenciar na taxa de biodegradação por duas diferentes maneiras: pelo aumento da dissolução das moléculas apolares na fase aquosa e pela mudança na afinidade entre a célula e o contaminante, aumentando, assim, a hidrofobicidade celular. Esse fenômeno, por conseguinte, tende a otimizar as interações entre o biossurfactante, o contaminante e a célula, aumentando a biodegradação (Zhang & Miller, 1995; Paria, 2008). No entanto, *Stenotrophomonas maltophilia*, mesmo não apresentando redução significativa na tensão superficial, apresentou altos níveis enzimáticos e um considerável índice de emulsificação (Tabela 5).

### **5. 1. 3 Avaliação da hidrofobicidade celular**

A hidrofobicidade da célula microbiana pode ser resumida como uma afinidade da superfície celular a contaminantes orgânicos apolares. (Chrzanowski et al., 2005). Fazendo uma relação ao percentual de hidrofobicidade celular com os resultados de detecção para os dois tipos de biossurfactantes, verifica-se que não houve uma linearidade entre os dados.

Para o tratamento B0, por exemplo, embora não se tenha encontrado nenhuma resposta significativa para a diminuição da tensão superficial e poucas para índices de emulsificação acima de 40%, pode-se observar percentuais de hidrofobicidade bastante elevados, muitos próximos a 100% para vários isolados (*Bacillus megaterium* (1), *Stenotrophomonas maltophilia* (6), 7, 8 e 9), apresentando, em comparação com o B20 e B100, um incremento no potencial hidrofóbico da parede celular. Uma hipótese para tentar explicar esse fenômeno é que o diesel apresenta, em sua constituição, componentes mais hidrofóbicos que aqueles presentes no biodiesel, estimulando, dessa forma, a produção de componentes apolares na parede celular para intensificar o contato entre o contaminante e a célula, a fim de utilizá-lo como fonte de carbono e energia. Essa condição pode ser reforçada quando comparada ao estudo de Górna et al. (2011), no qual utilizou diferentes substratos, como a glicose, o diesel e o hexadecano, verificando que a hidrofobicidade celular aumentava à medida que o meio aquoso era suplementado com substratos orgânicos cada vez mais apolares. No presente estudo, o tratamento B20 foi o que mais mostrou relação entre os maiores percentuais de hidrofobicidade [*Bacillus megaterium* (1), *Bacillus pumilus* (2), 3 e *Pseudomonas aeruginosa* (5)] e os resultados significativos para a produção de biossurfactantes de baixa massa molecular [*Bacillus megaterium* (1), *Bacillus pumilus* (2) e *Pseudomonas aeruginosa* (5)]. Dessa forma, o aumento na biodegradação pode ocorrer quando a hidrofobicidade da superfície celular é aumentada (Obuekwe et al., 2009), sendo atribuída, principalmente, a proteínas e a lipídeos situados na parede celular de uma ampla faixa de micro-organismos (Chrzanowski et al.,

2005). No entanto, em um estudo desenvolvido por Owsianiak et al (2009), não foi encontrada correlação significativa, quando foram avaliados 218 consórcios microbianos em diesel, relacionando a biodegradabilidade com a hidrofobicidade celular. Apesar de ser utilizado o parâmetro de hidrofobicidade da superfície celular por muitas décadas para avaliar a adesão celular a hidrocarbonetos e de outros xenobióticos hidrofóbicos (Rosenberg et al., 1980; Rosenberg, 2006), muitos estudos indicam que os ensaios padrão podem apresentar um papel significativo na detecção não só para interações hidrofóbicas propriamente ditas, mas também para interações eletrostáticas presentes na célula, podendo haver uma interferência na interpretação dos resultados no que diz respeito a ensaios de biodegradação (Abbasnezhad et al., 2008; de Carvalho et al., 2009).

#### **5. 1. 4 Produção de metabólitos**

A medida do pH da fase aquosa é uma forma indireta de avaliar o crescimento bacteriano às expensas de misturas de diesel/biodiesel como única fonte de carbono. Muitos ácidos orgânicos, oriundos da degradação desses combustíveis, são produzidos antes de serem incorporados às vias do ciclo do ácido cítrico durante o crescimento microbiano, podendo provocar a acidificação do meio (Videla et al, 1994; Bento et al., 2004; Bacosa et al., 2010). Em um estudo, por exemplo, foi analisada a fase aquosa do meio mineral contendo diesel após 60 dias de incubação com *Aspergillus fumigatus*, encontrando uma série de ácidos orgânicos como o ácido propiônico e 2-etil-

hexanoico, além de acetonas e alcoóis (Bento et al., 2005a). Estes últimos possivelmente tendem a sofrer oxidação para entrar nas vias do ciclo de Krebs, contribuindo também para acidificação do meio. Entretanto, no presente estudo, nenhum dos 10 isolados apresentou redução significativa no pH após os 14 dias de incubação. Por outro lado, coincidentemente, *Bacillus megaterium* (1), embora não tenha apresentado diferenças significativas em relação ao controle negativo (sem inóculo), apresentou menor pH dentre todos os isolados para o tratamento B100 (pH = 6,71), da mesma forma que obteve maior taxa de crescimento celular por meio de proteínas totais ( $0,997 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Além dos metabólitos produzidos por meio da degradação, a redução do pH da solução 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 (Bücker et al, 2011). Assim, mesmo havendo um crescimento celular relativamente elevado para vários isolados, observada pela turbidez do meio, principalmente para B20 e B100 (Figura 15), não foi verificada redução nas medidas de pH. Segundo Bücker et al. (2011), duas hipóteses podem ser lançadas para esse fato: ou não houve produção suficiente de metabólitos ácidos para reduzir substancialmente o pH do meio mineral ou existiu uma relação diretamente proporcional da presença de compostos contendo fosfato ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) e o efeito tamponante que esse macronutriente pode provocar. Para corroborar o efeito tampão do meio mineral utilizado, foi realizado um experimento em que foi adicionado a cada ponto 1 mL a 1M de um ácido forte (HCl) ou uma base forte (NaOH) em 25 mL de meio mineral de solução a pH inicial de 7,2, a fim de verificar qual seria o

volume necessário para alterar o pH em uma unidade em dado volume (Figura 43). Pode-se constatar que até o volume de 0,4 mL - tanto de solução ácida quanto básica - não houve uma alteração abrupta, variando o pH apenas entre 6 a 8 (Figura 38). Isso demonstra que é necessária uma quantidade elevada de metabólitos ácidos produzidos e liberados em solução aquosa pela microbiota degradadora desses biocombustíveis, a fim de que haja alteração substancial no pH. Por outro lado, em outro estudo, foi verificada a diminuição de pH de 7,2 para 4,8 quando uma linhagem de *Bacillus subtilis* sofreu crescimento em meio mineral Bushnell-Hass às expensas de diesel após 60 dias de incubação (Bento et al., 2004). Todavia, a variação do pH, nesse caso, pode ter sido mais intensa, uma vez que, nesse meio mineral, foi adicionada uma quantidade de  $2 \text{ g L}^{-1}$  de macronutrientes contendo fosfato (Bushnell & Haas, 1941), sendo  $3 \text{ g L}^{-1}$  a menos do que o meio mineral MM1.

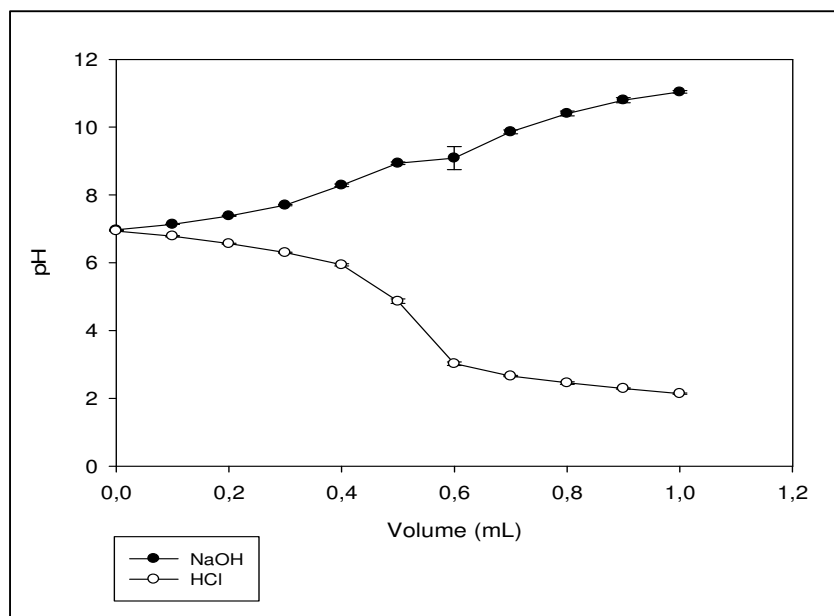


Figura 38: Adição de solução de HCl ou NaOH 1M (mL) em 25 mL de meio mineral MM1 (Richard & Vogel, 1999).

