



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS
SUSTENTÁVEIS

CAROLINE BADZINSKI

POTENCIAL DE ATENUAÇÃO NATURAL DE DIESEL (B8) E BIODIESEL (B100)
EM LATOSSOLO VERMELHO SEM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO

CERRO LARGO – RS

2018

CAROLINE BADZINSKI

**POTENCIAL DE ATENUAÇÃO NATURAL DE DIESEL (B8) E BIODIESEL (B100)
EM LATOSSOLO VERMELHO SEM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Linha de Pesquisa: Qualidade Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

CERRO LARGO – RS

2018

BADZINSKI, Caroline.

Potencial de atenuação natural de diesel (B8) e biodiesel (B100) em Latossolo vermelho sem histórico de contaminação / Caroline Badzinski.-- 2018.

141 f. ; il.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit.

Dissertação (Mestrado) – Universidade federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Mestrado em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis - PPGATS, Cerro Largo, RS, 2018.

1. Combustíveis. 2. Hidrocarbonetos de petróleo. 3. Contaminação do solo. 4. Atividade microbiana. 5. Degradação. I. Daroit, Daniel Joner, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

CAROLINE BADZINSKI

**POTENCIAL DE ATENUAÇÃO NATURAL DE DIESEL (B8) E BIODIESEL (B100)
EM SOLO SEM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Área de Concentração: Monitoramento, Controle e Gestão Ambiental

Linha de Pesquisa: Qualidade Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

Esta Dissertação foi defendida e aprovada pela banca em: 13/07/2018

BANCA EXAMINADORA



Prof: Dr. Daniel Joner Daroit – UFFS



Prof. Dr. Douglas Rodrigo Kaiser – UFFS



Prof. Dr. Luciane Maria Colla - UPF

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.”

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Daniel Joner Daroit, pela oportunidade e por todo apoio, suporte e confiança depositada em mim. Também agradeço por ter acreditado em meu trabalho desde o início e pelo entusiasmo demonstrado a cada novo resultado obtido ao longo da jornada.

Aos professores do PPGATS pelos seus ensinamentos, que certamente me foram muito úteis durante essa caminhada.

Agradeço aos professores que colaboraram de alguma forma com o aperfeiçoamento das minhas análises iniciais, como os professores Douglas Rodrigo Kaiser, Renan Costa Beber Vieira, Bruno Munchen Wenzel e Suzymeire Baroni.

Ao professor Benhur de Godoi pela disponibilidade e por todo o auxílio nas análises cromatográficas.

Ao aluno Rodrigo Ferraz Ramos pelo auxílio nos experimentos durante o monitoramento dos microcosmos.

Aos colegas de mestrado pelos momentos de descontração, de estudo e também por compartilharem alegrias e angústias.

Aos colegas de trabalho pela compreensão nos momentos em que estive afastada (em férias ou em PLEDUCA) para realizar minhas atividades de pesquisa durante os semestres letivos.

A minha família, principalmente na figura da minha irmã mais velha Cláudia Badzinski que sempre me deu muito apoio, força, motivação e consolo quando necessário. Que mesmo do outro lado do oceano sempre conseguiu se fazer presente em minha vida. Que muito mais do que uma irmã é uma amiga e muitas vezes uma mãe para mim.

Aos meus amigos por cada palavra de conforto e por compreenderem que

nem sempre poderia dar a devida atenção merecida. Vocês fizeram da minha caminhada algo mais leve.

Ao professor Diego (*in memoriam*) pela oportunidade dada com a criação desse programa de mestrado e que mesmo com o pouco tempo de convívio, com certeza deixou um exemplo de luta, força e determinação.

A banca por ter aceito o convite, por se fazer presente e pelas contribuições ao trabalho.

RESUMO

O óleo diesel, composto basicamente por hidrocarbonetos, é atualmente o derivado de petróleo mais consumido no Brasil. Biodiesel é acrescido ao diesel comercializado em território nacional, seguindo a legislação vigente. O biodiesel surgiu como um combustível alternativo, de fontes renováveis, composto por ésteres alquílicos de ácidos graxos, menos poluentes e mais biodegradáveis. Os microrganismos do solo atuam em processos importantes como na degradação e mineralização de uma grande diversidade de compostos orgânicos. A contaminação do solo por combustíveis, que pode ocorrer de diversas formas durante a cadeia produtiva, inibindo parte da microbiota pela toxicidade de seus componentes, mas também incrementar populações autóctones capazes de degradar tais compostos. O objetivo deste trabalho foi avaliar, durante 90 dias, a biodegradação de diesel (B8) e biodiesel (B100), aplicados em duas concentrações (5 e 10%, m m⁻¹), em microcosmos constituídos de latossolo vermelho sem histórico de contaminação por combustíveis. Os solos contaminados apresentaram respiração superior à do solo não contaminado. Os solos contaminados com diesel apresentaram respiração até 5,2 vezes maior do que o solo controle e apresentaram maiores atividades de hidrólise do diacetato de fluoresceína e da desidrogenase do que os solos contaminados com biodiesel, porém inferiores ao solo controle quando relacionado às atividades enzimáticas. Solos contaminados com diesel apresentaram maior número de microrganismos do que os solos com biodiesel e solo controle. O carbono da biomassa microbiana apresentou comportamento similar às atividades enzimáticas, sendo que, ao final dos 90 dias, foi maior no solo controle, seguido pelo solo com diesel e inferior no solo com biodiesel. O quociente metabólico indicou maior estresse da microbiota nos solos contaminados com biodiesel em relação aos solos com diesel e solo controle. A fitotoxicidade dos solos contaminados com diesel, verificada através da germinação de sementes, foi aparentemente reduzida em mais de 80% após 90 dias de incubação do solo em relação à toxicidade inicial. A contaminação com biodiesel resultou na fitotoxicidade mais elevada no decorrer da incubação. Ao final da incubação, houve redução de 70% (diesel 5%) e 50% (diesel 10%) na massa dos combustíveis extraído do solo; nos tratamentos com biodiesel, as reduções de massa foram de 61% (biodiesel 5%) e 48% (biodiesel 10%). Ao final do período de incubação dos microcosmos também foram observadas, através de cromatografia gasosa, reduções nos picos de retenção, bem como nas áreas de componentes dos combustíveis, sugerindo a biodegradação. Após os 90 dias de incubação dos solos contaminados foram isoladas 34 bactérias (24 dos microcosmos com diesel e 10 dos com biodiesel), das quais 30 apresentaram capacidade de degradar combustíveis (diesel ou biodiesel). Dentre estas, 18 produziram biossurfactantes, sendo que para 10 isolados a produção foi majoritariamente extracelular e para seis isolados os biossurfactantes permaneceram associados às células. Além da produção de biossurfactantes, alguns dos isolados, principalmente aqueles isolados de solo com diesel, apresentaram valores de hidrofobicidade celular acima de 40%. Em suma, foi verificado que o solo utilizado, mesmo sem histórico de contaminação, apresentou microbiota autóctone com capacidade de degradar combustíveis em condições de atenuação natural.

Palavras-chave: Combustíveis. Hidrocarbonetos de petróleo. Contaminação do solo. Atividade microbiana. Degradação.

ABSTRACT

Diesel oil, mainly composed of hydrocarbons, is currently the most consumed petroleum derivative in Brazil. Biodiesel is added to the diesel sold in national territory, according to current legislation. Biodiesel has emerged as an alternative fuel, obtained from renewable sources, composed of fatty acid alkyl esters, less polluting and more biodegradable. Soil microorganisms act in important processes, such as the degradation and mineralization of a great diversity of organic compounds. Soil contamination by fuels, which could occur in various forms during the production chain, might inhibit part of the microbiota due to the toxicity of its components, but also increase autochthonous populations capable of degrading such compounds. The objective of this work was to evaluate, during 90 days, the biodegradation of diesel (B8) and biodiesel (B100), applied in two concentrations (5 and 10%, m m⁻¹) to microcosms composed by a red latosol with no history of fuel contamination. Contaminated soils showed higher respiration than uncontaminated soil. Particularly, soils with diesel had a respiration up to 5.2 times higher than the control soil. Soils with diesel presented greater hydrolysis of fluorescein diacetate and dehydrogenase activity than the soils contaminated with biodiesel, but inferior than the control soil. The soils contaminated with diesel presented respiration up to 5.2 times higher than the control soil and presented greater activities of fluorescein diacetate hydrolysis and dehydrogenase than the soils contaminated with biodiesel, but inferior to the control soil when related to the enzymatic activities. Soils contaminated with diesel had a higher number of microorganisms than the soils with biodiesel and control soil. The microbial biomass carbon presented similar behavior to the enzymatic activities. At the end of the 90 days, it was higher in the control soil, followed by the soil with diesel and lower in the soil with biodiesel. The metabolic quotient indicated greater stress of the microbiota in the soils contaminated with biodiesel in comparison to soils with diesel and control soil. Phytotoxicity of soils contaminated with diesel, verified through seed germination, was apparently reduced by more than 80% after 90 days of soil incubation in relation to the initial toxicity. Biodiesel contamination resulted in the highest phytotoxicity during the incubation. At the end of the incubation, there was a reduction of 70% (diesel 5%) and 50% (diesel 10%) in the mass of the fuel extracted from the soil; in biodiesel treatments, mass reductions were 61% (biodiesel 5%) and 48% (biodiesel 10%). At the end of the microcosm incubations, reductions in retention peaks as well as in the areas of fuel components were observed through gas chromatography analysis, suggesting biodegradation. After the 90 days of incubation of the contaminated soils, 34 bacteria were isolated (24 from diesel microcosms and 10 from biodiesel microcosms), of which 30 showed the capacity to degrade fuels (diesel or biodiesel). Among these, 18 produced biosurfactants; for 10 isolates the production was mostly extracellular and for six isolates the biosurfactants remained cell-associated. In addition to the production of biosurfactants, some of the isolates, especially those isolated from soil with diesel, presented cellular hydrophobicity values above 40%. In summary, it was verified that the soil used, even without a history of contamination, displayed an autochthonous microbiota with the capacity to degrade fuels under natural attenuation conditions.

Keywords: Fuels. Petroleum hydrocarbons. Soil contamination. Microbial activity. Degradation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do solo utilizado nos experimentos	52
Tabela 2 – Ácidos graxos constituintes do biodiesel de soja	53
Tabela 3 – Compostos extraídos de solo contaminado com diesel 5% (T2), no início e ao término dos 90 dias de incubação (apresentadas apenas as reduções).....	84
Tabela 4 – Compostos extraídos de solo contaminado com diesel 10% (T3), no início e ao término dos 90 dias de incubação (apresentadas apenas as reduções).....	84
Tabela 5 – Compostos extraídos de solo contaminado com biodiesel 5% (T4), no início e ao término dos 90 dias de incubação.....	87
Tabela 6 – Compostos extraídos de solo contaminado com biodiesel 10% (T5), no início e ao término dos 90 dias de incubação.....	87
Tabela 7 – Morfologia e perfil tintorial de Gram de isolados bacterianos de biodiesel.	89
Tabela 8 – Morfologia e perfil tintorial de Gram de isolados bacterianos de diesel...	89
Tabela 9 – Avaliação de 10 isolados bacterianos, obtidos a partir de tratamento com biodiesel (T4), quanto à potencial utilização de componentes deste combustível como substratos orgânicos.....	90
Tabela 10 – Avaliação de 24 isolados bacterianos, obtidos a partir de tratamentos com diesel (T2 e T3), quanto à potencial utilização de componentes deste combustível como substratos orgânicos	90
Tabela 11 – Índice de emulsificação (IE ₂₄), na presença ou ausência de células bacterianas, após 10 dias de cultivo em meio contendo biodiesel (B) ou óleo diesel (D) como único substrato orgânico.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução da produção de biodiesel no Brasil (2007-2016)	17
Figura 2 – Infraestrutura de produção e movimentação de petróleo e derivados - 2016	21
Figura 3 – Principais rotas para a degradação bacteriana aeróbica e anaeróbica de hidrocarbonetos.....	35
Figura 4 – Fluxograma da abordagem metodológica da dissertação numeradas conforme a ordem das etapas de execução.	51
Figura 5 – Produção cumulativa de CO ₂ por experimento respirométrico nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação	67
Figura 6 – Atividade hidrolítica total do solo nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação	69
Figura 7 – Atividade da desidrogenase nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação.....	70
Figura 8 – Carbono da biomassa microbiana nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação	71
Figura 9 – Quociente metabólico nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação.....	72
Figura 10 – Contagem de microrganismos heterotróficos totais pelo NMP nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação.....	73
Figura 11 - Contagem de microrganismos degradadores pelo NMP nos tratamentos com diesel (incluindo controle) ao longo de 90 dias de incubação.....	74
Figura 12 – Contagem de microrganismos degradadores pelo NMP nos tratamentos com biodiesel (incluindo controle) ao longo de 90 dias de incubação.....	75
Figura 13 – pH do solo nos cinco tratamentos, ao longo de 90 dias de incubação...	76
Figura 14 – Índice de germinação de sementes de alface (%) nos quatro tratamentos contaminados com diesel/biodiesel em relação ao controle, ao longo de 90 dias de incubação.....	77
Figura 15 – Índice de germinação de sementes de pepino (%) nos quatro tratamentos contaminados com diesel/biodiesel em relação ao controle, ao longo de 90 dias de incubação	78

Figura 16 – Inibição de germinação de sementes de alface (%) nos quatro tratamentos contaminados com diesel/biodiesel em relação ao controle, ao longo de 90 dias de incubação	79
Figura 17 – Inibição de germinação de sementes de pepino (%) nos quatro tratamentos contaminados com diesel/biodiesel em relação ao controle, ao longo de 90 dias de incubação	79
Figura 18 – Redução do teor de combustíveis (%) diesel/biodiesel extraídos dos quatro tratamentos contaminados, ao longo de 90 dias de incubação.....	20
Figura 19 – Cromatograma de diesel (B8).	81
Figura 20 – Cromatograma de biodiesel de soja (B100).....	81
Figura 21 – Cromatogramas sobrepostos referentes às amostras extraídas do solo do tratamento com diesel 5% (T2) nos tempos 0 e 90 dias.	82
Figura 22 – Cromatogramas sobrepostos referentes as amostras extraídas do solo do tratamento com diesel 10% (T3) nos tempos 0 e 90 dias	83
Figura 23 – Cromatogramas sobrepostos referentes às amostras extraídas do solo do tratamento com biodiesel 5% (T4) nos tempos 0 e 90 dias.....	85
Figura 24 – Cromatogramas sobrepostos referentes às amostras extraídas do solo do tratamento com biodiesel 10% (T5) nos tempos 0 e 90 dias.....	86
Figura 25 – Hidrofobicidade celular (%) após 10 dias de cultivo em meio contendo biodiesel (B) ou óleo diesel (D) como único substrato orgânico em tolueno e xileno....	92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVO GERAL	15
1.1.1 Objetivos específicos.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 DIESEL E BIODIESEL	16
2.2 CONTAMINAÇÃO DO SOLO COM COMBUSTÍVEIS.....	19
2.2.1 Problemas de contaminação ambiental na cadeia produtiva de diesel e biodiesel	19
2.2.2 Contaminação e problemáticas no Brasil	22
2.2.3 Efeitos dos contaminantes sobre o ambiente e a biota	23
2.3 MICROBIOTA DO SOLO	27
2.3.1 Parâmetros microbiológicos do solo.....	29
2.4 BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL E BIODIESEL.....	33
2.4.1 Produção de biossurfactantes	40
2.5 BIORREMEDIAÇÃO	43
2.5.1 Biorremediação <i>ex situ</i>	45
2.5.2 Biorremediação <i>in situ</i>	45
2.5.3 Estudos ecotoxicológicos relacionados à biorremediação	48
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 COLETA, CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO	51
3.2 PREPARO DOS CONTAMINANTES	52
3.3 MONTAGEM E INCUBAÇÃO DOS MICROCOSMOS	53
3.4 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA.....	54
3.5 ATIVIDADE HIDROLÍTICA MICROBIANA DO SOLO	55
3.6 ATIVIDADE DE DESIDROGENASE	56
3.7 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA	56
3.7.1 Quociente metabólico.....	58
3.8 ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS.....	58
3.9 ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES.....	59
3.10 AVALIAÇÃO DO pH DO SOLO.....	59
3.11 AVALIAÇÃO DE FITOTOXICIDADE	60
3.12 DEGRADAÇÃO DOS CONTAMINANTES	61

3.12.1 Extração a partir do solo e determinação gravimétrica.....	61
3.12.2 Avaliação por cromatografia (GCMS)	62
3.13 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DOS MICROCOSMOS CONTAMINADOS.....	63
3.14 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DEGRADADORA E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES DOS ISOLADOS.....	64
3.14.1 Preparo dos inóculos.....	64
3.14.2 Indicação da capacidade dos isolados em degradar combustíveis.....	64
3.14.3 Detecção da produção de biosurfactantes e hidrofobicidade celular.....	65
3.14.3.1 Índice de emulsificação (IE)	65
3.14.3.2 Medida da hidrofobicidade celular (HC)	66
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
4 RESULTADOS	67
4.1 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA.....	67
4.2 ATIVIDADE HIDROLÍTICA MICROBIANA DO SOLO.....	68
4.3 ATIVIDADE DE DESIDROGENASE	69
4.4 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA E QUOCIENTE METABÓLICO.....	70
4.5 ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS E MICRORGANISMOS DEGRADADORES	72
4.6 AVALIAÇÃO DO pH DO SOLO.....	75
4.7 AVALIAÇÃO DE FITOTOXICIDADE	76
4.8 DEGRADAÇÃO DOS CONTAMINANTES	80
4.9 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DOS MICROCOSMOS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DEGRADADORA.....	88
4.9.1 Avaliação da produção de biosurfactantes dos isolados bacterianos e hidrofobicidade celular	91
5 DISCUSSÃO	94
5.1 COMPORTAMENTO DOS PARÂMETROS DA MICROBIOTA, pH, DEGRADAÇÃO DE COMBUSTÍVEIS E FITOTOXICIDADE EM MICROCOSMOS ..	94
5.2 ISOLAMENTO, AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DEGRADADORA E DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	115
6 CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS.....	122

1 INTRODUÇÃO

Dentre os derivados de petróleo, o óleo diesel é o mais consumido no Brasil, principalmente em função do predomínio do transporte rodoviário e também por ser utilizado no transporte marítimo. Este combustível é composto basicamente por hidrocarbonetos e, em menores concentrações, por enxofre, nitrogênio e oxigênio.

Como alternativa ao diesel, de origem fóssil, surgiu o biodiesel de fontes renováveis, o qual é composto por ésteres alquílicos de ácidos graxos. No Brasil o óleo diesel é classificado em óleo diesel A (sem adição de biodiesel) e em óleo diesel B (com adição de biodiesel). A mistura do biodiesel ao óleo diesel passou a ser legalmente obrigatória em janeiro de 2008, com a adição de 2% de biodiesel ao óleo diesel em todo território nacional. Esse percentual tem sido ampliado sucessivamente e atualmente é de 10%.

O biodiesel é um combustível biodegradável, de origem vegetal ou animal e é menos tóxico do que o diesel convencional. Óleos de origem vegetal, extraídos dos grãos de plantas como a soja, o girassol, a mamona, o amendoim, entre outras, são os mais utilizados para a produção de biodiesel, usualmente através de transesterificação utilizando catálise química. A adição do biodiesel ao diesel, além de reduzir os custos, também contribui com menores emissões de substâncias tóxicas na atmosfera.

As atividades de exploração, produção, refino e transporte de petróleo e de seus derivados apresentam riscos ambientais devido à existência de constituintes tóxicos em sua composição, assim como em seus resíduos. Os riscos de derrames acidentais durante a extração do petróleo, seu processamento e obtenção dos derivados, bem como dos possíveis vazamentos dos produtos armazenados, são consideráveis. A adição do biodiesel ao diesel não traria apenas benefícios, pois o biodiesel pode aumentar o potencial corrosivo da mistura, o que aumentaria os riscos de contaminação devido a vazamentos no solo, visto que esses combustíveis costumam ser armazenados em tanques metálicos subterrâneos em postos de revenda.

Assim, a crescente demanda de uso dos combustíveis, derivados de petróleo ou mesmo de fontes renováveis, torna-se preocupante, pois com o aumento do consumo aumentam também os casos de derramamento dessas substâncias que contaminam o solo, água e o ar, trazendo riscos eminentes à saúde humana e às

mais diversas formas de vida.

Com relação à contaminação do solo, os microrganismos podem ser utilizados como indicadores de poluição, por estarem amplamente distribuídos nestas matrizes ambientais. No geral, representantes da microbiota são sensíveis a pequenas concentrações de contaminantes, respondendo rapidamente as perturbações que ocorrem no ambiente. Assim, alterações da diversidade, abundância e atividade da microbiota podem ser utilizadas na avaliação de impactos sobre a qualidade do solo.

Além de indicadores de contaminação, alguns microrganismos apresentam a capacidade de utilizar contaminantes, como os compostos presentes no diesel e no biodiesel, como fontes de carbono e energia, colaborando assim para a biodegradação destes compostos na natureza. A partir da constatação dessa capacidade, diferentes estratégias de descontaminação do ambiente, coletivamente denominadas de técnicas de biorremediação, utilizam o potencial microbiano para a degradação de contaminantes e recuperação ambiental.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, em microcosmos, a biodegradação de diesel (B8) e biodiesel (B100) em latossolo argiloso sem histórico de contaminação por combustíveis através de parâmetros indiretos (biológicos/bioquímicos) e diretos (químicos).

1.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar se a contaminação de solo por diesel e biodiesel afeta o comportamento dos diferentes parâmetros microbianos em relação a solo não contaminado.
- Investigar se contaminação por combustíveis causa fitotoxicidade, observada pela germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.), em relação a solo não contaminado.
- Averiguar se os combustíveis aplicados ao solo apresentam degradação.
- Isolar microrganismos dos solos contaminados e avaliar se apresentam capacidade de degradação de biodiesel e diesel.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DIESEL E BIODIESEL

O petróleo é formado predominantemente por uma mistura de hidrocarbonetos e em menores proporções por outros compostos orgânicos e inorgânicos como vanádio e níquel, que varia em propriedades físicas e químicas conforme a origem (HAMME et al., 2003). Os hidrocarbonetos são uma família de moléculas constituídas basicamente por átomos de carbono e hidrogênio. A sua composição pode variar desde moléculas saturadas simples e mais facilmente biodegradáveis, até compostos mais complexos, como os que incluem os hidrocarbonetos aromáticos (JONES et al., 2008).

Os hidrocarbonetos podem ser divididos basicamente em alifáticos (compostos orgânicos acíclicos) e aromáticos (compostos orgânicos com anel benzênico). Os hidrocarbonetos alifáticos são subdivididos em três grupos estruturalmente diferentes que incluem os alcanos (saturados com ligações simples), os alcenos (insaturados contendo ao menos uma dupla ligação) e os alcinos (insaturados contendo uma tripla ligação) (STROUD et al., 2007), sendo que os alcanos correspondem à maior fração no petróleo (KOLESNIKOVAS et al., 2009). Já os hidrocarbonetos aromáticos são usualmente subdivididos entre os monoaromáticos (um anel benzênico em sua estrutura) e os poliaromáticos (HAP; dois ou mais anéis benzênicos em sua estrutura) (VARJANI, 2017).

O óleo diesel é um combustível líquido derivado do petróleo, composto por hidrocarbonetos com cadeias de 8 a 16 carbonos e também, em menor proporção, por nitrogênio, enxofre e oxigênio (ANP, 2016). Normalmente, o diesel de petróleo é produzido a partir da destilação fracionada de petróleo bruto entre 200 °C e 350 °C sob pressão atmosférica (ZHANG et al., 2014). Quanto aos hidrocarbonetos que compõe o diesel, cerca de 75% são hidrocarbonetos alifáticos e 25% são hidrocarbonetos aromáticos (MOLITERNI et al., 2012). Devido às suas características químicas, como maior peso molecular (ENEH, 2011), esse derivado de petróleo apresenta maior densidade (HOFFMANN et al., 2016), menor volatilidade, menor solubilidade e mobilidade do que, por exemplo, a gasolina (FINOTTI et al., 2001).

Dentre os combustíveis derivados de petróleo no Brasil, o óleo diesel

correspondeu a praticamente 60% do total das vendas nacionais entre 2012 e 2015 (ANP, 2016). Como alternativa aos combustíveis fósseis, não renováveis e de elevado potencial poluidor, surgem os combustíveis chamados renováveis. Assim, o biodiesel, que é quase totalmente compatível com o diesel de petróleo e proveniente de fontes de energia renováveis, vem ocupando espaço na composição da matriz energética brasileira (OLIVEIRA; COELHO, 2017). No Brasil, segundo a ANP (2017), a produção de biodiesel passou de 404.329 m³ em 2007 para 3.801.339 m³ em 2016 (Figura 1), fenômeno em grande parte devido à elevação dos percentuais do produto que vêm sendo adicionados ao diesel, como indicados pela legislação vigente. Ao diesel comercializado em território nacional atualmente é obrigatoriamente (Lei nº 13.263/2016) acrescido biodiesel, que perfaz 10% do produto final.

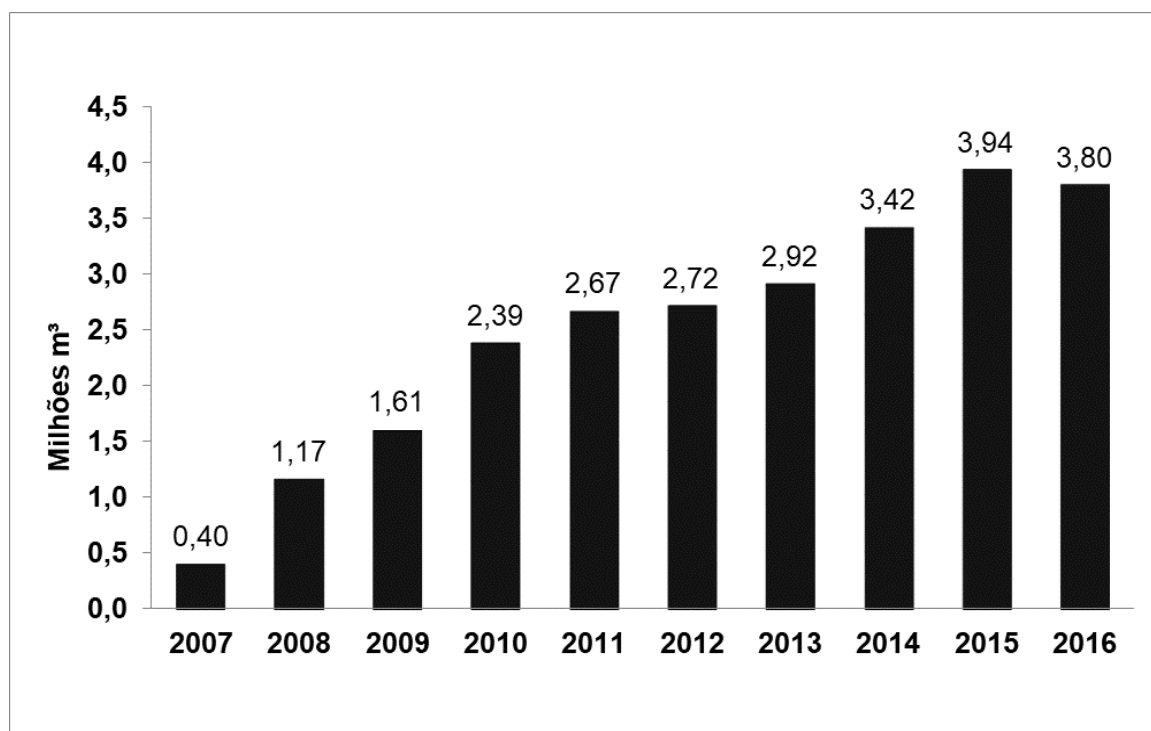


Figura 1 – Evolução da produção de biodiesel no Brasil (2007-2016).

Fonte: ANP (2017).

O biodiesel é um combustível derivado de fontes renováveis, que pode ser obtido por diferentes processos, como a pirólise, a esterificação ou pela transesterificação (POUSA et al., 2007). A transesterificação química é o método mais utilizado para obtenção do biodiesel (NARASIMHARAO et al., 2007), que consiste na reação química de óleos vegetais, gorduras animais, ou óleos de reuso,

com um álcool (etanol ou metanol), estimulada por um catalisador. Como produtos dessa reação são gerados ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) (SINGH; SINGH, 2010) e a glicerina (subproduto), também conhecida como glicerol. Como o metanol é o álcool mais comumente utilizado para produzir biodiesel, outra nomenclatura dada ao biodiesel são os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) (HOEKMAN et al., 2012). Assim, a composição atual do diesel comercializado no Brasil vai além dos hidrocarbonetos de petróleo e abrange também ésteres de ácidos graxos correspondentes ao biodiesel.

O termo biodiesel se refere ao material puro, ou seja, 100% biodiesel, também designado como B100. Concentrações mais baixas, como B20, são apropriadamente chamadas de misturas de biodiesel (HOEKMAN et al., 2012). Os ácidos graxos comumente encontrados nos óleos vegetais são os ácidos esteárico (18:0), palmítico (16:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3) (SINGH; SINGH, 2010; HOEKMAN et al., 2012).

A principal vantagem do biodiesel sobre o diesel é a redução das emissões de gases e material particulado na atmosfera. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) divulgou relatório intitulado Benefícios Ambientais da Produção e Uso do Biodiesel, em que afirma que, dependendo do percentual da mistura, a mitigação de emissões de gases do efeito estufa (GEE) pode chegar a 20% em relação ao diesel mineral. Ainda, considerando todo o biodiesel consumido no Brasil desde 2008, as emissões evitadas de GEE atingiram 21,8 milhões de toneladas de CO₂ (MAPA, 2014).

Diferentemente do óleo diesel, o biodiesel apresenta cadeias de ácidos graxos com átomos de oxigênio, sendo livre de hidrocarbonetos aromáticos e de enxofre (MEYER et al., 2012). De fato, o biodiesel possui um elevado teor de oxigênio em sua composição, que compreende em torno de 11% da massa total do biodiesel (SINGH; SINGH, 2010). O biodiesel pode conter diferentes proporções de ácidos graxos insaturados, dependendo do material do qual foi extraído. Por exemplo, os óleos vegetais, como o óleo soja, são ricos em ácidos oleico, linoleico e linolênico, e esses ácidos são instáveis quando expostos ao oxigênio, devido ao alto grau de insaturação (BÜCKER et al., 2011). Devido à sua composição química, o biodiesel é mais suscetível à degradação oxidativa, térmica e hidrolítica (MARIANO et al., 2008).

A presença de água em tanques de armazenamento de biodiesel ou misturas

ocasiona a sua decomposição hidrolítica, na qual ocorre a liberação de ácidos graxos livres, aumentando a acidez do produto, que pode acarretar na corrosão desses tanques (SCHLEICHER et al., 2008). Na tentativa de retardar esses processos de degradação, também são adicionados antioxidantes ao produto final, sendo principalmente os fenólicos (de origem natural ou sintéticos), de modo a controlar e retardar significativamente a oxidação natural do biodiesel (SUPRIYONO et al., 2015). Embora gorduras e óleos crus geralmente contenham antioxidantes naturais, como tocoferóis e carotenóides, os antioxidantes sintéticos costumam ser mais eficazes (JAIN; SHARMA, 2010).

O diesel e o biodiesel diferem quanto ao número de carbonos em sua composição química. As moléculas que compõe o biodiesel têm pesos moleculares entre 800 e 900 Dalton, sendo quatro vezes maiores do que as moléculas típicas do diesel. Outra diferença está relacionada com a viscosidade dos combustíveis, pois o biodiesel naturalmente possui baixa viscosidade e volatilidade. Tais características são modificadas através de técnicas como a transesterificação, que reduz a massa dos triglicérides do composto, aumenta a volatilidade e assim fornece um combustível com viscosidade semelhante ao do diesel (SINGH; SINGH, 2010).

É importante salientar que combustíveis com mesmas especificações podem diferir em alguns componentes e nas concentrações destes, bem como podem conter diferentes aditivos com variações de composição química (HILL; HILL, 2008). Como exemplos estão os aditivos utilizados no diesel e os antioxidantes utilizados no biodiesel, com a finalidade de ampliar a vida útil dos produtos.

2.2 CONTAMINAÇÃO DO SOLO COM COMBUSTÍVEIS

2.2.1 Problemas de contaminação ambiental na cadeia produtiva de diesel e biodiesel

O incremento na demanda da utilização de combustíveis como o diesel faz com que ocorra também o aumento dos potenciais riscos ambientais envolvidos com a cadeia produtiva desses compostos até a chegada do produto final ao consumidor. Vazamentos e derramamentos acidentais são uma ocorrência regular durante os processos de exploração, produção, refino, transporte e armazenamento de petróleo e seus derivados (VIEIRA et al., 2007).

No litoral, os terminais marítimos, atracadouros e marinas representam fontes potenciais de contaminação por petróleo e seus derivados, devido a derrames acidentais durante operações de carga, descarga e abastecimento de navios e barcos de menor porte, representando uma ameaça constante à saúde da biota estabelecida nas proximidades destes empreendimentos (LOPES et al., 1997). A infraestrutura relacionada ao transporte, bem como a distribuição do petróleo e derivados também é relevante, visto que o processo de extração, muitas vezes, é distante das refinarias e dos centros de distribuição. O transporte desses produtos pode ser realizado através da malha dutoviária, ferroviária, rodoviária, aeroviária ou marítima (PEREIRA; FERREIRA, 2014).

Segundo o anuário estatístico de transportes elaborado pelo Ministério dos Transportes, Portos e Aviação Civil (MTPA), 113 milhões de toneladas de petróleo e derivados foram transportados através de cabotagem (realizada entre portos brasileiros, utilizando exclusivamente a via marítima ou a via marítima e vias interiores) no ano de 2016. O MTPA descreve a produção de combustíveis das regiões Sudeste e Sul do Brasil como sendo inicialmente transferida das refinarias para terminais marítimos por meio de dutos de curto percurso. Segundo a ANP (2017), o território brasileiro conta com 19.717 km de dutos em operação, sendo estes 1.985 km para transferência de petróleo e 5.959 km para transferência (1.165 km) e transporte de derivados de petróleo (4.794 km), o que representa pouco diante da extensão territorial do país (Figura 2).

A partir destes terminais, o combustível seria transportado para as regiões Nordeste e Norte do País, via cabotagem e a produção de combustível escoada das refinarias por meio de dutos até os terminais de distribuição e bases de transferência. Para trechos curtos (até 500 km), o modo rodoviário seria a melhor opção para o distribuidor receber os combustíveis. Em 2016, segundo o anuário, 54,3 milhões de toneladas de diesel foram transportados por rodovias (MTPA, 2017).

O fato de grande parte do transporte dos produtos do petróleo ser transportado pela malha rodoviária é algo preocupante, visto que cerca de 69% das rodovias brasileiras se encontram com qualidade variando de ruim a péssima (Confederação Nacional de Transportes - CNT, 2009), o que potencializam as chances de acidentes com derramamento de produtos tóxicos. Um contrassenso é o predomínio do transporte dos derivados de petróleo ser rodoviário, visto que esse meio de transporte demanda diesel, derivado do petróleo, criando assim uma

dependência (CORRÊA, 2003).

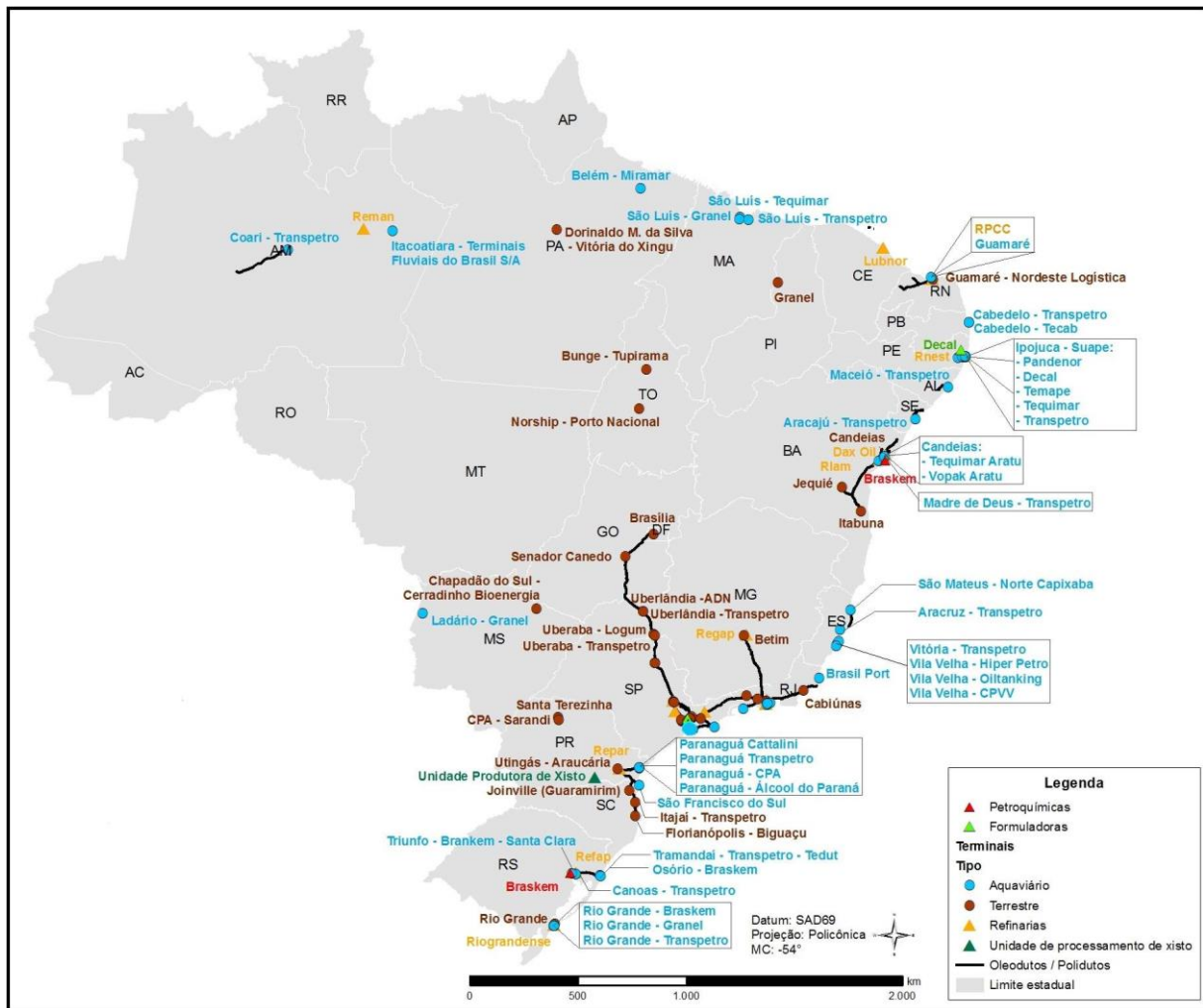


Figura 2 – Infraestrutura de produção e movimentação de petróleo e derivados - 2016. Fonte: Adaptada de ANP (2017).