### 5. 1. 5 Avaliação da atividade enzimática

É importante ressaltar que somente foram realizadas avaliações da atividade enzimática específica para a mistura B20, uma vez que essa mistura possui tanto a fração diesel quanto a biodiesel, a fim de ser possível a comparação e a análise das diferentes respostas enzimáticas. Sendo assim, ao comparar a curva de crescimento celular com a atividade das enzimas com potencial degradador para a mistura B20, observou-se que os isolados que apresentaram maiores valores para proteínas totais também foram os que mais apresentaram maior atividade para as respectivas enzimas, como foi o caso, principalmente, de *Bacillus megaterium* (1), *Bacillus pumilus* (2), *Pseudomonas aeruginosa* (5) e *Stenotrophomonas maltophilia* (6) (Tabela 5). Diante dos resultados obtidos, verificou-se que *Bacillus megaterium* (1), *Bacillus pumilus* (2), por terem apresentado valores consideravelmente elevados tanto para alcano hidroxilase quanto para hidrólise do p-NPA, provavelmente tenham utilizado, em grande proporção, as fontes de carbono de mais fácil degradação, como o grupo dos alcanos e o grupo dos ésteres da mistura, proporcionando, assim, um crescimento significativo em relação aos demais após 14 dias. Segundo a literatura, a produção enzimática está estreitamente relacionada à degradação de compostos orgânicos hidrofóbicos (Atlas; 1981; Leahy & Colwell, 1990; Watkinson & Morgan, 1990; Wick et al., 2001; van Hamme et al., 2003). Além disso, foram as mesmas quatro bactérias, *Bacillus megaterium* (1), *Bacillus pumilus* (2), *Pseudomonas aeruginosa* (5) e *Stenotrophomonas*



*maltophilia* (6), que apresentaram as maiores atividades enzimáticas para as dioxigenases. Quando linhagens de *Pseudomonas* foram submetidas à incubação por 48 h em meio mineral, suplementadas com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e peptona, apresentaram valores de 578 – 2593,10 – 38 e 0 - 1215 U. mg<sup>-1</sup> de proteínas para C1,2O, C2,3O e P3,4O, respectivamente (Cenci et al., 1999), embora o meio com peptona possa ter estimulado a expressão gênica para as enzimas C1,2O e P3,4O. Em outros estudos com compostos aromáticos, mesmo que as fontes de carbono e as condições de cultivos não sejam os mesmos (Cenci et al., 1999; Cai et al., 2007), foram encontrados níveis relativamente expressivos para as três dioxigenases avaliadas. Em vista disso, esses micro-organismos, ao utilizarem fontes de carbono mais lábeis como a fração biodiesel e hidrocarbonetos alifáticos, provavelmente não só conseguiram estabelecer uma estrutura populacional significativa após um período de adaptação, mas também puderam exibir um suporte enzimático, a fim de biodisponibilizar uma quantidade significativa de carbono de fácil obtenção para produção de energia pela célula - o que possivelmente contribuiu para a degradação das frações mais recalcitrantes da mistura, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Vários autores reforçam que a biodegradação das frações pesadas de derivados do petróleo pode ser tanto estimulada quanto aumentada, devido ao fenômeno do cometabolismo microbiano (Zhang et al., 1998; Pasqualino et al., 2006). Esse fenômeno vem sendo bastante discutido e estudado, principalmente para misturas de diesel/biodiesel (Pasqualino et al., 2006; Owsianiak et al., 2009).

Ao avaliar a biodegradabilidade da fração do diesel presente na mistura, pode-se verificar que a atividade enzimática para alceno hidroxilase, em comparação às enzimas dioxigenases, foi bastante elevada, reforçando, portanto, a ideia de que os hidrocarbonetos alifáticos foram utilizados de maneira significativa como fonte de carbono, uma vez que são também os constituintes mais abundantes presentes na mistura do diesel (Lin et al., 2008). Além disso, deve-se ponderar que a detecção dos baixos valores para as três enzimas do grupo das dioxigenases em relação às alceno hidroxilases seja devido ao fato de os compostos aromáticos, além de reconhecidamente mais difíceis de serem degradados pela presença dos anéis de ressonância, encontrarem-se em baixas concentrações na mistura, dificultando a interação enzima-substrato (Wick et al., 2001).

Para a atividade de esterase, à medida que o tamanho da cadeia carbônica do grupo éster aumenta ( $C_2 - C_{18}$ ), a taxa e a velocidade de biodegradação desses compostos diminuem (Boczar et al., 2001; Casaburi et al., 2006). Dessa forma, mesmo considerando que a maioria dos constituintes presentes na fração biodiesel apresenta ésteres na faixa de  $C_{16} - C_{18}$ , foram observados valores expressivos para a hidrólise do *p*-NPA (éster de dois carbonos) para todos os isolados, em especial para o 2. Confrontando com outros trabalhos, foram determinados valores para atividade de esterase (*p*-NPA) na faixa de 9,18 – 607,31 U.  $mg^{-1}$  de proteínas para várias espécies de *Staphylococcus* após 24 horas de incubação (Talon & Montel, 1997). Já para *Streptomyces diastatochromogenes*, foi encontrado um valor de 150 U. $mg^{-1}$  de proteínas após cinco horas de crescimento celular (Bornscheuer &

Khalameyzer 1999). Todavia, muitas vezes torna-se difícil realizar comparações em diferentes estudos para avaliação da atividade de esterases, dentre outras enzimas, uma vez que é utilizada uma ampla variedade de substratos ( $\rho$ NP-acetato, butirato, palmitato, laurato, dentre outros), além de variações nas técnicas, como leituras espectrofotométricas por comprimentos de onda e condições de pH consideravelmente distintos (Panda & Gowrishankar, 2005), sem levar em conta os diferentes micro-organismos avaliados, o tempo de incubação e os meios de cultivo. Ainda, é importante ressaltar que, quanto menor a cadeia carbônica do grupo éster, menos específica é a relação entre a enzima e o substrato, podendo várias enzimas do grupo das esterases e, até mesmo, muitas lipases, atuarem na hidrólise (Rotman & Papermaster, 1966). Embora esse fator pareça demonstrar um problema para as análises enzimáticas, muitos substratos utilizados em bioensaios com cadeias carbônicas curtas, como é o caso do  $\rho$ -NPA, ao contrário, podem contribuir para ampliar o poder de detecção de um grupo inespecífico de enzimas que promovam a degradação da fração biodiesel. O  $\rho$ -NPA pode expressar resultados mais abrangentes em relação à atividade de esterases em comparação com outros substratos de cadeias carbônicas de até  $C_{18}$ , visto que enzimas que degradam cadeias longas podem vir a degradar cadeias curtas de função éster, sendo que o contrário não é verdadeiro (Jaeger et al., 1994). Diante desses argumentos, os resultados em relação à liberação de ácidos graxos pelo método titulométrico foram mais expressivos para os isolados *Bacillus megaterium* (1), *Bacillus pumilus* (2), *Stenotrophomonas maltophilia* (6) e 9, apresentando também os melhores resultados para a

hidrólise do p-NPA para os dois primeiros isolados, o que reforça a ideia de que o p-NPA pode ter sido degradado também por enzimas que degradaram os triglicerídeos do óleo de oliva. Ainda, complementando a presença de hidrólise de ésteres pelo método em placa, foi verificado, em sua maioria, resultados positivos, salvo com os isolados 3 e 7 para o tratamento B20. É importante, desse modo, ponderar que testes qualitativos podem não apresentar 100% de sensibilidade.

#### **5. 1. 6. Seleção de um consórcio microbiano**

O critério principal para eleger um consórcio microbiano foi avaliar não só se foram detectadas melhores respostas de acordo com cada método de avaliação, mas também e, sobretudo, se houve uma interrelação entre os resultados para cada isolado, sendo comparados entre os diferentes métodos. Quando esse último argumento se mostrou positivo, deu-se peso 2 para o método. Caso contrário, foi atribuído peso 1 para as melhores respostas, quando não houve, no entanto, essa conexão (Tabela 8). Dessa forma, a avaliação da atividade de várias enzimas, além da estimativa da produção de biosurfactantes e da detecção da hidrofobicidade, aliada ao crescimento celular, foi uma ferramenta favorável, a fim de eleger quatro micro-organismos potencialmente degradadores para as misturas B0, B20 e B100, todos isolados de uma célula de *Landfarming*. Segundo a Tabela 9 e de acordo com o sequenciamento da região 16S do RNA ribossômico, foi possível identificar os seguintes isolados: 1 (*Bacillus megaterium*), 2 (*Bacillus pumilus*), 5

(*Pseudomonas aeruginosa*.) e 6 (*Stenotrophomonas maltophilia*), embora a medida do pH não tenha contribuído para a seleção do consórcio. Foi verificado que tais gêneros selecionados para o consórcio degradador apresentam intensa relação com processos de biodegradação das frações presentes nas misturas de diesel/biodiesel de acordo com os dados da literatura publicados nas últimas décadas (Atlas, 1981; Leahy & Colwell, 1990; Donofrio, 1996; Jacques et al., 2005; Jacques et al., 2007; Chao et al., 2010; Thavasi et al., 2011).

Portanto, esses isolados constituíram um consórcio bacteriano, a fim de avaliar a biorremediação de misturas de diesel e biodiesel em dois tipos de solos, simulando um derramamento superficial desses combustíveis (B0, B20 e B100). Além disso, foi constatado que os isolados da célula de *Landfarming* foram mais efetivos para compor o consórcio bacteriano do que os isolados selecionados de uma borra oleosa a partir da centrífuga de biodiesel.

Tabela 8: Comparação dos resultados obtidos por diferentes métodos de detecção da biodegradabilidade para selecionar um consórcio bacteriano

Métodos de detecção	Melhores resultados <sup>a</sup>					
Proteínas Totais B0 <sup>b,2</sup>	8	5				
Proteínas Totais B20 <sup>b,2</sup>	1	2	7	6	8	5
Proteínas Totais B100 <sup>b,2</sup>	1	5	7	2		
Tensão Superficial B0 <sup>d</sup>						
Tensão Superficial B20 <sup>b,2</sup>	1	5	2			
Tensão Superficial B100 <sup>b,2</sup>	5	1	2	8		
IE > 40% B0 <sup>b,1</sup>	7	10				
IE > 40% B20 <sup>b,1</sup>	1	10	7			
IE > 40% B100 <sup>b,1</sup>	7	9	1	10	8	
Hidrofobicidade B0 <sup>b,1</sup>	1	6	7			

Hidrofobicidade B20 <sup>b, 1</sup>	5	1	2	
Hidrofobicidade B100 <sup>b, 1</sup>	5	9	8	
Esterase em Placa B20/B100 <sup>1</sup>	4	8	9	
Alcano Hidroxilase B20 <sup>c, 2</sup>	1	6	2	
Catecol 1,2-Dioxigenase B20 <sup>c, 2</sup>	1	2	6	5
Catecol 2,3-Dioxigenase B20 <sup>c, 2</sup>	6	5	2	
Protocatecol 3,4-Dioxigenase B20 <sup>c, 2</sup>	1	5	9	2
Esterase (pNPA) B20 <sup>c, 2</sup>	2	1	9	
Lipase B20 <sup>c, 2</sup>	9	1	6	

<sup>a</sup> O primeiro isolado da esquerda apresenta respostas mais representativas para cada método, seguindo uma ordem decrescente para os valores da esquerda para a direita;

<sup>b</sup> Avaliação após 14 dias;

<sup>c</sup> Média da atividade enzimática específica de três pontos (tempos 1, 7 e 14 dias);

<sup>1</sup> peso 1 para critérios de seleção dos micro-organismos (consórcio);

<sup>2</sup> peso 2 para critérios de seleção dos micro-organismos (consórcio).

Tabela 9: Identificação dos isolados para compor um consórcio bacteriano por sequenciamento parcial da região 16S ribossômico

Isolado	Espécie mais próxima	Nº acesso	Similaridade (%)
1	<i>Bacillus megaterium</i>	CP001982.1	99
2	<i>Bacillus pumilus</i>	HQ851056.1	100
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EU194235.1	100
6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CP001111.1	99

## 5. 2 Biorremediação de misturas de diesel/biodiesel (B0, B20 e B100) em dois tipos de solos

### 5. 2. 1 Avaliação da atividade respiratória

A liberação de CO<sub>2</sub> em solos é uma forma indireta de estimar a descarboxilação de compostos orgânicos que são degradados no sistema

(Margesin et al., 2000). É importante considerar que, dos seis tratamentos com maiores valores cumulativos para a atividade de liberação de CO<sub>2</sub> durante 60 dias de incubação, cinco corresponderam à estratégia de Bioaugmentação. Provavelmente a adição de nutrientes em uma relação C: N: P específica (120:10:1), associada ao consórcio microbiano inoculado, possa ter favorecido para o aumento da atividade respiratória. Além disso, verificou-se que todos os mesmos seis tratamentos apresentaram, em sua composição, ou B20 ou B100, demonstrando que o biodiesel pode contribuir para o aumento da degradação, devido à sua maior facilidade de incorporar-se às células microbianas para obtenção de energia em comparação ao diesel (B0) (Figuras 28 e 29) (Mariano et al., 2008 e Júnior et al., 2009). Também foi observado que os resultados mais significativos para a atividade respiratória corresponderam aos tratamentos para solo argiloso, mesmo não havendo diferenças na degradação para o B0 e B20 entre os solos. Dessa forma, sugere-se que a maior atividade respiratória para o solo argiloso possa ser explicada, uma vez que a microbiota não só degradou o conteúdo de combustível adicionado, mas também os constituintes carbônicos intrínsecos do solo, sendo encontrado um teor de 1,1 e 2,5% de matéria orgânica para o solo arenoso e argiloso, respectivamente (Tabela 1). Segundo um estudo realizado por Baptista et al. (2005) sobre a estimativa da biodegradação de petróleo incubado por 45 dias em um solo argiloso, a maior taxa respiratória encontrada também correspondeu ao maior percentual de degradação da matéria orgânica, sendo esta reduzida em 50%. Para outro estudo, também foram observadas maiores emissões de CO<sub>2</sub> para um solo argiloso em relação a um arenoso (Labud et al., 2007). Assim, a

matéria orgânica, mesmo apresentando grande quantidade de material recalcitrante, como ácidos húmicos e fúlvicos, pode ser utilizada como fonte de carbono e energia alternativa, à medida que substratos comparativamente mais lábeis, como misturas de diesel/biodiesel, são adicionados. Desse modo, a manutenção da estrutura populacional microbiana ao longo do tempo de incubação provavelmente possa contribuir para a degradação de compostos de mais difícil degradação, devido ao cometabolismo (Johnsen et al., 2005). No presente estudo, isso se comprova ao observar um decréscimo do tamanho da maioria das populações para os tratamentos controle, devido à falta de carbono de fácil degradação, tanto que as taxas respiratórias se mostram baixas, não havendo provavelmente altas taxas de degradação da matéria orgânica. Além disso, é importante considerar também que, devido ao solo argiloso apresentar maiores teores de argila em relação ao arenoso, muito macro e micronutrientes podem ter contribuído para o incremento da atividade microbiana no solo.

### **5. 2. 2 Avaliação da atividade de desidrogenase**

Para a atividade enzimática de desidrogenase, é fundamental reforçar que, à medida que a atividade da enzima aumenta, a biodegradação aumenta proporcionalmente, uma vez que um grande grupo dessas enzimas participa de processos relacionados à assimilação de carbono pelo ciclo de Krebs (Schinner et al., 1996; Margesin et al., 2000). Diante disso, pode-se traçar um perfil enzimático ao longo dos 60 dias de incubação, destacando duas questões relevantes: 1) nos primeiros dois pontos de monitoramento da



atividade enzimática (tempo zero e tempo 7 dias), verificaram-se maiores valores para os tratamentos de Atenuação Natural em comparação à Bioaumentação, como A ARG B20 (74,30 e 84,82) e A ARG B100 (76,06 e 101,69  $\mu\text{g}$  de TPF. g de solo seco<sup>-1</sup>, respectivamente), apresentando, a partir do vigésimo dia de incubação, abrupta diminuição relativa da atividade da enzima para a Atenuação Natural (Figura 31); 2) A partir do período de incubação de 21 dias, foi possível verificar altos níveis de atividade enzimática para alguns tratamentos de Bioaumentação, destacando o B ARG B0, B20 e B100 (Figura 33). Esse último tratamento apresentou uma crescente atividade à medida que o tempo de incubação aumentava, atingindo valores de 368,12 e 312,15  $\mu\text{g}$  de TPF. g de solo seco<sup>-1</sup> para os tempos 49 e 60 dias, respectivamente. Isso demonstra que a adição de nutrientes como o Nitrogênio e o Fósforo, pelo menos para esses tratamentos, foram decisivos para o aumento do metabolismo microbiano. Entretanto, provavelmente, a relativa demora do aumento da atividade enzimática tenha ocorrido, uma vez que tanto o consórcio inoculado pudesse estar em processo de adaptação quanto os macronutrientes adicionados pudessem demorar ao serem assimilados pela célula. Margesin et al. (2000) encontraram resultados semelhantes, demonstrando que a atividade de desidrogenase, ao ser comparada com a respiração microbiana, apresentou flutuações nas primeiras semana, obtendo valores máximos de expressão enzimática apenas entre 11° e 25° dias de incubação, no total de 90. No presente trabalho, em condições sob Atenuação Natural, sugere-se que alguns tratamentos não se mantiveram com atividade enzimática de desidrogenase ao longo de todo o tempo de incubação, posto

que provavelmente a escassez de macronutrientes no solo possa ter sido um fator limitante para a atividade da enzima, ainda que tenham apresentado taxas de degradação elevadas. Frente a esses resultados, verifica-se que todos os tratamentos submetidos ao solo argiloso apresentaram os maiores valores para a atividade enzimática nos diferentes pontos de monitoramento enzimático, considerando as duas estratégias de Biorremediação. De um modo geral, os maiores valores para atividade enzimática foram encontrados para os tratamentos com B100. Fato este pode ser corroborado a partir dos estudos de Lapinskiene et al (2006), no qual os autores compararam resultados da atividade de desidrogenase tanto para diesel quanto para biodiesel em solos após 6 dias de incubação, verificando que, à medida que o percentual de biodiesel era adicionado ao solo (de 1 a 12%), a atividade da enzima aumentava, sendo os valores sempre superiores ao B0; já para o diesel, após a concentração de 3%, a atividade enzimática começou a apresentar diminuição, provocando reduções na população microbiana. No entanto, para o presente estudo, embora se tenham encontrado valores enzimáticos superiores para B100 em relação à B0, não foram observadas diferenças no tamanho da população de degradadores, demonstrando ausência de toxicidade, principalmente para B0, visto que a concentração de combustível adicionado ao solo não ultrapassou 3%.