Além do transporte e distribuição, o armazenamento também envolve riscos de contaminação, os quais muitas vezes podem passar despercebidos. Os postos de combustíveis, por exemplo, são um dos grandes causadores de contaminação do solo por derivados de petróleo, por meio de vazamentos de combustíveis armazenados em seus tanques. Os combustíveis ficam alocados em tanques subterrâneos que podem apresentar corrosão com o passar dos anos, causando vazamentos dos produtos armazenados e assim contaminar o solo e também o lençol freático. Um tanque de armazenamento subterrâneo possui vida útil estimada entre 15 a 20 anos, sendo que tanques com idades superiores têm grandes chances de rupturas por corrosão (OLIVEIRA; LOUREIRO, 1998).

Com relação ao biodiesel, além dos possíveis acidentes relacionados ao transporte, um fator preocupante é o fato de o biodiesel ser mais corrosivo do que o diesel. Este potencial pode ser ainda maior se o mesmo possuir a presença de água ou ácidos graxos residuais do processo de transesterificação (ASHRAFUL et al., 2014). Tsuchiya et al. (2006) verificaram que a adição de apenas 2% de biodiesel ao diesel, aumentou o potencial corrosivo do diesel quando em contato com materiais metálicos e que a adição de 5% de biodiesel (dose máxima testada) aumentou a acidez total (de 0,05 para 0,07) e a retenção de água, o que pode tornar o biodiesel ainda mais corrosivo.

Os acidentes envolvendo pequenos volumes de óleo superam, em quantidade de óleo total, aquelas provenientes de grandes derramamentos (O'ROURKE; CONNOLLY, 2003), possivelmente devido aos pequenos acidentes acabarem por não serem quantificados, não entrarem para a estatística, enquanto que os grandes desastres são amplamente divulgados.

2.2.2 Contaminação e problemáticas no Brasil

Segundo a relação de acidentes atendidos pela divisão de emergências ambientais da Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM), relacionados ao transporte de produtos e resíduos perigosos no Rio Grande do Sul, foram registrados, no período de 2007 a abril/2017, 322 acidentes com produtos químicos. Desses registros, 22 acidentes envolviam o transporte de diesel e 11 o transporte de biodiesel, porém alguns registros foram encontrados com termos genéricos como “produtos químicos diversos” ou apenas “combustíveis”.

Tomando como referência os acidentes ambientais envolvendo produtos perigosos no Estado de São Paulo, os quais incluem líquidos inflamáveis entre os anos de 2007 a 2017, um total de 1509 registros, tem-se que a maior parte destes 81%, ocorreu a partir do transporte rodoviário, 4% do transporte ferroviário e apenas 1,5% por transportes por dutos (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB, 2018).

Ainda segundo a CETESB (2018), em dezembro de 2017 havia 5942 áreas contaminadas registradas no Estado de São Paulo. Os registros são divididos considerando a atividade geradora da contaminação, sendo que os postos de combustíveis corresponderam a 72% do total de registros. Os principais

contaminantes encontrados nessas áreas foram solventes aromáticos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), combustíveis automotivos, HAPs, metais e solventes halogenados. Esses registros tiveram início em maio de 2002, época em que foram registradas 255 áreas contaminadas no Estado.

A ocorrência de vazamentos em tanques de armazenamento de combustíveis é preocupante, pois causam riscos de contaminação as águas subterrâneas e aos aquíferos que são usados como fontes de abastecimento de água para o consumo humano. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2002), 75% do abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul é de origem subterrânea. Segundo a Agência Nacional de Águas (ANA, 2005), no estado de São Paulo não é muito diferente, onde quase 72% dos municípios são abastecidos totalmente ou parcialmente com águas subterrâneas.

Situação semelhante pode ser encontrada no Estado de Minas Gerais (MG), onde 76% das áreas contaminadas foram relacionadas a atividades de postos de combustíveis automotivos (Fundação Estadual do Meio Ambiente - MG, 2017). No Rio Grande do Sul (RS), há cerca de 3,2 mil postos revendedores de combustíveis (ANP, 2016). Conforme compilação realizada por Gouveia e Nardocci (2007), os dados referentes ao número de atendimentos a acidentes em postos de combustível no RS não permitiram a avaliação do real problema, visto que a atuação do órgão de Meio Ambiente do RS (FEPAM) era restrita a acidentes de grandes proporções. Dados mais recentes da FEPAM indicam que em aproximadamente 16% dos postos de combustíveis no RS (excluídos aqueles no município de Porto Alegre) há ou houve incidentes relacionados à contaminação ambiental (SOARES, 2015).

2.2.3 Efeitos dos contaminantes sobre o ambiente e a biota

Devido à grande demanda de uso dos derivados de petróleo, os hidrocarbonetos de petróleo têm se tornado um problema ao meio ambiente ao longo das últimas décadas. Esses compostos são altamente nocivos por apresentarem em sua composição elementos que são persistentes no ambiente, tóxicos e que podem causar riscos significativos a saúde humana. O efeito da toxicidade dos hidrocarbonetos é influenciado pelo tipo de hidrocarboneto (LABUD et al., 2007), que ocorre devido à capacidade de ruptura da membrana plasmática das células pelos compostos, onde as frações mais leves causam mais rupturas do que

as frações mais pesadas (GOUDA et al., 2008).

Os HAPs apresentam estruturas complexas fazendo com que essas substâncias possuam elevada recalcitrância ambiental, baixa solubilidade em água e tendência de sorção à fase sólida do solo (JACQUES et al., 2007a), sendo de difícil degradação. Já os compostos do grupo BTEX têm recalcitrância menor em comparação aos HAPs, e possuem maior solubilidade em água, o que potencializa a migração dos contaminantes para águas subterrâneas e o alastramento rápido de plumas de contaminação (WEELINK et al., 2010).

Dos compostos presentes nos derivados de petróleo, os HAPs e os monoaromáticos do grupo BTEX são os alvos de maior preocupação com relação à contaminação ambiental. Desses compostos, o benzeno é considerado o mais tóxico e por isso, apontado como o mais preocupante à saúde pública, inclusive por ser considerado carcinogênico (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 2013). Esta Agência classificou os gases de escape de combustão do diesel e da gasolina como carcinogênicos aos humanos com base em evidências de que a exposição a esses gases está associada com um aumento do risco de câncer de pulmão (IARC, 2013). Também há evidências de atividade mutagênica dos extratos do material particulado do escapamento do diesel (CLAXTON, 2015). A agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1987) identificou 16 HAPs que seriam mais preocupantes (incluindo naftaleno e fluoranteno, ambos presentes no diesel) por sua ecotoxicidade e por seu potencial carcinogênico. Uma vez que diversos HAPs são comprovadamente considerados carcinogênicos a mamíferos, sua bioacumulação é questão preocupante (VAN HAMME et al., 2003).

Apesar da maior atenção aos hidrocarbonetos aromáticos, os hidrocarbonetos alifáticos também são potenciais contaminantes significativos. No óleo diesel, combustível com maior produção atualmente (ANP, 2016), os hidrocarbonetos alifáticos possuem maior representatividade com relação ao volume (MOLITERNI et al., 2012), sendo que a maioria desses compostos são alcanos de comprimento médio (14 a 20 carbonos). Tipicamente, estes alcanos possuem baixas solubilidades aquosas, não sendo prontamente volatilizados ou lixiviados do solo (STROUD et al., 2007).

Peso-Aguiar et al. (2000) avaliaram os efeitos do petróleo e de seus derivados nas comunidades bentônicas da Baía de Todos os Santos, no Estado da Bahia durante dois anos. As comunidades bentônicas possuem mobilidade restrita,

não podendo evitar potenciais danos ambientais, sendo eles temporários ou permanentes, além de serem importantes nas bases das cadeias alimentares. Os pontos amostrais envolveram áreas próximas as zonas de extração de poços submarinos, transporte e refino. Os índices de diversidade avaliados indicaram estresse significativo das comunidades relacionadas ao petróleo, sendo observados índices de correlação negativos entre os níveis de cádmio, HAP e alcanos (hidrocarbonetos alifáticos) principalmente relacionados ao ponto onde ocorria o refino do petróleo.

Além do efeito imediato pós-contaminação sobre a biota, esses compostos demonstram certa persistência no ambiente. Silva et al. (2009) realizaram estudo através da exposição de peixes a amostras de água de um arroio, localizado no Estado do Paraná, após cinco anos da ocorrência de um derramamento de óleo, e concluíram que, mesmo após esse período o petróleo ainda se encontrava biodisponível para a biota. Na ocorrência, aproximadamente 4 milhões de litros de petróleo bruto foram derramados de uma refinaria devido a ruptura de uma tubulação, sendo o acidente considerado o maior vazamento de óleo entre Ecossistemas de água doce brasileiros.

Esses compostos ainda podem ser ingeridos pelos animais que habitam os locais contaminados, ou as proximidades deles, e permanecerem em seus organismos. Ziba et al. (2016) relataram a possibilidade da utilização de ovos de aves marinhas como agentes de biomonitoramento da presença de alcanos. Segundo os autores, ovos de aves marinhas que habitavam uma zona próxima a refinarias de petróleo, e com presença conhecida de derramamentos por transporte marítimo, continham hidrocarbonetos alifáticos (alcanos). Além dos ovos, as aves marinhas também podem apresentar HAP em seu organismo, evidenciado por análises de amostras de sangue (PÉREZ et al., 2008).

Diversos estudos indicam os efeitos negativos que estas substâncias podem ocasionar em organismos do solo, como os invertebrados edáficos (SOUZA et al., 2013; GOSPODAREK et al., 2016). Por exemplo, ácaros representantes da fauna do solo foram afetados negativamente pela presença de petróleo ou seus derivados, mesmo dois anos após a contaminação do solo (GOSPODAREK; RUSIN, 2015). A presença destes compostos pode também ocasionar efeitos nocivos sobre a germinação de sementes, sobrevivência e crescimento de vegetais (LABUD et al., 2007; NJOKU et al., 2009; BONA et al., 2011), bem como afetar a microbiota do solo

em termos de diversidade, abundância e estrutura das comunidades (ANDREONI et al., 2004; LI et al., 2007; SHENG et al., 2016).

Ainda, hidrocarbonetos do petróleo incorporados pela flora e fauna podem ser bioacumulados (JAFARABADI et al., 2018) em tecidos ricos em proteínas e gorduras, sendo transferidos através da cadeia alimentar e apresentando, portanto, efeito de biomagnificação. Em humanos e animais, estes compostos demonstram potenciais tóxicos e/ou mutagênicos e carcinogênicos. O benzeno, por exemplo, é reconhecido agente causador de leucemia em humanos (SILVA et al., 2002; TIBURTIUS et al., 2004). Portanto, a contaminação ambiental por estes compostos pode ocasionar sérios impactos ecológicos em ecossistemas aquáticos e terrestres, comprometer a qualidade dos recursos naturais, como os recursos hídricos e seu uso para abastecimento, resultando também em consequências sanitárias e de saúde pública (ANDRADE et al., 2010).

Como alternativa ao óleo diesel, de origem fóssil e não renovável, surge o biodiesel ao qual é atribuída uma menor emissão de gases e de material particulado na atmosfera, quando em comparação aos combustíveis derivados de petróleo (BENTO et al., 2006). Ferreira et al. (2008) verificaram que misturas de diesel-biodiesel (B10) promoveram a redução das emissões provenientes de motor de ignição por compressão, especialmente para o benzeno a redução das concentrações ocorreu em cerca de 24 %.

Segundo Hill et al. (2006) a utilização do biodiesel reduz os gases emitidos para a atmosfera em 41% em relação ao diesel, reduzindo vários poluentes atmosféricos importantes e ainda exercem impacto reduzido sobre a saúde humana e ambiental. Chang et al. (1996) avaliaram as propriedades e as emissões de gases de combustão de diferentes misturas de diesel e biodiesel de soja e demonstraram que as emissões de monóxido e dióxido de carbono, bem como de enxofre e material particulado foram inferiores ao do diesel convencional (sem adição de biodiesel). O valor das reduções evolui proporcional ao aumento do biodiesel na mistura. Porém o aumento da produção e comercialização desse novo combustível e o pouco conhecimento que se tem sobre a sua toxicidade ambiental também causam alerta, visto que é passível de causar contaminação ambiental durante sua fabricação, transporte e armazenamento (KHAN et al., 2007).

Embora o biodiesel e as misturas de biodiesel sejam menos tóxicos do que o diesel convencional, o risco para os organismos vivos ainda é substancial, podendo

apresentar sério impacto em organismos aquáticos se derramado acidentalmente ou inadvertidamente durante o transporte, armazenamento ou uso (KHAN et al., 2007). Há indícios de que o biodiesel e suas misturas com diesel promovam efeitos genotóxicos e mutagênicos, induzindo mutações de substituição de pares de bases (LEME et al., 2012).

Outro fato é que esses combustíveis, além da sua composição tradicional, ainda possuem diferentes aditivos sintéticos ou naturais. Os aditivos adicionados aos combustíveis podem conter compostos capazes de prejudicar a ação microbiana e até conferir toxicidade aos seres vivos (BLOCH, 2000).

2.3 MICROBIOTA DO SOLO

Os microrganismos são os seres mais abundantes nos solos, sendo responsáveis por diversas funções. Dos processos que ocorrem no solo, cerca de 80 a 90% são reações mediadas por microrganismos (NANNIPIERI; BADALUCCO, 2003). As bactérias formam o grupo que apresenta maior abundância e diversidade entre as espécies microbianas presentes no solo. A comunidade bacteriana é estimada em cerca de 10^8 e 10^9 organismos por grama de solo, variando de acordo com o método de contagem utilizado e com o tipo de manejo do solo (CARDOSO et al., 1992).

As bactérias e fungos são considerados os principais agentes transformadores de substâncias de origem natural ou xenobióticas (DESAI; DESAI, 1993). Dentre os processos mais importantes desempenhados pela microbiota dos solos estão a degradação e mineralização de uma grande diversidade de compostos orgânicos. Assim, os microrganismos contribuem com o equilíbrio dos ecossistemas, onde exercem importante papel nas transformações bioquímicas que ocorrem no meio ambiente, relacionadas à decomposição de matéria orgânica e ciclagem dos elementos (MATTOS, 2015). Neste sentido, as bactérias se destacam em relação aos fungos quanto à capacidade de degradação (MARGESIN et al., 2003), por apresentarem ampla diversidade e versatilidade metabólica (SANOMIYA; NAHAS, 2003), maior velocidade de crescimento, e também por apresentarem menores exigências nutricionais (CARDOSO et al., 1992).

É nos primeiros centímetros de solo que estão as maiores concentrações de carbono orgânico (NELSON; SOMMERS, 1996), e é onde ocorre a maior

abundância e atividade de microrganismos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O teor de matéria orgânica nos solos (MOS) usualmente varia entre 0,5 e 5% nos horizontes superficiais, podendo apresentar valores menores para solos arenosos e valores superiores para solos orgânicos (SILVA et al., 2006). De fato, a abundância de microrganismos em um ambiente é determinada pela disponibilidade de nutrientes e por fatores físico-químicos como o pH, potencial redox, temperatura, textura e umidade do solo (MATTOS, 2015).

A contaminação do solo por hidrocarbonetos de petróleo pode inibir populações microbianas e sua atividade devido à presença de compostos tóxicos (LABUD et al., 2007). Quando em altos níveis de contaminação, o número de microrganismos pode diminuir, alterando a composição das comunidades microbianas e dos processos mediados por microrganismos (MEYER et al., 2015). Além da toxicidade, alterações nos fatores abióticos podem tornar o ambiente desfavorável à microbiota local, fazendo com que a biodegradação dos compostos ali presentes não ocorra, levando ao acúmulo dessas substâncias (LIM et al., 2016).

Porém, há microrganismos com capacidade de realizar a degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo, os quais são denominados hidrocarbonoclasticos. Esses microrganismos conseguem sobreviver aos impactos gerados pelo poluente e utilizam estes compostos como fonte de carbono e energia em condições de estresse (LABUD et al., 2007). Em solos recentemente contaminados com hidrocarbonetos de petróleo pode haver uma maior quantidade microrganismos, quando comparado a solos não contaminados, pois os hidrocarbonetos presentes no solo fornecem uma fonte de carbono para o crescimento dos microrganismos, podendo incrementar sua atividade metabólica (ALRUMMAN et al., 2015).

O potencial dos microrganismos como biodegradadores de compostos químicos considerados prejudiciais ao meio ambiente vem sendo demonstrado em diversos estudos (LABUD et al., 2007; BÜCKER et al., 2011; MEYER et al., 2012; ALRUMMAN et al., 2015). A comunidade microbiana envolvida na degradação de compostos xenobióticos pode ser dividida em microrganismos primários, os quais são capazes de metabolizar o substrato principal disponível no ambiente, e em microrganismos secundários que utilizam apenas os produtos liberados pelos primários (GRADY, 1985).

A estrutura química dos poluentes orgânicos, bem como a sua

biodisponibilidade exercem influência na capacidade e na velocidade de metabolização dos compostos pelos microrganismos (RAHMAN et al., 2002). Tal fato é observado quando alguns compostos são biodegradados rapidamente, enquanto outros persistem no ambiente. A capacidade de desenvolvimento dos microrganismos irá depender, além de diversos fatores ambientais, da existência de genes apropriados. Por exemplo, para a degradação de determinados compostos, a célula pode expressar genes específicos que, em situações habituais, não seriam expressos. Esses mecanismos de regulação específicos asseguram que os genes envolvidos na degradação dos alcanos, por exemplo, sejam expressos apenas sob certas condições, como na presença de determinados alcanos quando outros substratos preferenciais não estão disponíveis (ROJO, 2009). Plasmídeos provavelmente desempenham papel importante nesse aspecto (OKOH, 2006), visto que a capacidade de degradar componentes mais recalcitrantes do petróleo, como as frações aromáticas, é geralmente mediada pelas informações genéticas contidas nestas moléculas de DNA extracromossomal (CERNIGLIA, 1984).

2.3.1 Parâmetros microbiológicos do solo

A microbiota dos solos é predominantemente heterotrófica (NANNIPIERI et al., 2003) necessitando de energia que é suprida através da oxidação de compostos orgânicos, a qual ocorre geralmente através de processos respiratórios e resultam na produção, entre outros, de CO₂. Assim, a respiração do solo é um dos métodos mais conhecidos e utilizados para quantificar a atividade microbiana do solo, sendo definida como a soma total de todas as funções metabólicas nas quais o CO₂ é liberado a partir do solo. Bactérias e fungos são os principais responsáveis pela liberação de CO₂ via degradação de materiais orgânicos (SILVA et al., 2007).

A mensuração da respiração microbiana é uma forma de estimar o nível de atividade dos microrganismos do solo, que usualmente reflete a velocidade de decomposição da matéria orgânica, onde a elevada atividade microbiana pode indicar uma rápida mineralização do material orgânico presente no solo (SEVERINO et al., 2004). Entretanto, Silva et al. (2007) salientam que o incremento da atividade respiratória pode ser desencadeado tanto pela alta produtividade de um determinado ecossistema, como pelo estresse advindo de distúrbios ambientais e antrópicos.

Mariano et al. (2007) utilizaram a respiração do solo, através da liberação de

CO₂, em solo contaminado com óleo diesel. Esta mesma variável foi investigada em solo adicionado de gasolina e petróleo (LABUD et al., 2007) e também em solo adicionado de combustível de avião (SONG; BARTHA, 1990). Medições respirométricas fornecem informações sobre o potencial de biodegradação de hidrocarbonetos em solos, sendo empregadas como um dos parâmetros avaliados durante os tratamentos de biorremediação (MARGESIN et al., 2003), visto que a formação de CO₂ é o último passo da mineralização de carbono (MARGESIN et al., 2000a).

Outros parâmetros utilizados para a avaliação da microbiota do solo são as atividades enzimáticas, que fornecem indicações da diversidade de funções que podem ser assumidas pela comunidade microbiana, visto que a maior parte das enzimas no solo tem origem microbiana (CLAASSENS et al., 2008). A atividade enzimática do solo tem papel importante na catalisação de reações indispensáveis nos processos de vida dos microrganismos do solo, decomposição de resíduos orgânicos, formação de matéria orgânica e estrutura do solo (WOLIŃSKA; STEPNIEWSKA, 2012). Logo, as enzimas podem atuar como indicadoras da qualidade do solo, pois desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes (GIANFREDA et al., 2005), sendo usualmente sensíveis a modificações e perturbações que ocorrem no sistema solo (YANG et al., 2008; WOLIŃSKA; STEPNIEWSKA, 2012).

A determinação de atividades enzimáticas do solo também é utilizada como meio rápido e econômico para prover informações, avaliar e monitorar a função e estrutura das comunidades microbianas frente à contaminação de solos por hidrocarbonetos e processos de remediação de solos contaminados (MARGESIN et al. 2000b; ALRUMMAN et al., 2015).

Dentre as enzimas do solo que podem ser avaliadas estão as celulases (SILVA et al., 2015), proteases (LABUD et al., 2007), amilases, desidrogenase (MARGESIN et al., 2000b; ALRUMMAN et al., 2015), e a atividade hidrolítica sobre o substrato diacetato de fluoresceína (FDA) (PEREIRA et al., 2004; SILVA et al., 2015). As celulases e amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de celulose e amido, respectivamente, liberando, por exemplo, glicose e pequenos polímeros de glicose. Estas enzimas atuam de forma fundamental na degradação de biomassa vegetal e, assim, na ciclagem do carbono nos solos (GUPTA et al., 2003).

A hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) vem sendo utilizada como um

indicador geral da atividade hidrolítica do solo (PEREIRA et al., 2004) e indicador funcional da saúde do solo (ADAM e DUCAN, 2001). A hidrólise do FDA expressa a atividade de um grupo de enzimas, e não de uma enzima em específico, sendo elas as lipases, as esterases e as proteases, todas envolvidas na decomposição da matéria orgânica no solo. Acredita-se que a hidrólise do FDA reflita a atividade microbiológica total do solo. No entanto, os resultados devem ser interpretados com cautela, visto que esta atividade está relacionada predominantemente à atividade de enzimas extracelulares (NANNIPIERI, et al., 2003).

A atividade de desidrogenases vem sendo empregada como indicadora da atividade microbiana do solo. Essas enzimas estão presentes em células microbianas viáveis, são quase que exclusivamente intracelulares, não acumulam extracelularmente, e refletem a capacidade oxidativa total da microbiota do solo. A atividade da desidrogenase reflete a capacidade metabólica do solo, a qual é considerada proporcional à biomassa dos microrganismos no solo (WOLIŃSKA; STEPNIEWSKA, 2012), podendo ser utilizada como marcador sensível da degradação do solo (GARCIA et al., 1997).

A avaliação da desidrogenase é um potencial indicador da recuperação de solos impactados por hidrocarbonetos. Diversos autores relatam a utilização da mensuração da atividade da desidrogenase como forma de avaliar os efeitos tóxicos dos hidrocarbonetos de petróleo sobre a microbiota do solo (MARGESIN et al., 2000a,b; LAPINSKIENE et al.; 2006; ALRUMMAN et al., 2014). Essa enzima é quantificada através da utilização de um aceptor artificial de elétrons, que é reduzido pela atividade microbiana. Compostos como os sais de tetrazólio solúveis, são reduzidos a formazans, com coloração vermelha, que por sua vez podem ser extraídos e mensurados colorimetricamente (SHAW; BURNS, 2006).

Contagens de microrganismos representam outro parâmetro utilizado para avaliação e monitoramento da microbiota do solo, incluindo os potenciais efeitos de contaminantes como os hidrocarbonetos de petróleo. Os métodos mais comuns incluem a contagem direta de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas em meios seletivos (MARGESIN et al., 2000b; ALRUMMAN et al., 2015) e o procedimento de enumeração através da técnica do Número Mais Provável (NMP) utilizando cultivos líquidos para o crescimento dos microrganismos (SONG; BARTHA, 1990; BENTO et al., 2005a).

O NMP é utilizado como um substituto para a técnica de contagem de placas,

visando estimar microrganismos heterotróficos e também degradadores, pois elimina a necessidade de um agente solidificante e permite a avaliação direta da capacidade de utilizar o composto alvo da degradação. O uso de meios líquidos permite a remoção de vestígios de contaminantes orgânicos e permite a definição química de um meio com uma única fonte de carbono como, por exemplo, os hidrocarbonetos (OKOH, 2006). Essa técnica incorpora a especificidade para quantificar apenas os microrganismos que utilizam hidrocarbonetos, no caso dos degradadores, e elimina o problema de contagem de organismos capazes de desenvolvimento em outros traços de contaminantes orgânicos (BRADDOCK; CATTERALL, 1999).

Outra forma de quantificar a microbiota se dá pela determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (BMS-C), que é frequentemente associada aos teores de matéria orgânica e de argila presentes no solo (ALRUMMAN et al., 2015). A avaliação deste parâmetro permite quantificar o carbono que a biomassa microbiana do solo avaliado imobilizou em suas células (TÓTOLA; CHAER, 2002). O BMS-C é considerado um indicador de mudanças ocorridas no solo, o que faz com que possa ser utilizada como uma ferramenta para a avaliação do nível de degradação do solo (MERCANTE et al., 2008). A biomassa microbiana é reconhecida por diminuir na presença de contaminantes, incluindo hidrocarbonetos (MEGHARAJ et al., 2000). Porém, apenas com a avaliação do BMS-C não é possível obter dados sobre a atividade das populações microbianas (TÓTOLA; CHAER, 2002).

Com base na relação entre respiração e o BMS-C é possível calcular o quociente metabólico (qCO_2), que indica o estado metabólico dos microrganismos do solo (ANDERSON; DOMSCH, 1993) e, assim, efeitos que os contaminantes dispersados no solo exercem sobre a microbiota. Um declínio no qCO_2 é visto como um incremento na eficiência da utilização de carbono pelos microrganismos, enquanto valores elevados demonstram uma menor eficiência metabólica, pois há uma maior perda de carbono na forma de CO_2 emitido para a atmosfera (HUNGRIA et al., 2009).

Parâmetros microbiológicos, como a respiração do solo, atividades enzimáticas e carbono da biomassa microbiana, fornecem informações sobre a presença e a atividade de microrganismos, bem como sobre a intensidade, tipo e duração dos efeitos da poluição por hidrocarbonetos na atividade metabólica do solo (LABUD, 2007). Por isso, a atividade microbiana do solo é considerada uma boa

ferramenta para avaliar a perturbação do solo (WOLIŃSKA; STEPNIEWSKA, 2012).

2.4 BIODEGRADAÇÃO DE DIESEL E BIODIESEL

A degradação de compostos xenobióticos, como é o caso dos hidrocarbonetos de petróleo, pode ser abiótica, sem a participação de microrganismos ou enzimas, ou biótica, através de processos bioquímicos mediados por microrganismos. A contribuição relativa de cada processo depende do composto e das condições químicas e físicas do solo. Na maioria dos casos, a biodegradação é o principal mecanismo da degradação de xenobióticos nos solos (HARITASH; KAUSHIK, 2009).

A maioria dos componentes do petróleo (60 a 90%) é considerada biodegradável, e os demais componentes, como os compostos aromáticos, seriam recalcitrantes (TONINI et al., 2010). A biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos é maior e mais rápida do que a dos hidrocarbonetos aromáticos (BENTO et al., 2005b; CERQUEIRA et al., 2011). Os principais representantes dos hidrocarbonetos aromáticos de petróleo são os que compreendem o grupo BTEX. A biodegradação dos poliaromáticos está relacionada à quantidade de anéis que o composto possui, quanto maior o número de anéis, maior a estabilidade do composto e mais difícil a biodegradação (VARJANI, 2017).

Dentre os hidrocarbonetos alifáticos, os insaturados (alcenos) são considerados mais sensíveis que os alcanos à degradação devido à maior reatividade de suas ligações duplas (GROSSI et al., 2011). Ainda, os hidrocarbonetos alifáticos de cadeia linear são biodegradados mais facilmente do que os ramificados, devido à sua menor complexidade (PEREIRA Jr. et al., 2009). Neste sentido, há uma maior gama de microrganismos capazes de realizar a metabolização de hidrocarbonetos alifáticos, utilizando-os como substrato (VARJANI, 2017).

A massa molecular dos compostos também exerce influência na biodegradação, sendo que, em geral, quanto maior a massa molecular de um hidrocarboneto aromático, maior a sua hidrofobicidade e recalcitrância (CERNIGLIA, 1993). O mesmo vale para os hidrocarbonetos alifáticos, ou seja, quanto maior o tamanho da cadeia, maior a dificuldade de biodegradação. Além disso, outro fator que influencia a biodegradação dos compostos é o tempo de contaminação do local

a ser biorremediado. Usualmente, o maior tempo de contaminação acarreta na diminuição da biodisponibilidade do contaminante, diminuindo a biodegradação e conseqüentemente a sua mineralização (HATZINGER; ALEXANDER, 1995). Ao contrário, solo recentemente contaminado com óleo contém uma quantidade maior de compostos suscetíveis à degradação microbiana (MALETIĆ et al., 2013). No entanto, os poluentes em solo contaminado recentemente são potencialmente mais tóxicos para os microrganismos nativos, levando a um maior período de adaptação antes da degradação do poluente e até mesmo à inibição do processo de biodegradação (MARGESIN et al., 2000b).

Para realizar a degradação de hidrocarbonetos há o envolvimento de uma série de fatores fisiológicos e metabólicos microbianos. A biodegradação dificilmente será realizada por uma única espécie de microrganismo, visto que possivelmente ele não irá apresentar todas as propriedades necessárias para, individualmente, degradar o composto por completo. Assim a biodegradação depende da presença de diferentes microrganismos com a capacidade de degradar hidrocarbonetos e, desta forma, podem haver relações de cooperação catabólica e a atuação sinérgica entre os microrganismos, o que contribui para a degradação mais extensa dos compostos (ATLAS, 1981; GRADY, 1985; LIM et al., 2016; VARJANI, 2017).

Além de a degradação dos compostos ocorrer em função da estrutura do contaminante e da forma com que ele está disponível aos microrganismos, também há dependência das condições físico-químicas do ambiente (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002). Como exemplos desses fatores podem ser citados o pH, a umidade, a temperatura e a presença de oxigênio (MALETIĆ et al., 2013). Os hidrocarbonetos podem ser biodegradados por diferentes microrganismos que tenham a capacidade de utilizar estes compostos como doadores de elétrons. Dentre os microrganismos, as bactérias são relatadas como agentes primários na degradação de poluentes de petróleo (ATLAS, 1981; ABBASIAN et al., 2015). Uma vez que nenhum dos substratos não polares são livremente solúveis em água, as enzimas catabólicas produzidas pelos microrganismos devem ser proteínas de membrana ou proteínas associadas a membranas (PATZELT, 2007).

Para que o processo de biodegradação tenha início, é necessário que esses compostos sejam primeiramente oxigenados, para que então possam ser catabolizados pelos microrganismos (Figura 3). A biodegradação de hidrocarbonetos pode ocorrer sob condições aeróbicas e anaeróbicas, sendo que a degradação em

condições anaeróbicas é inferior e mais lenta quando comparada à aeróbica (GRISHCHENKOV et al., 2000). De acordo com Borden et al. (1995), quase todos os hidrocarbonetos de petróleo são biodegradáveis sob condições aeróbicas, sendo que os mecanismos para a ativação desses compostos são diferentes entre os microrganismos aeróbicos e anaeróbicos (SIERRA-GARCIA; DE OLIVEIRA, 2013).

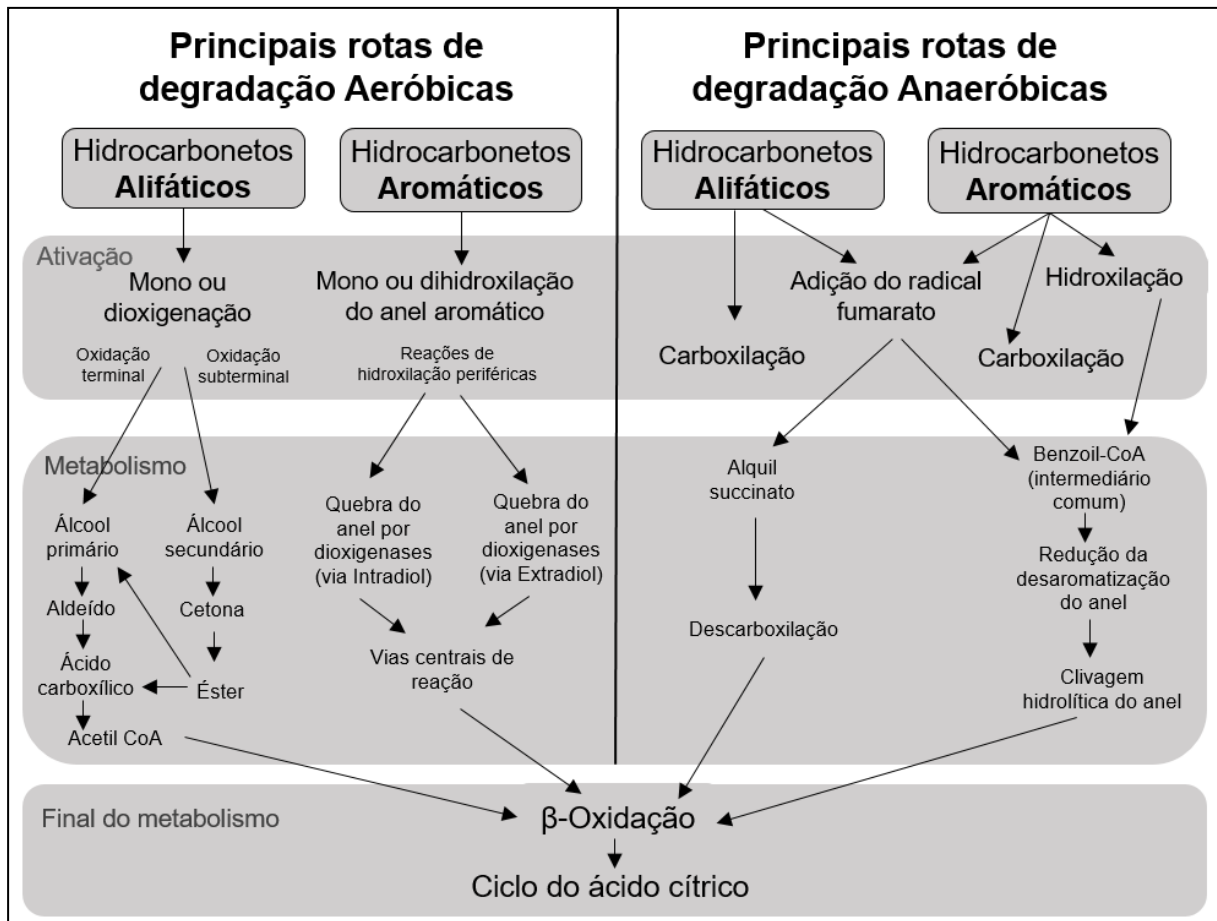


Figura 3 – Principais rotas para a degradação bacteriana aeróbica e anaeróbica de hidrocarbonetos. Fonte: Adaptado de Sierra-Garcia e De Oliveira (2013).

Em condições de aerobiose, a degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos é iniciada pela incorporação de oxigênio molecular, nesse caso através da ação de enzimas denominadas oxigenases (PEREIRA Jr. et al., 2009) (Figura 3). Estas enzimas realizam a incorporação de um (monoxigenases) ou dois (dioxigenases) átomos de oxigênio em compostos orgânicos, que permitem a hidroxilação de cadeias de alcanos alifáticos ou de anéis de compostos aromáticos (BOLL; HEIDER, 2010).

A degradação de hidrocarbonetos alifáticos pode ocorrer por diferentes rotas

metabólicas. A via comum para a degradação inclui a oxidação dos grupos metila das extremidades da cadeia até a sua transformação em um álcool, que pode envolver oxidação terminal, subterminal ou diterminal (REHM; REIFF, 1981; ABBASIAN et al., 2015). Na degradação terminal, esses álcoois primários sofrem oxidação a aldeídos, são desidrogenados para o correspondente ácido carboxílico, convertidos aos seus respectivos ácidos graxos e então podem ser metabolizados por β -oxidação (ABBASIAN et al., 2015). A cada ciclo sucessivo de β -oxidação, duas moléculas de carbono são removidas do ácido graxo na forma de Acetil-Coenzima A (acetil-CoA) (STROUD et al. 2007). Estes produtos são então oxidados até CO_2 , o que ocorre no ciclo do ácido cítrico (WILKES et al., 2003).