Traçando uma relação dos resultados de produção cumulativa de CO<sub>2</sub> com a atividade enzimática de desidrogenase, pode-se verificar que os tratamentos que apresentaram as maiores taxas respiratórias também foram os que demonstraram maiores valores para a atividade enzimática, enfatizando

quatro principais microcosmos: A ARG B100, B ARG B0, B ARG B20 e B ARG B100. A partir dessa análise, fica claro que a presença de nutrientes associada à maior quantidade de matéria orgânica do solo, representada pelo solo argiloso, foi preponderante para maior incremento na dinâmica da população microbiana.

### **5. 2. 3 Estimativa da biodegradabilidade das misturas de diesel/biodiesel**

Ao comparar as diferentes estratégias de Biorremediação, de acordo com os percentuais de degradação para os tratamentos B0 e B20, verificou-se que não houve diferenças significativas entre elas, inclusive entre os dois tipos de solos, mantendo o tamanho das populações de degradadores ao longo dos 60 dias de incubação em torno de  $10^6 - 10^8$  UFC. g de solo seco<sup>-1</sup> (Figuras 39 – 42). Muitos trabalhos constataram o sucesso da Biorremediação Intrínseca, na qual a biodegradação de hidrocarbonetos pode ser eficiente principalmente quanto à presença de bactérias e fungos indígenas (Bento et al., 2005b; Sarkar et al., 2005; Margesin et al., 2007; Di Toro et al., 2008). No entanto, é relevante considerar que o tratamento A ARE B0, mesmo apresentando diminuição no tamanho da população degradadora a partir do 35º dia de incubação, apresentou degradação elevada da fração leve do diesel (96,5 %). Isso demonstra que essa população provavelmente exibia um suporte metabólico e genético favorável, mesmo em condições de Atenuação Natural para degradar hidrocarbonetos nas primeiras semanas de incubação. Em linhas gerais, ao

comparar as duas estratégias de Biorremediação, foram alcançadas altas taxas de degradação para os tratamentos contendo B0 e B20 (acima de 90%). No entanto, a Bioaugmentação e o solo argiloso não se mostraram vantajosos para aumentar a degradação dessas duas misturas. O contrário ocorreu apenas entre os tratamentos contendo B100 (Tabela 6).

Com exceção do tratamento B ARG B100, o B100 apresentou menor degradação ao ser comparado às misturas B0 e B20 para as duas estratégias de Biorremediação. Por outro lado, ARE B100 e ARG B100 apresentaram maiores percentuais de degradação para Bioaugmentação em relação às mesmas concentrações em Atenuação Natural, sugerindo que a adição de nutrientes como o Nitrogênio e o Fósforo, associada à inoculação de consórcio bacteriano selecionado, tenha contribuído para o aumento da assimilação do biodiesel pelos micro-organismos presentes no solo. De acordo com Fantroussi & Agathos (2005), a combinação da bioaugmentação com a bioestimulação deve mostrar uma estratégia promissora, pois tanto micro-organismos exógenos quanto indígenas podem ser beneficiados pela adição de nutrientes ao sistema. Contudo, no presente estudo, é interessante salientar que os tratamentos contendo B100, ao mesmo tempo, que apresentaram baixo percentual de degradação, também foram os que demonstraram maiores valores para a atividade enzimática e produção cumulativa de CO<sub>2</sub>. Isso pode ser explicado, visto que esses resultados podem ter sido gerados não só pela própria degradação do biodiesel, mas também pela assimilação da matéria orgânica do solo por meio do cometabolismo. Ainda, outro fator que pode ter dificultado a interpretação dos resultados para B100 foi calcular a degradação

do biodiesel apenas a partir da estimativa de estéreis totais como parâmetro para avaliar o consumo do biocombustível no solo. O biodiesel é produzido por um processo de transesterificação, transformando triglicerídeos, com auxílio de uma base forte, para formar estéreis e glicerol. Todavia, o glicerol deve ser retirado do sistema para manter o controle de quantidade, uma vez que pode prejudicar o motor e, inclusive, causar danos aos ecossistemas quando esse subproduto sofre combustão (Li et al., 2009). Assim, é permitida por lei uma quantidade muito pequena de glicerina na mistura. Segundo o padrão internacional para especificação do biodiesel, a mistura deve apresentar, no mínimo, 96,5 % de ésteres e, no máximo, 0,25% de glicerina total e 0,02% de glicerina livre, assim como limites aceitáveis de 0,8, 0,2 e 0,2%, respectivamente, para mono, di e triglicerídeos, a fim de manter o padrão de qualidade do biocombustível (ANP 2009; Atadashi et al., 2010). No entanto, esse controle, na prática, nem sempre ocorre, sendo encontrados na mistura outros compostos, além do glicerol, como resíduos de mono, di e triglicerídeos, alcoóis, catalisadores dentre outros subprodutos em concentrações acima do permitido. Embora se tenham encontrado baixas taxas de degradação de ésteres totais tanto para os tratamentos B20 quanto para B100, pode-se inferir que, pelo fato de principalmente os tratamentos B100 demonstrarem altas taxas metabólicas para atividade respiratória e de desidrogenase, é provável que, além da degradação da própria matéria orgânica do solo, tenham sido metabolizados, como fonte de carbono e energia, outros constituintes do biodiesel. Ainda que inexistam trabalhos sobre a comparação biodegradadora de estéreis, de glicerídeos e de glicerol presentes no biodiesel, acredita-se que

esses dois últimos componentes possam apresentar preferência por micro-organismos degradadores, quando comparados aos estéreis, devido às rotas mais simplificadas para assimilação dessas fontes de carbono pela célula.

Considerando todos os resultados obtidos para esse estudo, a Bioaugmentação não apresenta limitações óbvias quanto à degradação microbiana. Entretanto, essa estratégia pode apresentar falhas (Thompson et al., 2005). Considerando a ecologia microbiana, a seleção de linhagens vem-se baseando em um único critério-chave, a fim de capacitar micro-organismos para a degradação, sem levar em conta o potencial dessas cepas em se proliferarem ativamente nos diferentes locais onde foram aplicadas. Assim, como demonstrado em alguns trabalhos, a Bioaugmentação com micro-organismos exógenos, geralmente, acaba sendo eficiente apenas nos primeiros dias de incubação, devido à difícil tarefa de adaptação aos fatores físicos, químicos e biológicos de cada solo (Schwartz & Scow, 2001; Bento et al., 2005b; McKew et al., 2007).

Assim, mesmo diante da ineficiência que consórcios microbianos exógenos podem gerar em relação à degradação de misturas de diesel/biodiesel, uma vez que linhagens isoladas de um solo A não necessariamente podem ser aplicadas em um sítio contaminado B, devido à grande complexidade desses sistemas (Hosokawa et al., 2009), deve-se considerar a possibilidade de investir em bancos de consórcios microbianos com potencial degradador. Essa alternativa pode aumentar as probabilidades de sucesso de degradação de áreas contaminadas por combustíveis, uma vez o tempo exigido para o isolamento e o enriquecimento de micro-organismos

que são reintroduzidos no mesmo local impactado (autóctones) nem sempre é viável na prática. Dessa forma, ao organizar um banco de dados com registros detalhados das características físicas, químicas e biológicas dos solos impactados nos quais os isolados foram obtidos, as chances de escolher um consórcio compatível com o solo de interesse a ser descontaminado pode ser maior. Associado a isso, adicionar inúmeras vezes o inóculo ao longo da incubação em troca de uma única aplicação no início dela pode contribuir para o estabelecimento das populações exógenas e, por conseguinte, aumentar a degradação das misturas de diesel/biodiesel no solo, evitando quedas abruptas na estrutura populacional, causadas, principalmente pela competição dos micro-organismos autóctones e predação por protozoários (Schwartz & Scow, 2001).