Na oxidação subterminal os alcanos são oxidados em um álcool secundário, que é convertido para a cetona correspondente e então oxidado para formar um éster. O éster é hidrolisado por uma esterase, gerando um álcool e um ácido graxo. Ambas as formas de oxidação, terminal e subterminal, podem coexistir em alguns microrganismos (ROJO, 2009), porém, a maioria dos microrganismos atacam alcanos terminalmente, enquanto alguns realizam a oxidação subterminal (OKOH, 2006). Os alcanos de cadeia ramificada são frequentemente mais resistentes à biodegradação (PATZELT, 2007). Por exemplo, a ampla ramificação do radical metila interfere no processo de β -oxidação, podendo exigir um ataque diterminal ou carboxilação (OKOH, 2006).

No caso dos hidrocarbonetos aromáticos, a biodegradação por microrganismos aeróbios é usualmente iniciada pela ação de dioxigenases, que promovem adição de dois átomos de oxigênio ao anel benzênico. Na sequência, reações de desidrogenação produzem um intermediário dihidroxilado, usualmente o catecol ou de um composto estruturalmente relacionado (PEREIRA Jr. et al., 2009; Figura 3). Pela ação de oxigenases, o anel aromático é quebrado devido à perda da estabilidade estrutural. Essa quebra pode se dar por duas vias, via intradiol (clivagem da ligação carbono-carbono entre os dois grupos hidroxila) ou via extradiol (clivagem da ligação carbono-carbono adjacentes) (BRIVIO et al., 2009). De fato, a quebra de anéis benzênicos é uma das maiores dificuldades no processo de biodegradação dos compostos aromáticos (TIBURTIUS et al., 2004).

Somente após a quebra do anel a degradação poderá ocorrer, de forma similar à dos compostos alifáticos, originando compostos que podem ser introduzidos no ciclo do ácido cítrico (como succinato, acetil-CoA e piruvato), para

que ao final os compostos sejam totalmente oxidados e como produto ocorra a liberação apenas de dióxido de carbono e água (ABBASIAN et al., 2015). Cadeias laterais alifáticas em anéis aromáticos são geralmente oxidadas primeiro, para produzir ácido benzóico ou seus derivados. Estes são então tipicamente dioxigenados e, às vezes, descarboxilados para catecol. HAPs com quatro ou mais anéis são muito mais resistentes à degradação, esses compostos são frequentemente glicosilados e não completamente degradados (PATZELT, 2007) e quando degradados, o processo costuma ocorrer lentamente. Já HAPs com número menor de anéis, por exemplo o naftaleno (com dois anéis), são prontamente biodegradados na maioria das situações (OKOH, 2006; VARJANI, 2017).

Bento et al. (2005b), demonstraram que microrganismos podem realizar a degradação tanto dos hidrocarbonetos alifáticos quanto dos aromáticos de forma concomitante. Porém, a degradação dos compostos alifáticos se mostrou mais eficaz em relação aos aromáticos, devido à maior complexidade dos últimos. O processo inicial de biodegradação dos hidrocarbonetos, primeiramente dos compostos mais facilmente degradáveis, pode resultar no esgotamento do oxigênio do meio devido à respiração aeróbica, dando início à biodegradação de forma anaeróbica (BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Também há casos em que a contaminação ocorre em ambientes naturalmente anóxicos, em que a única forma de degradação possível é a anaeróbica, como no caso de contaminações subterrâneas ou de reservatórios naturais de petróleo (SIERRA-GARCIA; DE OLIVEIRA, 2013).

Na ausência de oxigênio molecular, aceptores de elétrons alternativos como nitrato, ferro III (férico), sulfato, manganês e dióxido de carbono são utilizados para realizar a oxidação dos hidrocarbonetos por bactérias que respiram anaerobicamente (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; ABBASIAN et al., 2015). As vias anaeróbicas são responsáveis pela maior parte da degradação de hidrocarbonetos de petróleo em reservatórios subsuperficiais e ocorre principalmente vinculada a processos microbianos como desnitrificação, redução de ferro (III) e redução de sulfato (CAO et al., 2009; RABUS et al., 2016).

Em termos de aquisição de energia e taxas de degradação anaeróbica, o nitrato é o acceptor de elétrons preferido em comparação ao ferro (III) e o sulfato (LADINO-ORJUELA et al., 2016). O nitrato aumenta a eficiência da biodegradação de hidrocarbonetos em comparação com o sulfato e ferro (III) (VAN DER ZAAAN et al., 2012). No entanto, o conhecimento sobre as rotas de biodegradação anaeróbica

ainda é limitado. Em ambientes onde o oxigênio molecular encontra-se ausente, os compostos sofrem sucessivos processos de oxidação, e os produtos de cada etapa atuam como substratos nas seguintes até a completa degradação do composto (EVANS et al., 1992).

As vias atuais conhecidas que poderiam estar envolvidas na primeira etapa de ativação dos hidrocarbonetos aromáticos são a carboxilação direta (benzeno e naftaleno), a hidroxilação anaeróbica (etilbenzeno) e a adição de fumarato (tolueno, xileno, etilbenzeno, metilnaftaleno, alcanos e cicloalcanos) (VAN BEILEN; FUNHOFF, 2007; GHATTAS et al., 2017). Esta última é a via mais conhecida e estudada (SIERRA-GARCIA; DE OLIVEIRA, 2013). Neste caso, para que ocorra a degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos por bactérias anaeróbicas o ataque ao substrato é iniciado pela adição de um radical fumarato, intermediário do ciclo do ácido cítrico, ao substrato. No caso dos hidrocarbonetos alifáticos, com a adição de átomos de oxigênio pelo fumarato, o composto é degradado até um derivado de ácido graxo, que pode então ser catabolizado através da β -oxidação. Os elétrons obtidos como produto do catabolismo são então utilizados na redução do sulfato ou nitrato durante a respiração anaeróbica (PATZELT, 2007).

Na degradação anaeróbica dos hidrocarbonetos aromáticos a adição do oxigênio através do fumarato ocorre antes da quebra do anel. Análogo ao catecol na degradação pela via aeróbica, a via anaeróbica também ocorre através de um intermediário, o benzoil-CoA (PATZELT, 2007). Este intermediário, crítico no catabolismo anaeróbico de hidrocarbonetos aromáticos, é posteriormente reduzido (pela benzoil-CoA redutase), resultando na quebra do anel aromático. Os compostos alifáticos produzidos são, por sua vez, submetidos a outras reações hidrolíticas e oxidativas. Após a clivagem do anel são gerados ácidos graxos que podem então sofrer o processo de β -oxidação (ABBASIAN et al., 2015).

A maioria dos melhores caracterizados degradadores de hidrocarbonetos são bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Actinopolyspora*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardiodes* e *Pseudomonas* (PATZELT, 2007). Como exemplos de microrganismos estritamente anaeróbicos e com capacidade comprovada em degradar hidrocarbonetos na ausência oxigênio incluem-se espécies dos gêneros *Azoarcus*, *Rhodopseudomonas* e *Thauera* (WIDDEL; RABUS, 2001).

Diferentemente do diesel, o biodiesel é formado por compostos mais

suscetíveis à biodegradação devido à estrutura e composição química mais simples de seus componentes (LIU; SULFITA, 1994). A sua composição de cadeias de ácidos graxos insaturados com átomos de oxigênio altamente oxidativos, e a ausência de hidrocarbonetos aromáticos e de enxofre (MEYER et al., 2012), favorecem o processo de oxidação, que pode inclusive ser ativado pela luz (foto-oxidação). Para retardar o processo de degradação oxidativa são adicionados antioxidantes à formulação do biodiesel comercial, aumentando a sua estabilidade. Os antioxidantes podem retardar as reações de polimerização, porém, não inibir por completo (GRABOSKI; MCCORMICK, 1998).

Quando comparados os compostos presentes no biodiesel aos do óleo diesel, a biodegradação demonstrou ser maior e mais eficiente no biodiesel (LEUNG et al., 2006). Neste contexto, a biodegradação do biodiesel pode ser até cinco vezes mais rápida do que a do diesel, inclusive em solos (FERELLA et al., 2010).

Os ácidos graxos presentes no biodiesel também são utilizados como fonte de carbono e energia pelos microrganismos, pois algumas bactérias conseguem degradar triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos. A via de biodegradação de moléculas de éster alquílico de ácidos graxos é um processo de múltiplas etapas que é similar em condições aeróbicas e anaeróbicas. A biodegradação do biodiesel começa com a hidrólise do éster metílico ou etílico através da ação das enzimas lipases ou esterases produzidas pelos microrganismos (BOCZAR et al., 2001).

Os ésteres são primeiro desesterificados para formar ácidos graxos livres e álcool (etanol/metanol). Os ácidos graxos livres passam então por uma remoção sequencial de componentes de dois carbonos (Acetil-CoA) através da β -oxidação (AKTAS et al., 2010). O álcool liberado é prontamente biodegradado sob condições aeróbicas e anaeróbicas. Na ausência de oxigênio molecular, outros aceptores de elétrons terminais podem suportar processos de biodegradação anaeróbicos. Estudos fornecem evidências de que a biodegradação dos ácidos graxos pode ocorrer pela redução de nitrato, redução de sulfato e por metanogênese (THOMAS et al., 2017).

A adição de uma determinada quantidade de biodiesel, livre de hidrocarbonetos e com a presença de ésteres de ácidos graxos com maior afinidade pela água, pode aumentar a biodegradabilidade dos hidrocarbonetos do diesel, como evidenciado por diversos estudos (ZHANG et al., 1998; BENTO et al., 2006; PASQUALINO et al., 2006; MARIANO et al., 2008; BÜCKER et al., 2011; THOMAS

et al., 2017). Os mecanismos que determinam tal comportamento não são totalmente conhecidos. Por exemplo, o biodiesel pode atuar como solvente, facilitando a dispersão e acelerando a degradação microbiana dos hidrocarbonetos do diesel (TAYLOR; JONES, 2001). Ainda, os microrganismos poderiam utilizar primeiramente os substratos mais acessíveis e de fácil degradação como fontes de carbono e energia, levando a um aumento na população microbiana e estimulando a produção de enzimas degradativas. Por processos cometabólicos, os compostos de maior potencial recalcitrante poderiam ser degradados (ZHANG et al., 1998; PASQUALINO et al., 2006; MEYER et al., 2012).

Porém, por diferentes motivos, a degradação de um contaminante pode não ocorrer em sua totalidade, podendo ocorrer de forma parcial ou ainda ocorrer a biotransformação do composto em derivados tão ou mais tóxicos do que os contaminantes originais (KALBITZ et al., 2003). Um dos impeditivos da degradação é a recalcitrância, que aparentemente nas frações de hidrocarbonetos de petróleo pode ser devida a fatores como a diminuída biodisponibilidade, ausência de enzimas oxidantes ou impedimento para o ataque enzimático, bem como a toxicidade dos contaminantes aos microrganismos do solo (SALANITRO et al., 1997).

2.4.1 Produção de biossurfactantes

Dentre os mecanismos que levam à biodegradação de compostos hidrofóbicos, a solubilização e o contato direto são os mais importantes. Em contato direto, as células bacterianas aderem à superfície dos compostos. Esta adesão a superfícies hidrofóbicas é uma estratégia utilizada por diversos microrganismos para superar a biodisponibilidade limitada destas moléculas. Por exemplo, algumas bactérias possuem naturalmente superfícies celulares hidrofóbicas que permitem a adesão celular aos hidrocarbonetos (PALMER et al., 2007).

A adesão de um microrganismo ao substrato aumenta a taxa de transporte do substrato hidrofóbico da fase não aquosa para a célula, podendo aumentar a eficiência da biodegradação. Porém, a biodegradação não requer necessariamente a adesão celular, bem como a capacidade de adesão não indica necessariamente a sua utilização. Na maioria dos casos, a adesão não é um pré-requisito para a degradação, visto que algumas bactérias que utilizam hidrocarbonetos apresentam fraca adesão a estes substratos (ABBASNEZHAD et al., 2011).

No caso da biodegradação de hidrocarbonetos, a biodegradação é lenta principalmente devido à baixa solubilidade em água e à taxa de dissolução. No entanto, a presença de compostos surfactantes pode aumentar a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos por solubilização e assim, elevar os índices de degradação (PARIA, 2008). Os surfactantes são compostos que possuem atividade tensoativa, capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial, distribuindo-se nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade. Tal fato permite a dispersão ou a mistura de líquidos como água e óleo em forma de emulsões, aumentando a concentração de hidrocarbonetos na fase aquosa (BANAT et al., 2000).

Diversos microrganismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras, são capazes de produzir biossurfactantes (BANAT et al., 2000). Os biossurfactantes podem ser divididos em surfactantes de baixa massa molecular, os quais são moléculas anfipáticas que os posicionam na interface água/óleo e por isso possuem a propriedade de diminuir a tensão superficial quando presentes em meio aquoso (DESAI; BANAT, 1997), e nos surfactantes de alta massa molecular, denominados de bioemulsificantes, que são responsáveis pela formação e estabilidade de emulsão óleo-água, aumentando assim a solubilidade do contaminante com a fase aquosa (MEYER et al., 2012).

Microrganismos produzem biossurfactantes para que assim possam utilizar o substrato insolúvel/hidrofóbico como fonte de carbono e energia, visto que estas moléculas são capazes de ampliar a biodisponibilidade do substrato para os microrganismos, e também de aumentar a hidrofobicidade da superfície celular, o que permite que o substrato hidrofóbico interaja livremente com as células bacterianas (LIM et al., 2016). O próprio contato direto pode ser facilitado por biossurfactantes e bioemulsificantes produzidos pelas células, que aumentam a adesão entre a superfície celular e o composto hidrofóbico (STROUD et al., 2007).

Embora os biossurfactantes não atuem diretamente oxidando hidrocarbonetos e/ou ésteres metílicos de ácidos graxos, influenciam positivamente as taxas de degradação pelo incremento da dissolução das moléculas não polares em fase aquosa e alteração da afinidade entre as células e o contaminante, aumentando assim a hidrofobicidade celular (ZHANG; MILLER, 1995; PRUTHI; CAMEOTRA, 1997; PARIA, 2008; MEYER et al., 2012). A maioria dos microrganismos degradadores apresenta a capacidade de produzir compostos surfactantes,

facilitando o transporte dos contaminantes para o interior da célula (PIJANOWSKA et al., 2007). Ron e Rosenberg (2014) relataram que os surfactantes podem recobrir os hidrocarbonetos, como uma espécie de envelope, de modo que o complexo é integralmente transportado através da membrana celular, o que permite que o metabolismo ocorra dentro do citoplasma.

A maior parte dos biosurfactantes reportados é de origem bacteriana. Dentre as bactérias, as mais mencionadas são as dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Arthrobacter* (GOUVEIA et al., 2003). A produção de biosurfactantes ocorre, predominantemente, durante o crescimento microbiano em substratos insolúveis em água. A redução da tensão superficial do meio geralmente ocorre na fase estacionária do crescimento microbiano em meios mínimos com uma fonte de carbono, sendo relatada produção de tais compostos como metabólitos secundários (DESAI; BANAT, 1997; RON; ROSENBERG, 2001; BANAT et al., 2010).

A detecção da produção de surfactantes microbianos é usualmente realizada em meios contendo hidrocarbonetos ou óleos vegetais como substratos (BÜCKER et al., 2011; MEYER et al., 2012). Desta forma, a adição de compostos orgânicos hidrofóbicos como substratos para os microrganismos auxilia no isolamento de microrganismos degradadores, e dentre estes, aqueles que podem apresentar a capacidade de produzir biosurfactantes (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

Os biosurfactantes produzidos podem ser secretados como moléculas extracelulares ou permanecem associados à superfície celular (VAN HAMME et al., 2003; MULLIGAN, 2005). Geralmente, os biosurfactantes extracelulares possuem a porção hidrofílica constituída por peptídeos e sacarídeos, e a porção hidrofóbica constituída por ácidos graxos saturados e insaturados (JACQUES et al., 2007a). Em bactérias, diversos componentes da superfície celular, como proteínas, ácido lipoteicóico e fímbrias, podem contribuir à atividade surfactante (DESAI; BANAT, 1997).

Devido ao incremento da solubilidade e disponibilidade de poluentes hidrofóbicos, aumentando assim o potencial para a biodegradação, os biosurfactantes têm seu principal uso na remediação de ambientes contaminados, especialmente com hidrocarbonetos (BENTO et al., 2003). Em busca de novos compostos, o número de pesquisas relacionadas ao isolamento e identificação microrganismos produtores de moléculas que apresentem características surfactantes vem aumentando (BENTO et al., 2005b; MEYER et al., 2012; SANTOS

et al., 2013). Ainda, biossurfactantes apresentam baixa toxicidade e tolerância à temperatura, além de serem naturalmente biodegradáveis na água e no solo (LIN, 1996; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Porém, a extensão da biodegradação por bactérias que não produzem biossurfactantes não é necessariamente aumentada pela presença destas moléculas, pois em alguns casos o biossurfactante demonstra ser específico para cada espécie microbiana (NOORDMAN; JANSSEN 2002).

2.5 BIORREMEDIAÇÃO

Vislumbrando mitigar e solucionar os casos de contaminação, tecnologias para a recuperação ambiental vêm sendo investigadas. Dentre as técnicas de remediação, aquelas que utilizam organismos vivos, denominadas de biorremediação, são consideradas relativamente mais econômicas quando comparadas às estratégias convencionais, como incineração e lavagem do solo (BAMFORTH; SINGLETON, 2005), além de mais seguras e menos agressivas ao meio ambiente (MOLINA-BARAHONA et al., 2004). Outro ponto relevante para o estudo da biodegradação está no seu importante papel no ciclo global de carbono (SIERRA-GARCIA; DE OLIVEIRA, 2013).

Conforme Stroud et al. (2007), a biorremediação é fundamentada nos processos de degradação microbiana, onde podem ser criadas condições para maximizar as transformações dos contaminantes no solo. Essas transformações, sob influência dos microrganismos e/ou de suas enzimas, vão desde a remoção parcial até a mineralização completa da substância orgânica, visando à descontaminação ou minimização dos efeitos tóxicos dos contaminantes (LIM et al., 2016). Desta forma, idealmente, devem ser liberadas apenas substância inertes, como o dióxido de carbono e água, e compostos sem toxicidade que poderiam ser incorporados ao ambiente sem prejuízos aos organismos vivos (MOLINA-BARAHONA et al., 2004).

Técnicas de biorremediação estão entre as principais estratégias de remediação utilizadas em áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo. Vários contaminantes podem ser tratados biologicamente com sucesso. Estes incluem petróleo bruto (JONES et al., 2008; RAHMAN et al., 2002), hidrocarboneto do petróleo como gasolina (BRADDOCK; CATTERALL, 1999; VIEIRA et al., 2007), óleo diesel (MARIANO et al., 2007; SERRANO et al., 2008), combustível de avião

(SONG; BARTHA, 1990), entre outros derivados de petróleo, compostos orgânicos ou outros xenobióticos, existindo diversos compostos individuais passíveis de destoxificação por biorremediação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Para a proposição de estratégia de biorremediação apropriada, é extremamente importante a investigação e caracterização dos fatores que afetam a eficiência da biodegradação (MALETIĆ et al., 2013). O êxito de um processo de biorremediação microbiana depende, fundamentalmente, da existência de microrganismos com capacidade metabólica de degradação dos contaminantes específicos, a biodisponibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático, e condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade dos microrganismos (BOOPATHY, 2000).

A eficácia da biodegradação dependente, em maior parte, dos tipos de hidrocarbonetos presentes (SALANITRO et al., 1997). Porém, as características do solo contaminado também podem limitar ou melhorar a eficácia do processo. A baixa permeabilidade, por exemplo, pode interferir tanto na difusão de oxigênio, fundamental ao processo aeróbio de degradação, quanto na incorporação de nutrientes (MALETIĆ et al., 2013). Além disso, estão ainda envolvidos outros fatores limitantes, como as propriedades de tamponamento do solo, atividade biológica e tipo de biota, longevidade do poluente, toxicidade, bem como sua mobilidade (LAPINSKIENE et al., 2006).

Embora a biorremediação tenha destaque entre as técnicas de remediação disponíveis utilizadas para a descontaminação de ambientes impactados por hidrocarbonetos, a reduzida solubilidade desses compostos dificulta o acesso dos microrganismos e a consequente biodegradação dos poluentes (RUFINO et al., 2013). Uma das possíveis soluções para a baixa disponibilidade dos poluentes hidrofóbicos consiste no uso de surfactantes, como anteriormente apresentado.

As técnicas de biorremediação são usualmente classificadas em *in situ* e *ex situ*. Nas tecnologias de biorremediação *in situ*, o tratamento é realizado no local da contaminação, enquanto que nas estratégias *ex situ*, o solo contaminado é removido para tratamento em outro local controlado (SOUZA et al., 2013). Em grande parte, a definição da técnica de biorremediação, ou suas combinações, considera exatamente as condições ambientais do local, para que não ocorram interferências no resultado esperado (LIM et al., 2016).

2.5.1 Biorremediação *ex situ*

A biorremediação *ex situ* surge da necessidade da retirada do material contaminado, que pode ser solo ou efluente, para que sejam tratados em outro local. A remoção pode ser necessária quando há riscos de os poluentes contaminarem pessoas e/ou o ambiente próximo do solo a ser biorremediado, ou quando a presença de altas concentrações de contaminante demanda a utilização de técnicas como compostagem, o uso de biorreatores, entre outras (JACQUES et al., 2007a).

Algumas das estratégias de biorremediação *ex situ* mais utilizadas são o *landfarming* e compostagem com biopilhas e biorreatores (STROUD et al., 2007). O método *landfarming* consiste, basicamente, em células controladas onde o solo contaminado é disposto. Realizam-se revolvimentos periódicos da camada superior do solo contaminado para haver aeração e assim estimular a degradação biológica do resíduo pelos microrganismos indígenas (PAUDYN et al., 2008).

A compostagem com biopilhas é uma variação do *landfarming*, às quais são adicionadas água e nutrientes. A área é impermeabilizada com material sintético e há um sistema para coleta do material lixiviado e dos gases gerados para tratamento (PLAZA et al., 2005). Já no tratamento com biorreatores, o solo contaminado é acondicionado em locais fechados, onde há a manipulação e o controle das condições ambientais que levam à otimização da biodegradação e melhor desempenho do processo, como, por exemplo, a regulação do pH, temperatura, oxigenação e adição de nutrientes (ROBLES-GONZÁLEZ et al., 2008).

O tratamento de resíduos de hidrocarbonetos em biorreatores é um método indicado para áreas densamente povoadas, quando os resíduos contêm concentrações mais elevadas de contaminantes, como é o caso de resíduos de processos industriais. Os maiores custos de operação são balanceados por um controle de processo muito maior, o que permite a seleção de parâmetros como temperatura, pH, potencial redox ou a concentração de co-substratos e nutrientes. Em um biorreator selado, consórcios enriquecidos ou estirpes microbianas geneticamente modificadas também podem ser utilizadas (PATZELT, 2007).

2.5.2 Biorremediação *in situ*

A biorremediação *in situ* é realizada no próprio local em que se encontra a

contaminação. Este processo evita custos com transporte do material contaminado e reduz os riscos de contaminação associados ao deslocamento dos contaminantes. As estratégias de biorremediação *in situ* mais utilizadas são a atenuação natural, bioestimulação, bioaugmentação e bioventilação (BENTO et al., 2003).

Na atenuação natural, a biorremediação ocorre de forma passiva, sem nenhuma forma de intervenção humana, de maneira que apenas os microrganismos indígenas do local tenham atuação na biodegradação dos compostos (SOUZA et al., 2013). A atenuação natural costuma iniciar lentamente, pois é necessário que os microrganismos nativos do solo se adaptem às novas condições na presença do contaminante. Microrganismos degradadores passam então a utilizar o contaminante orgânico como fonte alternativa de carbono e energia na produção de biomassa, ocasionando a redução da concentração do contaminante ao longo do tempo (SOUZA et al., 2013; MEYER et al., 2015). A biodegradação costuma aumentar após a seleção e adaptação dos microrganismos frente aos contaminantes (SCELZA et al., 2007).

O processo de atenuação natural monitorada, quando em condições de campo adequadas (geologia subsuperficial, hidrologia e microbiologia), pode auxiliar não somente na degradação de hidrocarbonetos, inclusive aqueles do grupo BTEX, mas também na degradação de pesticidas e transformação de compostos inorgânicos (MULLIGAN; YONG, 2004). Esta estratégia é a mais econômica, com intervenção mínima no ambiente, porém a mais lenta (meses a anos) dentre as técnicas *in situ*. No entanto, a biodegradação pode ocorrer de maneira contínua devido ao processo de adaptação natural da microbiota nativa do solo impactado. Por isso, a atenuação natural é recomendada somente para locais onde não há riscos de migração dos poluentes para outros locais, incluindo riscos de contaminação do lençol freático. Quando houver tais riscos, outras tecnologias devem ser utilizadas para acelerar o processo de remediação (SOUZA et al., 2013; SCELZA et al., 2007).

Em alguns casos onde há restrições físicas, químicas e/ ou biológicas, o processo de atenuação natural pode não ser suficiente, sendo necessárias soluções de bioengenharia. Tais técnicas podem ser necessárias quando o local a ser biorremediado possui atividade microbiana baixa, falta de nutrientes, poluentes pouco biodisponíveis, extremos de pH ou fatores físicos do solo. Essas características podem ser corrigidas a fim de estimular as populações degradantes

com o objetivo de acelerar o processo de biorremediação (STROUD et al. 2007).

Nas técnicas de bioestimulação, bioaugmentação e bioventilação ocorrem intervenções humanas, no intuito de acelerar o processo (SOUZA et al., 2013). A bioestimulação consiste no ajuste de parâmetros ambientais que, não adequados, atuam limitando o processo de remediação, especialmente limitações nutricionais à microbiota. Neste sentido, podem ser adicionados fertilizantes de liberação lenta, biopolímeros e materiais orgânicos visando estimular o desenvolvimento dos microrganismos nativos (PRINCE et al., 2003).

A adição de surfactantes também é utilizada para otimizar a biorremediação de contaminantes, auxiliando na metabolização dos compostos poluentes, pois facilita o transporte dos substratos orgânicos para o interior das células microbianas ou diminuindo as interações superficiais contaminante/solo. Além dos surfactantes também podem ser adicionadas enzimas, que favorecem a oxidação de moléculas de difícil degradação em moléculas de fácil assimilação pelos microrganismos (SHUHONG et al., 2006).

A técnica de bioaugmentação consiste na adição de microrganismos com reconhecida capacidade de degradar os compostos de interesse na área contaminada (LIM et al., 2016). A seleção dos microrganismos degradadores a serem utilizados normalmente é realizada a partir de uma área com histórico de contaminação, visto que nestas áreas há maior probabilidade de haver microrganismos com potencial degradador. Os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos estão presentes em muitos ambientes, mesmo quando o ambiente é intocado (MARGESIN et al., 2003; VARJANI et al., 2015). Porém, microrganismos degradadores de hidrocarbonetos em ecossistemas não poluídos comumente representam menos de 0,1% da comunidade microbiana; no entanto, este percentual pode aumentar para até 1 a 10% da população total em ambientes poluídos por hidrocarbonetos de petróleo (ATLAS, 1981).

Na bioventilação ocorre a inserção de oxigênio ao solo contaminado para estimular e/ou acelerar a degradação dos contaminantes por microrganismos aeróbios (LIM et al., 2016). Ainda, é possível utilizar diferentes técnicas *in situ* de forma concomitante, para acelerar o processo de degradação (HAMDÍ et al., 2007; SOUZA et al., 2013).

Processos de biorremediação podem ser monitorados diretamente, pela diminuição da concentração dos contaminantes, e indiretamente pelo aumento da

biomassa microbiana, respiração do solo, atividades enzimáticas, e ensaios ecotoxicológicos utilizando bioindicadores (SCELZA et al., 2007).

2.5.3 Estudos ecotoxicológicos relacionados à biorremediação

Atrelados à biorremediação surgem os estudos toxicológicos, utilizados como importantes instrumentos no desenvolvimento de tecnologias para o tratamento adequado de ambientes contaminados (TAMADA et al., 2012). Os estudos ecotoxicológicos têm a capacidade de avaliar os efeitos de compostos como passíveis de serem prejudiciais ao meio ambiente, muito além de apenas identificar substâncias potencialmente perigosas. Sendo assim, estudos ecotoxicológicos fornecem, através de bioensaios, os efeitos sinérgicos e antagônicos dos contaminantes e informações sobre a fração biodisponível do composto, o que não poderia ser avaliado apenas com dados químicos (CRUZ et al., 2013a).

O diagnóstico de toxicidade ecológica inclui diferentes métodos usando animais de solo e plantas como organismos-teste (TANG et al., 2011). A minhoca, por exemplo, é usada como animal de teste em experimentos de toxicidade do solo e foi estabelecida como método padrão pela International Organization for Standardization (ISO) em 1993 (ISO11268-1). O teste de toxicidade de plantas também tem sido usado como método padrão pela ISO11269-1 (1993) e Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico e inclui o alongamento da raiz, a germinação de sementes e o teste de crescimento de plantas (OECD, 2000). Estes organismos são comumente utilizados para avaliar a toxicidade em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e variam em sensibilidade conforme a espécie do animal ou planta (TANG et al., 2011).

A utilização de bioensaios através do uso de plantas em estudos de contaminação de solos merece considerável atenção (ADAM; DUNCAN, 2002). Testes envolvendo germinação de sementes, por exemplo, são considerados de curto prazo e avaliam principalmente os efeitos da toxicidade aguda (BANKS; SCHULTZ, 2005). Para a avaliação de contaminantes em solo através dos testes de germinação podem ser utilizados o próprio solo ou os extratos dos contaminantes nele presentes. Porém, para a avaliação de solo contaminado com compostos hidrofóbicos, como os óleos combustíveis, o teste de contato direto demonstra maior eficiência (HUBÁLEK et al., 2007).

Ensaio de toxicidade vegetal em contaminantes presentes no solo, através da avaliação da germinação de sementes e avaliação do desenvolvimento inicial de plântulas são amplamente utilizados para avaliação dos efeitos fitotóxicos de hidrocarbonetos de petróleo (ADAM; DUNCAN, 2002; BANKS; SCHULTZ, 2005; LABUD et al., 2007; TANG et al., 2011; CRUZ et al., 2013a,b; CRUZ et al., 2014; BAMGBOSE; ANDERSON, 2015) e de biodiesel (TAMADA et al., 2012; CRUZ et al., 2013a,b; CRUZ et al., 2014; BAMGBOSE; ANDERSON, 2015). A USEPA (1996) recomenda diversas culturas para utilização em testes de toxicidade como é o caso da alface (*Lactuca sativa* L.) (TAMADA et al., 2012; CRUZ et al., 2014; BAMGBOSE; ANDERSON, 2015) e do pepino (*Cucumis sativus* L.) (CRUZ et al., 2013a,b). Segundo Banks e Schultz (2005), a maioria das plantas parece mostrar alguma sensibilidade aos poluentes.

Plaza et al. (2005) indicam que o alongamento radicular é um critério mais apropriado para a avaliação da toxicidade do solo do que a germinação, enquanto Saterbak et al. (1999) relataram que a germinação de sementes seria mais adequada em detrimento ao alongamento da raiz para testes de fitotoxicidade. Segundo estes últimos autores, os testes de germinação têm sensibilidade semelhante ao alongamento da raiz para a maioria das sementes e solos, mas menor variabilidade.

Outro ensaio de biomonitoramento, o qual utiliza o contaminante a ser testado em meio líquido, emprega *Allium cepa*. Com este teste, é possível avaliar a toxicidade relacionada à mutagenicidade e a genotoxicidade (MAZZEO et al., 2011). Estes autores observaram que o contato dos compostos BTEX com espécies vegetais pode ocasionar dano celular irreversível, demonstrando a potencialidade genotóxica e mutagênica provocada às células meristemáticas pelos BTEX.

Testes de toxicidade apresentam relevante potencial para aplicação como ferramentas de monitoramento ambiental para avaliar a eficácia das tecnologias de descontaminação e biorremediação de ambientes (PLAZA et al., 2005). No entanto, os bioensaios, quando utilizados individualmente, podem não identificar a atenuação de compostos durante o processo de biorremediação, pois mesmo após a redução dos hidrocarbonetos os bioensaios com germinação de sementes podem indicar toxicidade, o que poderia ser resultado da formação de metabólitos intermediários tóxicos durante a biodegradação (PHILLIPS et al., 2000). Bioensaios são um complemento para análises químicas para avaliação da contaminação do solo e

progresso da biorremediação. Portanto, o uso combinado de análises químicas e ensaios de ecotoxicidade é recomendado para procurar explicar os efeitos e auxiliar a avaliar os riscos ecológicos associados à contaminação (SHEN et al., 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 4 apresenta o fluxograma esquemático com a metodologia empregada para atingir os objetivos propostos pela investigação do presente trabalho.

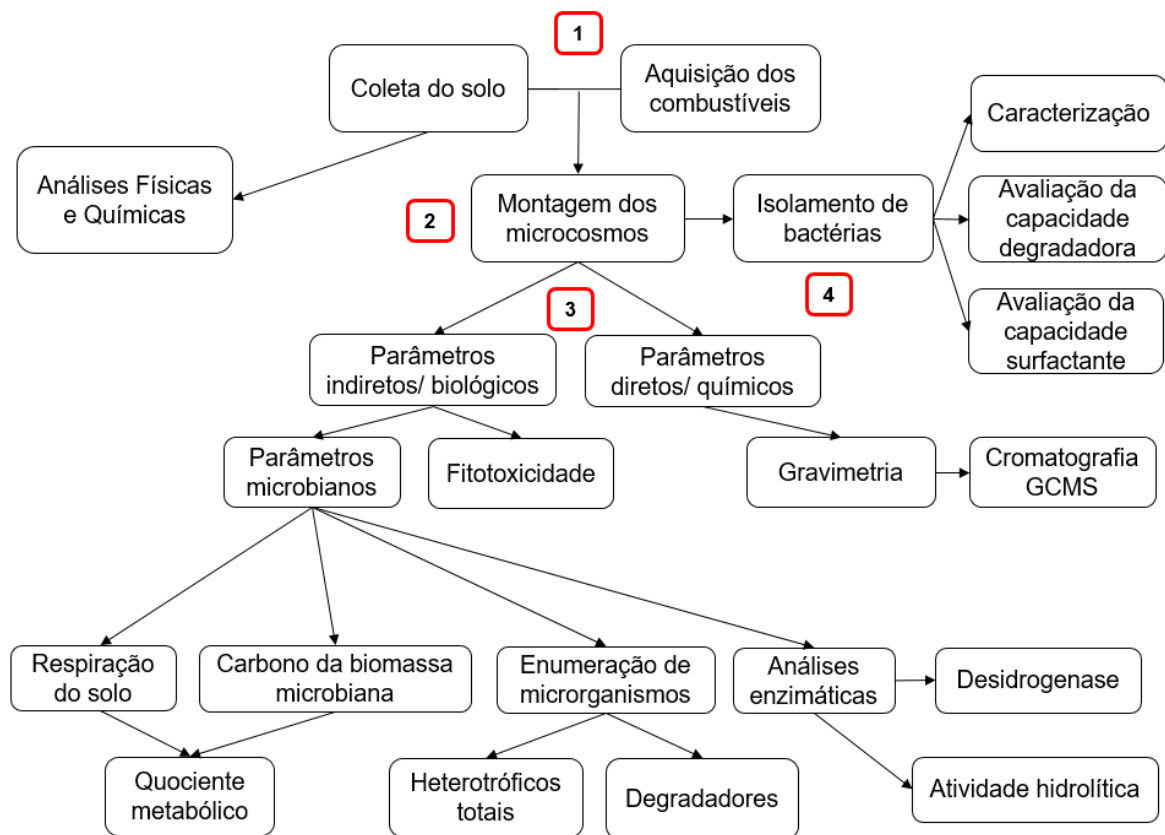


Figura 4. Fluxograma da abordagem metodológica da dissertação numerados conforme a ordem das etapas de execução.

3.1 COLETA, CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO

Foram coletadas amostras de solo, em profundidade de 0 a 20 cm (Horizonte A), de uma área sem histórico de contaminação por combustíveis, localizada na Área Experimental da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), município de Cerro Largo/RS. O solo é classificado pelo Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos como Latossolo Vermelho, com classe textural argilosa (EMBRAPA, 2006).

O solo foi submetido à secagem (22 ± 5 °C por 2 dias) e peneirado utilizando peneira com malha de 2 mm (COLLA et al., 2014). Após homogeneização, este solo foi utilizado para a montagem de microcosmos.

Uma amostra do solo foi encaminhada para caracterização física e química no Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), *Campus* Santa Maria. Outra amostra foi encaminhada para análises de granulometria e de capacidade de campo no Laboratório de Física do Solo da Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Cerro Largo. Os resultados destas análises são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do solo utilizado nos experimentos.

Atributo	Profundidade (0-20 cm)
Argila (%)	56,28
Areia Fina (%)	4,12
Areia Grossa (%)	6,29
Silte (%)	33,31
Matéria Orgânica (%)	2,80
P disponível (mg dm ⁻³)	14,20
K disponível (mg dm ⁻³)	312,00
CTC ^a efetiva (cmol _c dm ⁻³)	8,90
CTC pH7 (cmol _c dm ⁻³)	14,30
Al (cmol _c dm ⁻³)	0,10
Mg (cmol _c dm ⁻³)	1,50
Ca (cmol _c dm ⁻³)	6,50
H + Al (cmol _c dm ⁻³)	5,50
pH água 1:1	5,20
Índice SMP ^b	5,80
CC ^c (g de água g ⁻¹ de solo)	0,31

^a CTC: Capacidade de Troca de Cátions; ^b SMP: Método Shoemaker, Mac Lean e Pratt; ^c CC: Capacidade de campo.