## 6. CONCLUSÕES

Foi possível selecionar um consórcio bacteriano potencialmente degradador para as misturas de diesel/biodiesel (B0, B20 e B100).

De acordo com os altos níveis de degradação encontrados, principalmente para B0 e B20, pode-se afirmar que a Bioaugmentação não se mostrou eficaz para esses tratamentos, porque não foram encontradas diferenças na degradação para as duas estratégias de Biorremediação utilizadas.

A Bioaugmentação mostrou-se vantajosa apenas para tratamentos B100 para ambos os solos, demonstrando que adição de nutrientes, associada ao consórcio inoculado, foi importante para o aumento da Biorremediação do biodiesel.

É fundamental que sejam avaliados outros componentes da fração biodiesel, além dos ésteres totais, a fim de se obter resultados de degradação mais fidedignos, visto que os micro-organismos podem utilizar outros compostos de mais fácil assimilação como fonte de carbono e energia.



## 7. PERSPECTIVAS

Traçar um perfil das comunidades microbianas no início e no final do experimento de Biorremediação (Atenuação Natural e Bioaugmentação) para os dois solos (argiloso e arenoso) e para as três concentrações de combustível (B0, B20 e B100) a partir da técnica de PCR-DGGE;

Avaliar os cromatogramas da fração diesel, a fim de verificar quais hidrocarbonetos da fração leve ( $C_9 - C_{28}$ ) que sofreram maior degradação;

Avaliar outros compostos presentes no biodiesel, como o glicerol e triglicerídeos, além dos ésteres totais, para determinar com mais precisão o percentual de degradação do biocombustível em solos;

Realizar a prospecção de micro-organismos potencialmente degradadores em solos contaminados por combustíveis em postos de abastecimento de Porto Alegre, com o objetivo de montar um banco de consórcios microbianos, a fim de aumentar a probabilidade de sucesso em sistemas de Bioaugmentação em solos cujas características sejam semelhantes.

Avaliar as concentrações de TPH ao final do processo de Biorremediação, verificando se o solo, após o processo, apresenta níveis aceitáveis de contaminação, a fim de ser destinado a um aterro de resíduos Classe I, estando em consonância com as especificações do órgão ambiental competente.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

\_\_\_\_\_. ATLAS AMBIENTAL DE PORTO ALEGRE. MENEGAT, R.; PORTO, M. L.; CARRARO, C. C.; FERNANDES, L. A. D. (editors), 3. ed. rev. Porto Alegre : Editora da Universidade/UFRGS, 2006, 228 p.

ABBASNEZHAD, H.; GRAY, M.R.; FOGHT, J. M. Two different mechanisms for adhesion of Gram-negative bacterium, *Pseudomonas fluorescens* LP6a, to an oil-water interface. **Colloids Surf B Biointerfaces**, Canadá, v. 62, n. 1, p. 36–41, 2008.

ALEF, K. Dehydrogenase activity. In: K. Alef and P. Nannipieri, Editors, **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**, Academic Press, London, p. 228–231, 1996.

ALEXANDER, M. Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. **Environmental Science and Technology**, EUA, v. 34, n. 20, p 4259 – 4265, 2000.

AMELLAL, N.; PORTAL, J. M.; BERTHELIN, J. Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. **Applied Geochemistry**, França, v. 67, n. 4, p. 1611–1619, 2001.

AMOURIC, A.; QUÉMÉNEUR, M.;GROSSI, V.; LIEBGOTT1, P. P.; AURIA, R.;CASALOT, L. Identification of different alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus ruber strain* SP2B, an hexane-degrading actinomycete The Society for Applied Microbiology, **Journal of Applied Microbiology**, França, v. 108, n. 6, p.1903–1916, 2010.

ANP. Agência Nacional do Petróleo. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/>, acessado em 12 de fevereiro de 2011.

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

ASTM D 6584 METHOD, disponível em: <http://www.astm.org/Standards/D6584.htm>, acessado em 12 de fevereiro de 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, n.7, p. 1999–2008, 2010.

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

ATLAS, R. M. **Microbiology-fundamentals and applications**, New York: Macmillan Publishing Co, 2nd ed., 1988, p. 352-353.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. **Advances in Microbial Ecology**, v. 12, p. 287–338, 1992

BACOSA, H.; SUTO, K.; INOUE, C. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Japão, v. 64, n. 8, 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.

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

BAPTISTA, S. J.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. D. C. Production of CO<sub>2</sub> in Crude Oil Bioremediation in Clay Soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasil, v.48, p. 249-255, 2005

BEAUCHAMP, R. O.; ANDJELKOWITCH, D. A.; KLIGERMAN, A. D.; MORGAN, K. T.; HELCH, H. A. A critical review of the literature on acrolein toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 14, n. 4, p 309–380, 1985.

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**, Paris, v. 153, n. 6, p. 339–344, 2002.

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, 2005a.

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

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 65-68, 2003a.

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

BENTO, F.; VISCARDI, L. C.; DARODA, R.; MENEDEZ, A. G.; GAYLARDE, C. C.; CAMARGO, F. A. O. Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel à contaminação microbiana durante a estocagem. **Revista Biodiesel**, São Paulo, n.4, p. 24-26, 2006.

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

BERTINI, I.; BRIGANTI, F.; MANGANI, S.; NOLTING, H. F.; SCOZZAFAVA, A. Biophysical investigation of bacterial aromatic extradiol dioxygenases involved in biodegradation processes. **Coordination Chemistry Reviews**, Itália, v.144, p.321-345, 1995.

BITTON, G.; KOOPMAN, B. Tetrazolium reduction-malachite less than 1% of total activity. Further details about extra- green method for assessing the variability of filamentous bacteria in activated sludge. **Applied Environmental Microbiology**, v. 43, p. 964–966, 1982.

BOCZAR, B. A.; FORNEY, L. J.; BEGLEY, W. M.; LARSON, R. J.; FEDERLE, T. W. Characterization and Distribution of Esterase Activity in Activated Sludge. **Water Research**, USA, v. 35, n. 17, p. 4208–4216, 2001

BODOUR, A. A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M.. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. **Applied Environmental Microbiology**, EUA, v. 69, n. 6, p. 3280–3287, 2003.

BOON, N.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S.D. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. **Applied Environmental Microbiology**, Bélgica, v. 69, n. 3, p. 1511 - 1520, 2003.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, EUA, v. 74, n. 1, p. 63 – 67, 2000.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **Microbiology reviews**, Alemanha, v. 26, n. 17, p. 73 – 81, 2002.

BORNSCHEUER, U.T. & KAZLAUSKAS, R.J. *In.*: **Hydrolases in organic synthesis regio-and stereoselective biotransformations**. Wiley- VCH, Weinheim, 1999.

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.

BRADDOCK, J. F.; CATTERALL, P. H. A Simple Method for Enumerating Gasoline- and Diesel-Degrading Microorganisms. **Bioremediation Journal**, EUA, v. 3, n. 2, p. 81 – 84, 1999.

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

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

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

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

CAI, W.; LI, J.; ZHANG, Z. The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium sp.* **Journal Hazardous Materials**, China, v. 148, n. 1 - 2, p. 38–42, 2007.

CASABURI, A.; VILLANI, F.; TOLDRÁ, F.; SANZ, Y. Protease and esterase activity of staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, Espanha, v. 112, n. 3, p. 223–229, 2006.

CASIDA, L. E.; JR., D. A. K.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, EUA, v.98, n. 6, p. 371 – 376, 1964.

CENCI, G.; CALDINI, G.; BOARI, L. Dioxygenase activity relative behaviour of *Pseudomonas* strains from soil in the presence of different aromatic compounds. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Itália, v. 15, n.1, p. 47-52, 1999.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>, acessado em 12 de fevereiro de 2011.

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

CHRZANOWSKI, L.; KACZOREK, E.; OLSZANOWSKI, A. Relation between *Candida maltosa* hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Polônia, v. 21, n. 6 –7, p. 1273–1277, 2005.

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

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Quebec, v. 53, n. 2, p.224- 229, 1987.

CORMACK, W. P. M.; FRAILE, E. R. Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. **Antarctic Science**, v.9, n.2, p.150-155, 1997.

DAGLEY, S. **Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in Pseudomonads**. In: SOKATCH, J. R. & ORNSTON, J. L. (Eds.) *The bacteria* Orlando, FL: Academic Press Inc, v. 10, 1986, p 527 – 555.

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

DEITSCH, J. J.; SMITH, J. A. Effect of Triton X-100 on the rate of trichloroethene desorption from soil to water. **Environmental Science and Technology**, EUA, v. 29, n. 4, p. 1069–1080, 1995.

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, n. 2, p.894–904, 2007.

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

DENGER, K.; SCHINK, B. New halo and thermotolerant fermenting bacteria producing surface-active compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Alemanha, v. 44, n. 1 -2, p.161– 166, 1995.

DESAI, J. D. & BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, Índia, v. 61, n. 1, p. 47 – 64, 1997.

DI TORO, S.; ZANAROLIA, G.; VARESEB, G. C.; MARCHISIOB, V. P.; FAVAA, F. Role of Enzyveba in the aerobic bioremediation and detoxification of a soil freshly contaminated by two different diesel fuels. **International Biodeterioration and Biodegradation**, França, v. 62, n. 2, p. 153–161, 2008.

DONOFRIO, R. S. **The biodegradability of biodiesel in marine and anaerobic fresh water environments** (*Burkholderia solanacaerem*, *Pseudomonas putida*) M.S. Thesis. Duquesne University, Pittsburg, Pennsylvani, 1996.

DUSANE, D. H.; ZINJARDE, S. S.; VENUGOPALAN, V. P.; McLEAN, R. J. C.; WEBER, M. M.; RAHMAN, P.K.S.M. Quorum sensing: implications on Rhamnolipid biosurfactant production. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Ucrânia**, v. 27, p. 159-184, 2010.

DYBAS, M. J.; HYNDMAN, D. W.; HEINE, R.; TIEDJE, J.; LINNING, K.; WIGGERT, D.; VOICE, T.; ZHAO, X.; DYBAS, L.; CRIDDLE, C. S. Development, operation, and long-term performance of a full-scale biocurtain utilizing bioaugmentation. **Environmental Science and Technology**, EUA, v. 36, n. 16, p. 3635 – 3644, 2002.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2ed. Brasília: EMBRAPA, 2006, 306p.

EN 14110 – Determination of methanol in fatty Acid Esters (FAME) for use as diesel fuel and domestic heating oil, 2003, disponível em: [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:D0TTINj7ScJ:www.dcgpartnership.com/Catalog/Standards/EN\\_14110.pdf+EN+14110&hl=ptBR&gl=br&pid=bl&srcid=ADGEESgeV2RLrxIK8uZ7KoRat9YzF77rH92g0Rj\\_AJKnUnMj4i4LVu\\_GYjH1UCKZwRnCaJMgw\\_83i5Burab2B\\_0685BVQGghwQXYQk01QwianVSKCB02UTC02jl1e6utFfCRk74IN&sig=AHIEtbQOwbifG1v3ivSUtCSjsQge1i9Uhw](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:D0TTINj7ScJ:www.dcgpartnership.com/Catalog/Standards/EN_14110.pdf+EN+14110&hl=ptBR&gl=br&pid=bl&srcid=ADGEESgeV2RLrxIK8uZ7KoRat9YzF77rH92g0Rj_AJKnUnMj4i4LVu_GYjH1UCKZwRnCaJMgw_83i5Burab2B_0685BVQGghwQXYQk01QwianVSKCB02UTC02jl1e6utFfCRk74IN&sig=AHIEtbQOwbifG1v3ivSUtCSjsQge1i9Uhw), acessado em 12 de fevereiro de 2011.

EVANS, F. F.; ROSADO, S.; SEBASTIAN, G. V.; CASELLA, R.; MACHADO, P. L. O. A.; HOLMSTROM, C.; KJELLEBERG, S.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. **FEMS Microbiology Ecology**, Brasil, v. 49, n. 1 - 2, p. 295–305, 2004.

FANGRUI, M.; MILFORD, A. H. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, EUA, v.70, n. 1, p.1 – 15, 1999.

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

FDA. Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>, acessado em 23 de julho de 2010.

FEPAM. Fundação Estadual de Proteção Ambiental. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/biblioteca/JIC/II/ecologia.asp>, acessado em 12 de fevereiro de 2011.

FERELLA, F.; MAZZIOTTI, G.; DE MICHELIS, I.; STANISCI, V.; VEGLIO, F. Optimization of the transesterification reaction in biodiesel production. **Fuel**, Itália, v. 89, n. 1, p. 36–42, 2010.

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

FRANKENBERGER, W. T. J. R.; KARLSON, U.. **Bioremediation of seleniferous soils**. Hinchee, R. E., and Olfenbuttel, R. F. On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment. Butterworth-Heinemann. Stoneham, MA., 1991, p. 239–254

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

FUKUDA, H.; KONDO A.; NODA, D. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Japão, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001

FUNHOFF, E. G.; VAN BEILEN, J. B. Alkane activation by P450 oxygenases. **Biocat Biotrans**, Suíça, v. 25, n. 2 – 4, p. 186 - 193, 2007.

GENTRY, T.; RENSING, C.; PEPPER, I. L. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 5, p. 447–494, 2004.

GENTRY, T.J.; NEWBY, D.T., JOSEPHSON, K.L.; PEPPER, I.L. Soil microbial population dynamics following bioaugmentation with a 3-chlorobenzoate degrading bacterial culture. **Biodegradation**, EUA v. 12, n. 5, p. 349 - 357, 2001.

GORNA, H.; LAWNICZAK, L.; ZGOŁA-GRZÉSKOWIAK, A.; KACZOREK, E. Differences and dynamic changes in the cell surface properties of three *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from petroleum-polluted soil as a response to various carbon sources and the external addition of rhamnolipids **Bioresource Technology**, Polônia, v. 102, n. 3, p. 3028–3033, 2011.



HAIGH, S. D. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. **The Science of the Total Environment**, v. 185, n. 1 – 3, p.161-170, 1996.

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.

HARAYAMA, S.; KOK, M.; NEIDLE, E.L. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. **Annual Review Microbiology**, Suíça, v. 46, p. 565–601, 1992.

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

HATFIELD, J. L.; STEWART, B.A. **Soil Biology: Effects on Soil Quality**.

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.

HINCHEE, R. E.; WILSON, J. T.; DOWNEY, D. C. (editors). **Intrinsic Bioremediation**. Battelle Press. Columbus, OH, 1995.

HOLT, J. G.; WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology 4**. Baltimore. Williams & Wilkins, 1989, p. 2300 – 2648.

HOSOKAWA, R.; NAGAI, M.; MORIKAWA, M.; OKUYAMA, H. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Japão, v. 25, n. 9, p.1519–1528, 2009.

JACQUES, R. J. S. **Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argilossolo**. 2005, 188 f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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

JACQUES, R. J. S.; SANTOS, E. C.; BENTO, F. M.; MARIA C.R. PERALBA, M. C. R.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. L. S.; CAMARGO, F. A. O. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas sp.* isolated from a petrochemical sludge landfarming site. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Brasil, v. 56, n. 3, p. 143–150, 2005.

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

JIMÉNEZ, N.; VIÑAS, M.; BAYONA, J. M.; ALBAIGES, J.; SOLANAS, A. M. The Prestige oil spill: bacterial community dynamics during a field biostimulation assay. **Applied Microbiology Biotechnology**, Espanha, v. 77, n. 4, p. 77:935–945, 2007.

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

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of Environmental Management**, Canadá, v. 71, n. 2, p. 95–122, 2004.

KIRTLAND, B. C.; AELION, C. M. Petroleum mass removal from low permeability sediment using air sparging/soil vapor extraction: impact of continuous or pulsed operation. **Journal of Contaminant Hydrology**, EUA, v. 41, n. 3 - 4, p. 367–383, 2000.

KOMILIS, D. P.; VROHIDOU, A. K.; VOUDRIAS, E. A. Kinetics of Aerobic Bioremediation of a Diesel-Contaminated Sandy Soil: Effect of Nitrogen Addition. **Water, Air and Soil Pollution**, Grécia, v. 208, n. 1 – 4, p.193–208, 2010.

KUHNT, G. Behaviour and fate of surfactants in soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.12, n. 10, p. 1813-1820, 1993.

LABUD, V.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. **Chemosphere**, Espanha, v. 66, p. 1863–1871, 2007.

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

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

LEE, N. R.; HWANG, M. O.; JUNG, G. H.; KIM, Y. S.; MIN, K. H. Physical structure and expression of *alkBA* encoding Alkane Hydroxylase and Rubredoxin Reductase from *Pseudomonas maltophilia*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Coreia do Sul, v. 218, n.1, p.17-21, 1996.

LENHARD, G. The dehydrogenase activity in soil as a measure of the activity of soil microorganisms. **Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenk.** v. 73, p. 1-11, 1956.

LERMONTOV, S. A.; USHAKOVA, L. L. Transesterification and esterification with subcritical methanol. Synthesis of biodiesel **Russian Chemical Bulletin**, International Edition, Moscou, v. 56, n.1, p.105-107, 2008.

LI-HUA, C.; YA-FANG, C.; SHIH-YANG, Y.; JUNGHUI, C. Ultrafiltration of triglyceride from biodiesel using the phase diagram of oil-FAME-MeOH. **Journal of Membrane Science**, Taiwan, v.330, n. 1 – 2, p. 156–65, 2009.

LIN, X.; LI, X.; LI, P.; LI, F.; ZHANG, L.; ZHOU, Q. Evaluation of Plant-Microorganism Synergy for the Remediation of Diesel Fuel Contaminated Soil. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, China, v. 81, n. 1, p.19–24, 2008.