3.2 PREPARO DOS CONTAMINANTES

A amostra de óleo diesel metropolitano S10 (10 ppm de enxofre), contendo 8% de biodiesel em sua composição (B8) conforme a legislação vigente no período, foi adquirida em um posto de combustível da região de Cerro Largo/RS. A amostra de biodiesel de soja foi gentilmente doada por uma empresa produtora do estado. A composição do biodiesel é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Ácidos graxos constituintes do biodiesel de soja.^a

Ácidos graxos	Percentual (%)
Gadoléico (C ₂₀ H ₃₈ O ₂)	0,2
Araquídico (C ₂₀ H ₄₀ O ₂)	0,4
Esteárico (C ₁₈ H ₃₆ O ₂)	4,0
Linolênico (C ₁₈ H ₃₀ O ₂)	5,9
Palmítico (C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	10,5
Oléico (C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	26,2
Linoléico (C ₁₈ H ₃₂ O ₂)	52,8
Antioxidante	Ácido Cítrico

^a Dados fornecidos pela empresa doadora da amostra.

Os dois combustíveis foram esterilizados por filtração com membranas de 0,22 µm. Após a filtração, os combustíveis foram armazenados em frascos estéreis e hermeticamente fechados. Os frascos permaneceram envoltos com papel alumínio para serem protegidos da luz, assim evitando a foto-oxidação, e armazenados à temperatura ambiente.

3.3 MONTAGEM E INCUBAÇÃO DOS MICROCOSMOS

Os microcosmos foram montados utilizando frascos de vidro com tampa de fechamento hermético e capacidade de 3,5 L. Foram adicionados 900 g de solo em cada frasco, com a umidade previamente ajustada para 60% da capacidade de campo, conforme Tedesco et al. (1995), através da adição de água destilada estéril.

O solo foi contaminado com concentrações de 5% e 10% de biodiesel e de diesel (massa em relação à massa de solo seco), sendo revolido com espátula estéril para a homogeneização das misturas solo-combustível. Para cada contaminação foram mantidos microcosmos em quadruplicata, além de microcosmos sem a adição do combustível, também em quadruplicata, totalizando 20 microcosmos, distribuídos da seguinte forma:

Tratamento (T):

T1 – Controle (sem contaminação);

- T2** – Atenuação Natural + Diesel (5%);
- T3** – Atenuação Natural + Diesel (10%);
- T4** – Atenuação Natural + Biodiesel (5%);
- T5** – Atenuação Natural + Biodiesel (10%).

As incubações foram realizadas por 90 dias em temperatura ambiente, sem incidência de luz. Temperaturas mínima e máxima foram registradas periodicamente ao longo do experimento. A umidade gravimétrica foi monitorada ao longo do período de incubação do solo a partir de pesagens dos microcosmos. Havendo necessidade, água destilada estéril foi adicionada aos microcosmos. Durante a incubação foram realizados revolvimentos periódicos, em ambiente estéril, para a homogeneização e aeração dos microcosmos.

3.4 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA

A atividade respiratória microbiana nos microcosmos foi avaliada com base na liberação cumulativa de C-CO₂ (ALEF, 1995). A liberação do CO₂ pode, indiretamente, indicar a potencial degradação do contaminante (JACQUES et al., 2007a, LABUD et al., 2007). Os microcosmos foram equipados com um sistema para a captação do CO₂ liberado, constituído de um recipiente plástico contendo 20 mL de NaOH (0,5 mol L⁻¹). Dois frascos sem solo, porém contendo recipiente com NaOH, foram utilizados como provas em branco.

Os microcosmos foram mantidos hermeticamente fechados, sendo ligeiramente abertos periodicamente para a retirada dos recipientes contendo NaOH e o CO₂ capturado, bem como para a imediata substituição por novo recipiente contendo NaOH.

Aos recipientes retirados foi adicionado 1 mL de solução de BaCl₂ (30%, m v⁻¹) e quatro gotas de fenolftaleína 1%. Após, a quantidade residual de NaOH foi titulada com HCl (0,5 mol L⁻¹). Amostras de solo dos microcosmos foram utilizadas para determinação da massa seca de solo. A quantidade de CO₂ liberado foi determinada pela seguinte equação (STOTZKY, 1965; COLLA et al., 2014):

$$\text{C-CO}_2 \text{ (mg kg}^{-1} \text{ solo seco)} = [(B - T) \times \text{eq} \times \text{MHCl} \times \text{Fc}] / \text{Mc}$$

onde:

B = volume (mL) de HCl 0,5 mol L⁻¹ usado na titulação da prova em branco;

T = volume (mL) de HCl 0,5 mol L⁻¹ usado na titulação do tratamento (microcosmos);

eq = equivalente-grama do carbono (igual a 6);

MHCl = concentração molar da solução padronizada de HCl;

Fc = fator de correção da molaridade de ácido/base (mol L⁻¹ HCl / mol L⁻¹ NaOH);

Mc = massa de solo seco (em kg) no microcosmo.

A respiração foi avaliada diariamente nos primeiros 10 dias do experimento e, posteriormente, a cada dois ou três dias. Os resultados são apresentados na forma de respiração acumulada.

3.5 ATIVIDADE HIDROLÍTICA MICROBIANA DO SOLO

O diacetato de fluoresceína (FDA) é um composto incolor utilizado para avaliar a atividade hidrolítica em solos. Este substrato é hidrolisado tanto por enzimas extracelulares quanto parietais, liberando como produto a fluoresceína que é mensurada em espectrofotômetro (ADAM; DUNCAN, 2001).

Amostras compostas (referentes a quadruplicata de cada tratamento) de solo (2,0 g) foram coletadas periodicamente dos microcosmos, de forma asséptica, e acondicionadas em frascos Erlenmeyer (125 mL). Em seguida, foram adicionados 15 mL de tampão fosfato (60 mmol L⁻¹; pH 7,6) e 0,2 mL de solução de FDA (1000 µg mL⁻¹, preparada em acetona), em triplicata. Os frascos foram fechados, agitados manualmente e então incubados em agitador orbital (30 °C; 100 rpm) por 20 min. A reação foi finalizada com a adição de 15 mL de solução de clorofórmio/metanol (2:1, v v⁻¹) e os frascos agitados vigorosamente.

Após, o conteúdo foi alocado em tubos de centrífuga (50 mL) e centrifugados por 10 min a 7.000 rpm. O sobrenadante foi coletado, filtrado utilizando papel filtro, e a absorbância do filtrado foi mensurada em espectrofotômetro a 490 nm. Foram realizados controles contendo solo e tampão, mas sem FDA. Estes controles foram utilizados como “zero” para a mensuração da absorbância. A quantidade de fluoresceína liberada (µg fluoresceína g⁻¹ solo seco) foi determinada através de curva padrão de fluoresceína (ADAM; DUNCAN, 2001).

3.6 ATIVIDADE DE DESIDROGENASE

A atividade de desidrogenase foi estimada periodicamente, durante a incubação dos microcosmos, pela redução de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Cinco gramas de solo foram acondicionados em tubos do tipo Falcon de 50 mL e, na sequência, foram adicionados 5 mL de tampão Tris-HCl (100 mmol L^{-1} ; pH 8,0) contendo TTC (1%, m v^{-1}), em triplicata. Foram realizados controles com solo e tampão, mas sem a adição de TTC.

As amostras compostas de solo (8 g) foram incubadas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 16 h. O produto da ação da desidrogenase (2,3,5-trifenilformazan) foi extraído com a adição de 20 mL acetona. Para tanto, após a adição da acetona, os tubos foram mantidos no escuro por 2 h e agitados manualmente a cada 20 min. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 min e, após, foram mensuradas as absorvâncias dos sobrenadantes a 485 nm. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), referente ao tempo de incubação dos microcosmos onde foi observada máxima absorvância (100%).

3.7 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA

Periodicamente, o carbono (C) da biomassa microbiana no solo dos microcosmos foi determinado pelo método modificado da fumigação-extração (VANCE et al., 1987). A fumigação foi realizada através da adição de clorofórmio isento de etanol diretamente a amostras de solo (BROOKES et al., 1982; WITT et al. 2000). O clorofórmio, além de matar os microrganismos, rompe as células microbianas, liberando constituintes microbianos citoplasmáticos para o solo, permitindo assim sua extração (JENKINSON; POWLSON, 1976).

Os procedimentos a seguir foram realizados em capela de exaustão. Amostras compostas de solo (20 g), em triplicata, foram adicionadas de 1 mL de clorofórmio isento de etanol em frascos que foram mantidos hermeticamente fechados. Após incubação no escuro, por 24 h, os frascos foram abertos para evaporação do clorofórmio. Procedeu-se, então, a extração do carbono orgânico com 50 mL de solução aquosa de sulfato de potássio (pH 6,5 – 6,8; $0,5 \text{ mol L}^{-1}$), através da agitação durante 1 hora a 100 rpm. Amostras de solo não submetidas à fumigação foram, logo após a pesagem, adicionadas da solução extratora e seguido

de agitação. Após, o sobrenadante foi filtrado em papel filtro (25 µm). Adicionalmente uma amostra composta de solo (20 g) foi submetida a secagem em estufa a 105°C por 24 horas para obtenção da umidade gravimétrica do solo.

Seguindo-se à extração, o carbono dissolvido no extrato (8 mL da solução extraída) foi submetido à oxidação por via úmida, utilizando uma mistura de dicromato de potássio 0,066 mol L⁻¹ (2 mL), ácido sulfúrico (10 mL) e ácido ortofosfórico (5 mL) concentrados, com aquecimento externo. Após o resfriamento foram adicionadas 70 mL de água destilada e quatro gotas de difenilamina (1% m/v em ácido sulfúrico). O excesso de dicromato foi então titulado com sulfato ferroso amoniacal 0,033 mol L⁻¹ (BROOKES; JOERGENSEN, 2005).

Para a padronização da molaridade exata da solução de sulfato ferroso amoniacal, utilizou-se a seguinte equação:

$$M_1 = [(M_2 \times V_2) \times 6] / V_1$$

onde:

M₁ = molaridade exata padronizada do sulfato ferroso amoniacal;

M₂ = molaridade exata do dicromato de potássio (0,066 mol L⁻¹);

6 = razão estequiométrica (K₂Cr₂O₇);

V₁ = volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra controle (branco);

V₂ = volume da alíquota de dicromato de potássio utilizada.

O teor de C nos extratos de solo foi calculado pela seguinte equação:

$$C \text{ (mg C kg}^{-1} \text{ solo)} = [(V_b - V_a) \times M \times 0,003 \times V_1 \times 10^6] / (P_s \times V_2)$$

onde:

C = carbono extraído do solo;

V_b (mL) = volume do sulfato ferroso amoniacal utilizado para a titulação da solução controle (branco);

V_a (mL) = volume do sulfato ferroso amoniacal utilizado para a titulação da amostra;

M = molaridade exata do sulfato ferroso amoniacal;

V₁ = volume do extrator (K₂SO₄) utilizado;

V2 = alíquota do extrato utilizada para a titulação;

Ps (g) = massa de solo seco.

O cálculo do carbono da biomassa microbiana (BMS-C) do solo é dado pela fórmula:

$$\text{BMS-C (mg C microbiano kg}^{-1} \text{ solo seco)} = \text{FC} \times k_c^{-1}$$

onde:

FC = diferença entre a quantidade de C (mg kg⁻¹ solo) recuperada no extrato da amostra fumigada e aquela recuperada no extrato da amostra não fumigada;

k_c = fator de correção, igual a 0,33 (SPARLING; WEST, 1988).

3.7.1 Quociente metabólico

O quociente metabólico (qCO₂) foi calculado pela razão entre respiração e o carbono da biomassa microbiana (ANDERSON; DOMSCH, 1993). Os valores encontrados foram expressos em mg C-CO₂ mg C mic⁻¹ dia⁻¹, conforme a fórmula:

$$q\text{CO}_2 = \frac{\text{C-CO}_2 \text{ (mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo seco dia}^{-1})}{\text{BMS-C (mg C microbiano kg}^{-1} \text{ solo seco)}}$$

3.8 ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS

Amostras compostas de solo (1 g), periodicamente coletadas de forma asséptica a partir dos microcosmos, passaram por diluições decimais seriadas, de 10⁻¹ a 10⁻⁸, em salina estéril (8,5 g L⁻¹ NaCl). Posteriormente, 20 µL destas diluições foram inoculadas, em triplicata, em 180 µL de Caldo Soja Tripticaseína (TSB) estéril, contidos em poços de placas de poliestireno de 96 poços estéreis. As placas foram incubadas por 5 dias a 30 °C, envoltas em papel alumínio para proteger da luz. Avaliações foram realizadas através da verificação da turbidez do meio, indicando crescimento microbiano. O Número Mais Provável (NMP) de microrganismos heterotróficos das amostras foi obtido a partir de tabela de referência (BLODGETT, 2010). A quantificação de microrganismos foi expressa como Log NMP g⁻¹ solo seco,

considerando o volume de amostra e o fator de diluição.

3.9 ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES

O método foi baseado na utilização do indicador redox 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), conforme proposto por Braddock e Catteral (1999). A poços de placas de poliestireno de 96 poços estéreis foram acrescentados 185 μL de meio mineral Bushnell-Hass (OBI et al., 2016) contendo TTC ($0,05 \text{ g L}^{-1}$). Então, 100 μL de diferentes diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) das amostras compostas de solo (1 g), preparadas em salina estéril ($8,5 \text{ g L}^{-1}$ NaCl), foram utilizados para inocular os poços, em triplicata. Na sequência, foram acrescentados 15 μL de biodiesel ou diesel, estéreis. Como controles, diluições de solo dos microcosmos sem contaminação foram avaliadas para ambos os combustíveis, separadamente.

As placas foram incubadas envoltas em papel alumínio, durante 10 dias a 30°C , a fim de detectar microrganismos capazes de utilizar os componentes orgânicos dos combustíveis como únicas fontes de carbono e energia. O TTC é um aceptor artificial de elétrons e sua redução indica, indiretamente, a oxidação e utilização microbiana do substrato orgânico presente no meio, neste caso o combustível. A redução do TTC (incolor) no composto formazan (coloração rósea) foi considerada como teste positivo (SOUZA et al., 2016).

O Número Mais Provável (NMP) de microrganismos degradadores foi então estimado a partir de tabela de referência (BLODGETT, 2010). A quantificação de degradadores foi expressa como Log NMP g^{-1} solo seco, considerando o volume de amostra e o fator de diluição.

3.10 AVALIAÇÃO DO pH DO SOLO

O pH das amostras de solo foi mensurado a cada 30 dias. Para tanto, foram pesadas 10 g de solo (amostras compostas) e diluídas em 25 mL de água destilada (1:2,5) (EMBRAPA, 1997). As amostras foram então mantidas em agitação por 1 h, para homogeneização. As diluições permaneceram em repouso por 20 min e, após, foram novamente homogeneizadas com o auxílio de um bastão de vidro. Então, o pH foi determinado com o auxílio de um pHmetro digital de bancada, previamente calibrado.

3.11 AVALIAÇÃO DE FITOTOXICIDADE

Sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) da variedade “Maravilha de Inverno” (ISLA Sementes Ltda., lote 105520-001-S2; 86% de germinação) e pepino (*Cucumis sativus* L.) da variedade “Caipira” (ISLA Sementes Ltda., lote 103689-014-S2; 97% de germinação), ambas sem qualquer tipo de tratamento e/ou aditivos químicos, foram empregadas nos testes de fitotoxicidade.

Estes testes foram realizados em triplicata, a cada 45 dias, totalizando três avaliações no decorrer do experimento. Amostras compostas de solo (40 g), acondicionadas em placa de Petri de vidro, foram umedecidas com água destilada, homogeneizadas e então foram adicionadas 10 sementes de modo a ficarem totalmente cobertas pelo solo. As placas foram então fechadas e incubadas em câmara de germinação do tipo B.O.D. por 120 h (MORALES, 2004; CRUZ et al., 2013a). As sementes de alface permaneceram em temperatura constante de 22 °C, sem fotoperíodo (MORALES, 2004; CRUZ et al., 2013a), e as sementes de pepino a 23 °C com fotoperíodo de 16/8 h (MARSCHNER et al., 1990).

O experimento foi monitorado diariamente e, quando necessário, água destilada foi adicionada para evitar dessecação. Após 5 dias, foram contabilizadas as sementes germinadas e não germinadas, optando-se por considerar como germinados os brotos com radículas iguais ou superiores a 2 mm de comprimento (MARTINEZ et al., 2009). Foram mensurados (em mm) os tamanhos das radículas e dos hipocótilos (quando presentes) das plântulas com o auxílio de paquímetro digital.

A partir dos resultados obtidos foram avaliados a germinação relativa das sementes (G), o alongamento relativo das radículas (AL) e o índice de germinação (IG) de acordo com fórmulas propostas por Zucconi et al. (1985), que consideram a porcentagem de germinação das sementes e do tamanho das radículas do tratamento (solo contaminado) com relação ao controle (solo não contaminado):

$$G (\%) = (NSC \times NST) / 100$$

onde:

G (%): Germinação relativa, em porcentagem;

NSC: Número de sementes germinadas no solo contaminado;

NST: Número de sementes germinadas no solo testemunha (sem

contaminação).

$$AL (\%) = (\text{Média ALC} / \text{Média ALT}) \times 100$$

onde:

AL (%) = Alongamento relativo da radícula, em porcentagem;

ALC: Alongamento das radículas no solo contaminado;

ALB: Alongamento das radículas no solo testemunha (sem contaminação).

$$IG (\%) = (G\% \times AL\%) / 100$$

onde:

IG (%): Índice de Germinação, em porcentagem;

G%: Germinação relativa em porcentagem;

AL%: Alongamento relativo da radícula em porcentagem.

Além do IG também são apresentados os dados referentes à porcentagem de inibição da germinação das sementes, relativos aos controles negativos, em separado.

3.12 DEGRADAÇÃO DOS COMBUSTÍVEIS

3.12.1 Extração a partir do solo e determinação gravimétrica

O método utilizado, considerado adequado para quantificação de lipídeos biológicos e hidrocarbonetos minerais, baseia-se na solubilidade destes constituintes num solvente orgânico como o hexano (DEON et al., 2012).

Amostras compostas de solo foram coletadas dos microcosmos a cada 30 dias, armazenadas em frascos de vidro (estéreis e vedados) e mantidas em freezer até a extração. Para a extração, foram pesados 10 g de solo de cada tratamento em cartuchos de papel filtro, sendo então adicionados 5 g de sulfato de magnésio anidro com o objetivo de capturar a água existente na amostra e facilitar o processo de extração (MEDAURA; ÉRCOLI, 2008). Após, os cartuchos foram totalmente fechados e a extração realizada com o auxílio de um extrator contínuo de óleos e

graxas por imersão, do tipo Soxhlet (Marconi, modelo MA 044/850).