LIU, P. G.; WHANG, L.; CHANG, T. C.; TSENG, I.; PAN, P.; SHENG-SHUNG CHENG, S. Verification of necessity for bioaugmentation – lessons from two batch case studies for bioremediation of diesel contaminated soils. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, França, v. 84, n. 6, p.808–819, 2009.

MAcFADDIN, J. M. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. WILLIAMS & WIKINS. Baltimore, 912 pp. HOLT, J. G, WILLIAMS, S. T., SHARPE, M.E., 1989. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology 4. Baltimore. Williams & Wilkins, 2000, p. 2300 – 2648.

MAIER, R. Biosurfactants. Evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, USA, v. 52, p. 101 – 121, 2003.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Índia, v. 20, n. 1, p. 48– 52, 1998.

MARGESIN, R.; HAMMERLE, M.; TSCHERKO, D. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. **Microbial Ecology**, Áustria, v. 53, n. 2, p. 259–269, 2007.

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.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, Áustria, v. 40 , n. 4 p. 339 - 346, 2000.

MARIANO, A. P.; BONOTTO, D. M.; ANGELIS, D. F.; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. Use of weathered diesel oil as a low-cost raw material for biosurfactant production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 269-274, 2008a.

MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. A. G.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M.; Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 38, n. 2, p. 346 - 353, 2007.

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

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

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**, Espanha, v. 183, n. 14, p. 4202–4209, 2001.

MISHRA, V.; LAL, R.; SRINIVASAN. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, Índia, v.27, n.2 p.133-166, 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.

MØLLER, J.; GAARN, H.; STECKEL, T. WEDEBYE, B.; WESTERMANN, P. Inhibitory effects on degradation of diesel oil in soil-microcosms by a commercial bioaugmentation product. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 6, p. 913–918, 1995.

MORGAN, P.; WATKINSON, R. J. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. **Critical Reviews in Biotechnology**, Reino Unido, v. 8, n. 4, p.305–333, 1989.

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

NANNIPIERI, P.; GREGO, S.; CECCANTI, B. Ecological significance of the biological activity in soil. In: **Soil Biochemistry**, (eds J.M. Bollag & G. Stotzky), Nova Iorque, Cap. 6, 1990 p. 293–355.

NORRIS, R. D.; HINCHEE, R. E.; BROWN, R. A.; MCCARTY, P. L.; SEMPRINI, L.; WILSON, J. T.; KAMPBELL, D. H.; REINHARD, M.; BOWER, E. J.; BORDEN, R. C.; VOGEL, T. M.; THOMAS, J. M.; WARD, C. H. **Handbook of bioremediation**, CRC, Boca Raton, Fla, 1994.

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

OBUEKWE, C. O.; AL-JADI, Z. K.; AL-SALEH, E. S. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Kuwait, v. 63, n. 3, p. 273–279, 2009.

OWSIANIAK, M.; SZULC, A.; CHRZANOWSKI, L.; CYPLIK, P.; BOGACKI, M.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; HEIPIEPER, H. J. Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Dinamarca, v. 84, n. 3, p. 545–553, 2009.

PANDA T.; GOWRISHANKAR, B. S. Production and applications of esterases. **Applied Microbiology Biotechnology**, Índia, v. 67, n. 2, p. 160–169, 2005.

PARIA, S. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. **Advances in Colloid and Interface Science**, Índia, v. 138, n. 1, p. 24–58, 2008.

PASQUALINO, J. C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass and Bioenergy**, Espanha, v. 30, n. 10, p.874–879, 2006.

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

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.

PIROLLO, M. P. S.; MARIANO, A. P.; LOVAGLIO, R. B.; COSTA, S. G. V. A. O.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon contaminated site.

**Journal of Applied Microbiology**, São Paulo, v. 105, n. 5, p. 1484-1490, 2008.

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

RAMADHAS, A. S.; JAYARAJ, S.; MURALEEDHARAN, C. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. **Fuel**, Índia, v. 84, n.4, p. 335–340, 2005.

REDDY, K. R.; ADMAS, J. F.; RICHARDSON, C. Potential technologies for remediation of Brownfield. **Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management**, EUA, v. 3, n.2, 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. & VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, França, v.44, n. 2 -3, p.93-100, 1999.

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

ROSENBERG, M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. **FEMS Microbiology Letters**, Israel, v. 262, n. 2, p. 129–134, 2006.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, Israel, v. 9, n.1, 29–33, 1980

ROTMAN, B.; PAPERMASTER, B. W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, EUA, v. 55, n. 1, p. 134–141, 1966.

ROY, S.; HENS, D.; BISWAS, D.; KUMAR, R. Survey of petroleum degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Índia, v. 18, n. 6, p. 575-581, 2002.

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 & Biodegradation**, Itália, v. 63, n. 7, p. 936–942, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA, 1989.

SANTOS, F. K. G.; ALVES, J. A. A.; DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A.; JÚNIOR, T. V. D.; NETO, E. L. B. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. 4º **PDPETRO**, Campinas, SP, 21-24 de Outubro de 2007

SANTOS, M. M. **Caracterização bioquímica de uma esterase halofílica de *Haloarcula marismortui***. 2009. Dissertação de mestrado em Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 157 p, 2009.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, EUA, v.136, n. 1, p.187-195, 2005.

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

SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E.; MARGESIN, R. (Eds.) **Methods in soil biology**. Germany: Springer-Verlag, 1996.

SCHWARTZ, E.; SCOW, K. M. Repeated inoculation as a strategy for the remediation of low concentrations of phenanthrene in soil. **Biodegradation**, EUA, v. 12, n. 3, p.201–207, 2001.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15 – 22, 1957.

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-JÚNIOR, F. M. R.; VARGAS, V. M. F. Avaliação de áreas de influência de uma termelétrica a carvão através de ensaio de genotoxicidade. **Journal Brazilian of Ecotoxicology**, v. 2, n. 2, p. 197 – 199, 2007.

STEVENSON, L. L. Some observations on the microbial activity in remoistened air-dried soils. **Plant Soil**, v. 8, p. 170-182, 1956.

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

SWIFT, S.; ROWE, M. C.; KAMATH, M. Quorum Sensing W. El-Sharoud (ed.) **Bacterial Physiology: A Molecular Approach**. Nova Zelândia, p. 179 – 232, 2007

TALON, R.; MONTEL, M. C. Hydrolysis of esters by Staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, França, v. 36, n. 2 - 3, p. 207–214, 1997.

TANI, A.; ISHIGE, T.; SAKAI, Y.; KATO, N. Gene structure and regulation of the alkane hydroxylase complex of *Acinetobacter sp.* strain M-1, **Journal of Bacteriology**, Japão, v. 183, n. 5, p.1819–1823, 2001.

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**, Alemanha, v.178, n. 7, p. 1858–1865, 1996.

THALMANN A. Zur methodik der bestimmung der dehydrogenase aktivita triphenyltetrazolium chlorid (TTC) im bodem mittels, **Lanawiktsch Forsch**, v.21, p.249-258, 1968.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I.M. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioresource Technology**, v. 102, n.2, p. 772–778, 2011.

THOMPSON, I. P.; VAN DER GAST, C. J.; CIRIC, L.; SINGER, A. C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. **Environmental Microbiology**, Ucrânia, v. 7, n.7, p. 909–915, 2005.

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.

U.S. EPA Method-3540C, Soxhlet Extraction, revision 3, 1996.

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

US EPA MÉTODO 8015B Nonhalogenated organics using GC/Fid Orgânicos Nonhalogenated usando GC / FID, 1996, disponível em:



<http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/8015b.pdf>, acessado em 12 de fevereiro de 2011.

VAN BEILEN, J. B.; FUNHOFF, E. G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Zurique, v. 74, n. 1, p13–21, 2007

VAN BEILEN, J. B.; LI, Z.; DUETZ, W. A.; SMITS, T. H. M.; WITHOLT, B. Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP, v. 58, n. 4, p. 427-440, 2003.

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

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 DYKE, M. I.; GULLEY, S. L.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Evaluation of microbial surfactants for recovery pollutants from soil of hydrophobic. **Journal of Industrial Microbiology**, Canadá, v. 11, n. 3, p. 163-170, 1993

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

VAN LOOSDRECHT, M. C.; LYKLEMA; J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J. **Applied Environmental Microbiology**, Holanda, v. 53, n. 8, p.1893–1897, 1987.

VIDELA, H. A., GUIAMET, P. S.; REINOSO, E. H. Biocorrosion of structural materials by fungal contaminants of jet fuels. A State of the art. **First NACE Latin American Region Corrosion Congress and First Venezuelan Corrosion Congress**, Maracaibo, November 6–11, 1994.

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 deTecnologia de Biodiesel**, Brasília, 2007.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; RULKENS, W. H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. **Biodegradation**, Holanda, v. 8, n. 1, p. 401–417, 1998.

VON OEPEN, B.; KORDEL, W.; KLEIN, W. Sorption of non-polar and polar compounds to soils: processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106. **Chemosphere**, v. 22, n. 3 – 4, p. 285-304, 1991.

WALECKA-HUTCHISON, C. M.; WALWORTH, J. L. Assessment of C:N ratios and water potential for nitrogen optimization in diesel bioremediation. **Bioremediation Journal**, v.10, n. 1 - 2, p. 25–35, 2006.

WALWORTH, J. L.; WOOLARD, C. R.; BRADDOCK, J. F.; & REYNOLDS, C. M. Enhancement and inhibition of soil petroleum biodegradation through the use of fertilizer nitrogen: An approach to determining optimum levels. **Journal of Soil Contamination**, v.6; n. 5, p. 465–480, 1997.

WATKINSON, R.; MORGAN, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon degrading microorganisms. **Biodegradation**, v.1, n 2 -3, p. 79–92, 1990.

WHITE, P. A.; CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research**, v. 567, n. 2 - 3, p. 227–345, 2004.

WICK, L. Y.; COLANGELO, T.; HARMS, H. Kinetics of mass transfer-limited bacterial growth on solid PAHs. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 354-361, 2001.

WILLUMSEN, P. A. e KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. **Biodegradation**, Dinamarca, v.7, n. 5, p. 415 – 423, 1997.

YEOM, I. T.; GHOSH, M. M.; COX, C. D. Kinetic aspects of surfactant solubilization of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Science and Technology**, EUA, v. 30, n. 5, p. 1589–1595, 1996.

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; MOLLER, G; HAWS, R. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transaction ASABE**, v. 41, n. 5, p.1423–30, 1998.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Effects of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. **Environmental Microbiology**, EUA, v. 61, n. 6, p. 2247 – 2251, 1995.

## 9. ANEXOS

### 9. 1 Meio Mineral MM1, pH = 7,2 (Richard & Vogel, 1999).

Solução de Macronutrientes			
Reagentes	g L <sup>-1</sup>	Substituto	g L <sup>-1</sup>
KCl	0,7		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	2,9
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,0		

Solução de Micronutrientes (1mL/L)			
Reagentes	g L <sup>-1</sup>	Substituto	g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	4,0	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,20
FeSO <sub>4</sub>	0,2	FeSO <sub>4</sub> .7SO <sub>4</sub>	0,36
MnCl <sub>2</sub>	0,2	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,31
CaCl <sub>2</sub>	0,2	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,26

Obs.: Dissolver os reagentes em água deionizada e autoclavar por 20 min. a 121 °C.

### 9. 2 Meio Ágar Nutriente, pH = 7,0.

Reagentes	g L <sup>-1</sup>
Extrato de Carne	3,0
Peptona Bacteriológica	5,0
Ágar Bacteriológico	15,0

Obs.: Dissolver os reagentes em água deionizada e autoclavar por 20 min. a 121 °C.

### 9. 3 Coloração de GRAM dos 10 isolados pré-selecionados

Isolado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Morfologia Celular	B	B	B	B	B	B	C/B	B	B	B
GRAM	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+

### 9. 4 Caldo Nutriente, pH = 7,0.

Reagentes	g L <sup>-1</sup>
Extrato de Carne	3,0
Peptona Bacteriológica	5,0

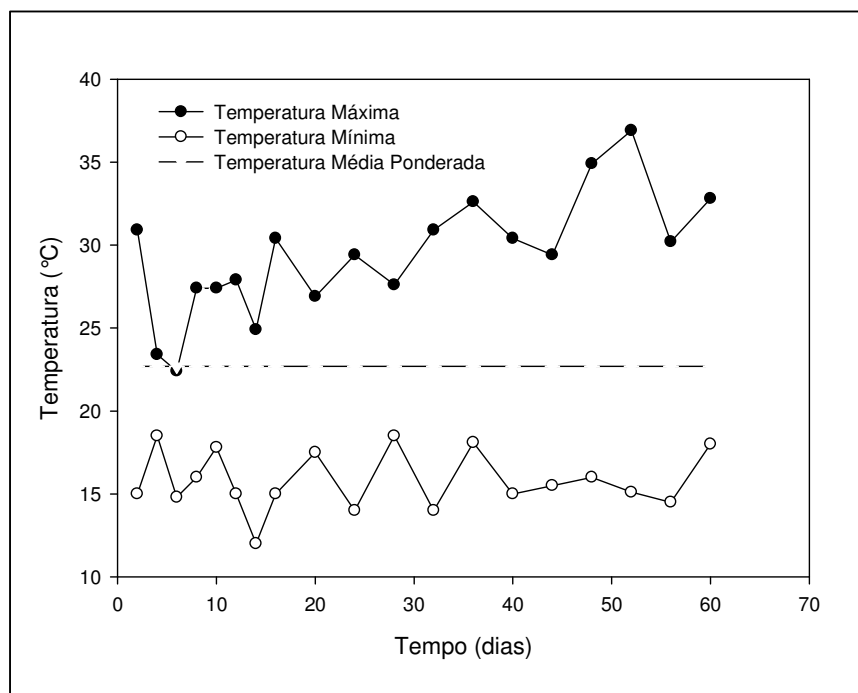
Obs.: Dissolver os reagentes em água deionizada e autoclavar por 20 min. a 120 °C.

### 9. 5 Solução Mineral com Indicador-Redox (TTC ou DCPIP)

Solução	Volume
MM1	400 mL
TTC ou DCPIP (0,25 g L <sup>-1</sup> )	100 mL

Obs.: Diluir a solução A em B e autoclavar por 20 min. a 121 °C. Proteger o meio da luz, cobrindo o frasco com papel-alumínio.

### 9. 6 Monitoramento de Temperaturas Mínimas e Máximas e a Média Ponderada (22,63 °C).



### 9. 7 Meio de Crescimento para extração de DNA cromossômico. Caldo infuso do cérebro e coração (BHI).

Reagentes	g L <sup>-1</sup>
NaCl	5,0
Dextrose	2,0
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5
Infuso de Cérebro e Coração*	17,5

Peptona de Carne	5,0
Peptona de Caseína	5,0

---

\* 12,5 g (cérebro de carneiro) + 5,0 g (coração de boi).

**9. 8 TE 1X – 10 mM TRIS, 25 mM EDTA, pH = 8,0.**

---

Reagentes	Volume
TRIS	1,0 mL
EDTA	5,0 mL
Água	94 mL

---

### 9.9 Perfil Bioquímico dos quatro isolados relacionados para o consórcio

<b>Testes/Isolado</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Morfologia celular	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Coco/bacilo
Gram	+	+	-	-
Catalase	+	+	+	+
Motilidade (SIM)	-	-	+	-
Indol (SIM)	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S (SIM)	-	-	+	-
VM	+	+	-	-
VP	+	+	-	-
NO <sub>3</sub> /NO <sub>2</sub>	+	+	+	+
Fenilalanina	-	-	+	-
Citrato	-	-	-	-
TSI	+	+	+	-
Oxidação	+	+	+	-
Fermentação	+	+	-	-
Ureia	-	-	-	-
Oxidase	-	-	+	-
Endósporos	-	-	-	-

## 10. VITTA

### 10. 1 Dados Pessoais

Nome: Daniel Derrossi Meyer

Filiação: Gecilda Derrossi Meyer e Olavo de Oliveira Meyer

E –mail: d\_biomeyer@yahoo.com.br

### 10. 2 Formação Acadêmica

2009 – 2011 – Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

2003 – 2008 – Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

### 10. 3 Experiência Profissional

3/2005 – 8/2005 - **Monitoria Acadêmica, disciplina de Sistemática Vegetal I**

**Atividade:** Monitoria Acadêmica Complementar da disciplina de Sistemática Vegetal I (algas micro/macroscópicas e fungos) junto ao Departamento de Botânica, Instituto de Biociências – UFRGS, sob orientação da Profa. Dra. Maria Luísa Lorscheitter.

**Horas de Atividade:** 320 h.



5/2007 – 2/2009 – **Bolsista de Iniciação Científica, Laboratório de Mutagênese Ambiental e Análises Moleculares.**

**Atividade:** desenvolvimento do projeto intitulado “Atividade Mutagênica de Misturas Complexas: áreas de referência para diagnóstico ambiental.”, utilizando o bioensaio *Salmonella* microssoma/AMES, como ferramenta para avaliar a qualidade dos solos quanto à presença de compostos inorgânicos (metais pesados) e compostos orgânicos, a fim de buscar áreas de referência (solos) para comparar com sítios contaminados no estado do Rio Grande do Sul, sob orientação da Profa. Dra. Vera Ferrão Vargas, FEPAM.

**Horas de Atividade:** 1520 h.

1/2009 – 1/2011 - **Curso Pré-Vestibular Organização Não Governamental para a Educação Popular.**

**Atividade:** professor de Biologia em ONG, com o objetivo de auxiliar alunos de baixa renda a ingressarem em universidades públicas, sob coordenação técnica e pedagógica do Professor Mário Rangel.

**Horas de Atividade:** 500 h.