Copos *reboilers*, previamente lavados e mantidos em estufa por 24 h a 105 °C para secagem foram colocados em um dessecador até atingirem temperatura ambiente e então foram pesados. O solvente utilizado para a extração foi o hexano (VILLALOBOS et al., 2008) e, para tanto, foram adicionados 200 mL do solvente em cada um dos copos. Após, os cartuchos contendo as amostras foram colocados nos berços do extrator e imersos nos copos com hexano.

A temperatura do extrator foi elevada gradativamente, para evitar superaquecimento, até chegar a 100 °C. Ao atingir esta temperatura, os cartuchos permaneceram submersos por 4 h. Após, os berços foram suspensos dentro do sistema, o qual permaneceu fechado, para que houvesse o gotejamento por 30 min. Ao final, a temperatura foi elevada para 125 °C e o sistema aberto para permitir a recuperação do solvente (até 80%, conforme capacidade do equipamento), sem tempo limite para tal.

Após a extração, os copos foram retirados do extrator e mantidos em estufa (60 °C) para evaporação do solvente até atingirem massa constante. Os valores foram anotados e através da média dos valores das extrações realizadas de duplicata foi mensurado gravimetricamente o residual extraído dos combustíveis (diminuindo-se a massa dos frascos e também o valor da amostra controle) no decorrer do experimento. Ao final, as amostras foram ressuspensas em hexano e armazenadas em frascos âmbar em freezer até o preparo das mesmas para as análises cromatográficas.

3.12.2 Avaliação por cromatografia (GC-MS)

As amostras previamente extraídas foram transferidas para balões de separação, onde foi adicionado hexano e água destilada. Os balões foram agitados, separando as fases oleosa e aquosa, sendo que a parte aquosa foi desprezada. O processo foi repetido por três vezes. Após, foi adicionado sulfato de magnésio anidro até que toda a água da amostra fosse capturada, e então as amostras foram filtradas em papel filtro, transferidas para balões de fundo redondo e colocadas em um evaporador rotativo a 40 °C e velocidade de 250 rpm, até a completa evaporação do solvente. Ao final, as amostras foram transferidas para frascos âmbar e colocadas em uma bomba de vácuo para eliminar quaisquer traços de água restantes.

Foram pesados 20 mg dos combustíveis extraídos, ao qual foram adicionados 10 mL de acetato de etila. A partir dessa solução foi preparada uma amostra de 500 μL , à qual foram adicionados 500 μL de acetato de etila. Desta solução, 1 μL foi injetado no equipamento. As avaliações foram realizadas para os tempos 0, 30, 60 e 90 dias, porém estão apresentados no presente trabalho apenas as figuras do tempo inicial (0 dias) e do tempo final (90 dias).

As análises para avaliação da degradação dos compostos do diesel/ biodiesel foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) utilizando um aparelho GC-MS-QP2010 (SHIMADZU, Japão), equipado com uma coluna capilar NST 05MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm espessura), não polar, composta por dimetilpolisiloxano (95%) e difenil (5%).

A temperatura do injetor e do detector foi fixada em 280 °C, com uma temperatura de interface de 280 °C. Cada amostra de 1 μL foi injetada com uma razão de separação de 1:32 e uma vazão de 1,65 mL min^{-1} de gás hélio. A temperatura inicial foi de 60 °C, seguida por um aumento para 280 °C a 15° C min^{-1} , que foi então mantido por 7 min. O GC-MS foi ajustado para uma tensão de 0,70 kV, proporcionando uma ionização por impacto de 70 eV para fragmentação molecular e produção de íons em um campo de massa/carga elétrica (m/z) de 35 a 500 para identificar a estrutura de cada subproduto, bem como determinar suas concentrações nas amostras. Além disso, a temperatura da fonte de íons de 280 °C foi mantida fixa para seleção e quantificação de compostos orgânicos em amostras. Um conjunto de compostos orgânicos em termos de m/z foi comparativamente identificado com base em seus padrões característicos de GC-MS usando a biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology) 08 disponível no GCMS-QP2010.

3.13 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DE MICROCOSMOS CONTAMINADOS

Ao final da incubação dos microcosmos (90 dias), uma amostra composta de solo foi coletada de cada conjunto de microcosmos contaminados e, após diluições decimais em série, as diluições foram aplicadas por espalhamento em placas de Petri contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA). As placas permaneceram em incubação a 30 °C por 5 dias. Posteriormente, colônias morfologicamente distintas

foram isoladas em culturas puras através da técnica de esgotamento em novas placas de PCA. As placas contendo os isolados bacterianos foram mantidas sob refrigeração (4 °C) e, no máximo a cada 30 dias, os isolados foram repicados, para manutenção, em novas placas de PCA.

Os isolados bacterianos foram caracterizados quanto à morfologia celular e o perfil tintorial de Gram.

3.14 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DEGRADADORA E PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES DOS ISOLADOS

3.14.1 Preparo dos inóculos

Placas de PCA cultivadas com o respectivo isolado bacteriano foram utilizadas para o preparo de inóculos. Para tanto, a biomassa bacteriana foi coletada a partir das placas de PCA e adicionada a meio mineral Bushnell-Hass (OBI et al., 2016), de maneira a formar uma suspensão bacteriana com densidade óptica (OD) de 0,1-0,2 unidades a 600 nm (OD_{600}) em espectrofotômetro (MEYER et al., 2012). Em seguida, os frascos contendo a suspensão bacteriana foram mantidos a 30 °C em estufa com agitação orbital (100 rpm) durante 24 h, para ocorrer a exaustão das reservas energéticas das bactérias (CERQUEIRA et al., 2012). Estas suspensões foram utilizadas para os experimentos de degradação de combustíveis, produção de biossurfactantes e hidrofobicidade celular.

3.14.2 Indicação da capacidade dos isolados em degradar combustíveis

A avaliação da capacidade degradadora de combustíveis foi realizada utilizando o indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (BRADDOCK; CATTERALL, 1999). A avaliação foi realizada em microplacas de 96 poços estéreis (CERQUEIRA et al., 2012). Para tanto, foram adicionadas a cada poço da microplaca, em triplicatas, 255 µL de meio mineral Bushnell-Hass estéril (OBI et al., 2016) contendo TTC (0,05 g L⁻¹), 15 µL do inóculo bacteriano e 30 µL de diesel ou biodiesel estéril (representando 10% do volume total), conforme a origem do microcosmo a partir do qual o microrganismo foi isolado. Desta forma, o combustível foi a única fonte de carbono e energia para o crescimento bacteriano. As microplacas,

envoltas em papel alumínio, foram incubadas em estufa a 30 °C por 10 dias. A partir de avaliações visuais diárias, foi verificado o tempo de cultivo em que ocorreram as mudanças de coloração do meio, causadas pela redução do TTC, para cada isolado. Os resultados destes experimentos foram expressos como “positivo” ou “negativo” (SOUZA et al., 2016).

3.14.3 Detecção da produção de biossurfactantes e hidrofobicidade celular

Os isolados também foram avaliados quanto à capacidade de produção de biossurfactantes. Inicialmente, tubos de ensaio com tampa, em duplicata, foram utilizados para os cultivos. A estes frascos foram adicionados 8,5 mL de meio mineral estéril, 1,0 mL de combustível (10% v v⁻¹) diesel ou biodiesel estéril, conforme a origem do microcosmo a partir do qual o microrganismo foi isolado e 0,5 mL de inóculo (5% v v⁻¹), preparado como especificado no Item 3.14.1. Após a inoculação, os tubos foram incubados em estufa com agitação orbital (100 rpm) a 30 °C por 10 dias. A partir dos cultivos, alíquotas foram retiradas para avaliação da produção de biossurfactantes, através do índice de emulsificação, e determinação do nível de hidrofobicidade celular (CERQUEIRA et al., 2012).

3.14.3.1 Índice de emulsificação (IE)

A avaliação do índice de emulsificação foi realizada na presença e na ausência de células, após cultivos em meio mineral contendo diesel e biodiesel. Para o preparo de solução sem células, o meio foi centrifugado (6.000 g por 15 min) e os sobrenadantes foram utilizados para avaliação do índice de emulsificação. Dois mL da respectiva suspensão dos cultivos, com ou sem células, separadamente, foram adicionados a 2 mL de tolueno, em tubos de fundo chato. Os tubos foram agitados em vórtex por 2 min na agitação máxima e então deixados em repouso por 24 h, em temperatura ambiente e protegidos da luz. Após este período foram mensuradas a altura da coluna emulsificada no tubo (mm) e a altura total da coluna de líquido no tubo (mm) (Figura 4). O índice de emulsificação (IE₂₄) foi calculado pela seguinte equação (RAZA et al., 2006):

$$IE_{24} = (\text{Altura da coluna emulsificada} / \text{Altura total de líquido}) \times 100$$

3.14.3.2 Medida da hidrofobicidade celular (HC)

A hidrofobicidade celular (HC) foi avaliada pelo método de Adesão Bacteriana a Hidrocarbonetos (BATH), originalmente proposto por Rosenberg et al. (1980). Para este método, células bacterianas dos cultivos em meio mineral contendo diesel ou biodiesel foram inicialmente coletadas por centrifugação (6.000 g por 15 min). A biomassa celular foi lavada duas vezes com tampão PUM (pH 7,1) e então ressuspendida no mesmo tampão até atingir OD₆₀₀ entre 0,6 e 0,8 unidades. Uma alíquota de 2,4 mL da suspensão de células foi agitada com 0,4 mL de tolueno ou xileno (separadamente), em tubos de vidro, por 2 min, usando agitador de tubos. Os tubos permaneceram em repouso por 30 min para a separação de fases e a OD₆₀₀ da fase aquosa foi então mensurada. O nível de HC foi expresso pela porcentagem de aderência das células à fase apolar, calculada da seguinte forma:

$$HC = [1 - (OD_{600} \text{ da fase aquosa} / OD_{600} \text{ inicial da suspensão de células})] \times 100.$$

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cálculos referentes às fórmulas descritas foram realizados utilizando o software Microsoft Excel 2013 (Microsoft, EUA). Os resultados das repetições foram utilizados para cálculo de médias e erro padrão. Também foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre parâmetros através do software R (3.3.1).

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA

A Figura 5 apresenta os dados referentes à respiração acumulada ao longo de 90 dias de incubação dos microcosmos referentes aos cinco tratamentos. Foi observado que todos os tratamentos com contaminação apresentaram níveis de atividade respiratória superiores ao controle, sem adição de combustível, que acumulou apenas 648,88 mg C-CO₂ kg solo⁻¹. Com relação aos tratamentos contaminados, ocorreram diferentes variações conforme o tipo e a concentração do combustível utilizado nos microcosmos.

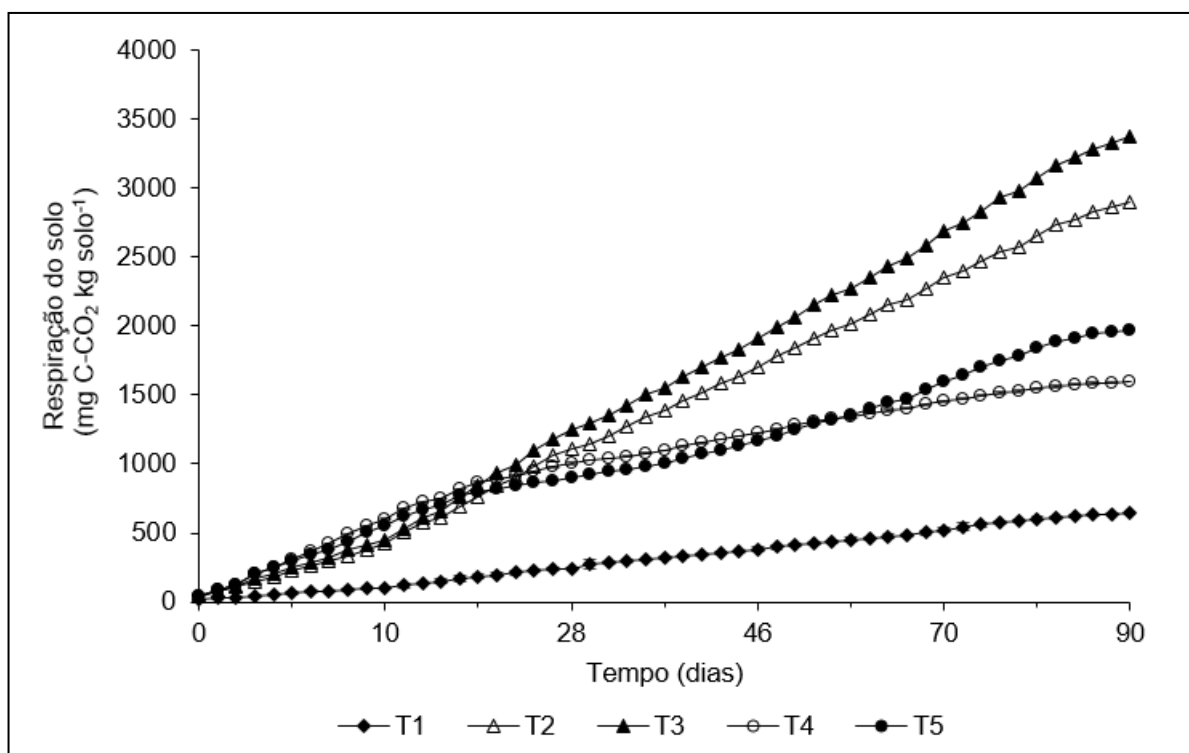


Figura 5 – Produção cumulativa de CO₂ por experimento respirométrico nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação.

Inicialmente a respiração entre os tratamentos com diesel e biodiesel foi semelhante, com o biodiesel apresentando atividade pouco superior. Após 10 dias de incubação, a produção de CO₂ referente aos tratamentos T4 e T5 começou a decair de maneira acentuada. Entre os dias 18-22, a produção de CO₂ nos tratamentos com diesel (T2 e T3) ultrapassou aquela dos tratamentos com biodiesel

(T4 e T5). Observou-se aumento na taxa de liberação de CO₂ à medida que houve aumento da concentração do combustível, tanto para diesel como para biodiesel, sendo que T3 apresentou uma respiração cumulativa 5,2 vezes maior em relação aos microcosmos controle (3378,78 mg C-CO₂ kg solo⁻¹) (Figura 5).

Também foi observado que os maiores valores de respiração diária para todos os tratamentos, incluindo o controle, ocorreram no dia seguinte ao da abertura dos microcosmos para a retirada do solo para a realização das análises (resultado não apresentado). Antes da retirada das amostras de solo era efetuado o revolvimento do solo, e assim havia a possibilidade da renovação natural do ar contido nos frascos.

Os resultados do acúmulo de CO₂ ao longo do tempo foram correlacionados com a atividade da desidrogenase, os quais apresentaram correlação positiva estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$) para T1 ($r = 0.66$) e correlação negativa estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$) para T2 ($r = 0.81$), T3 ($r = 0.72$), T4 ($r = 0.84$) e T5 ($r = 0.70$).

4.2 ATIVIDADE HIDROLÍTICA MICROBIANA DO SOLO

A Figura 6 apresenta os resultados referentes à atividade hidrolítica total do solo nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação. A hidrólise do FDA foi utilizada com o objetivo de avaliar a atividade microbiana frente à contaminação com diesel e biodiesel. Foi possível observar que a atividade hidrolítica total do solo controle (T1) se manteve superior aos demais tratamentos durante todas as avaliações. Com relação aos tratamentos com combustíveis, o tratamento com menor percentual de diesel (T2) apresentou maior atividade hidrolítica, quando comparado ao tratamento com o maior percentual (T3), em quase todas as avaliações. Já os tratamentos com biodiesel (T4 e T5) foram os que apresentaram menores atividades desde o início do monitoramento, sendo que a partir da quinta avaliação, após 29 dias de incubação, as atividades tenderam a zero.

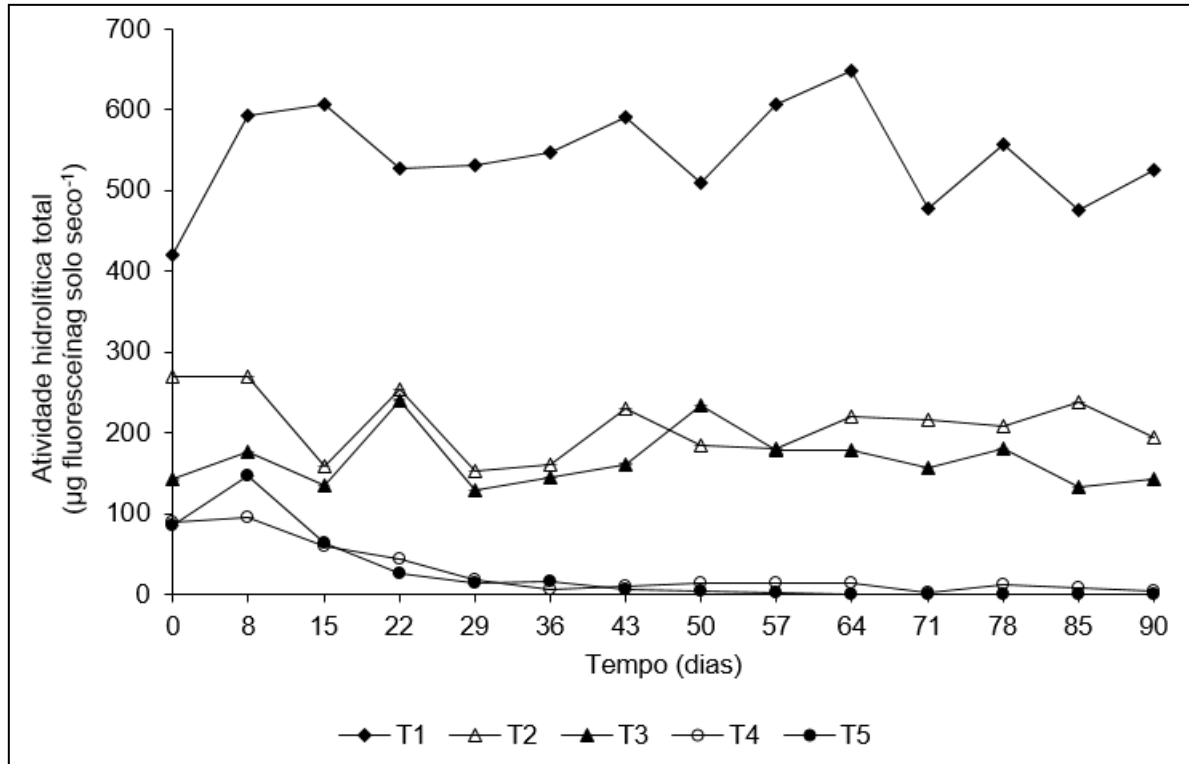


Figura 6 – Atividade hidrolítica total do solo nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação.

4.3 ATIVIDADE DE DESIDROGENASE

A atividade da desidrogenase nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação é apresentada na Figura 7. No tempo zero, a atividade da desidrogenase foi similar em todos os tratamentos. Após a primeira semana houve uma elevação da atividade em T1, T2 e T3 e, no mesmo período, ocorreu um declínio acentuado em T4 e T5. A partir do 15º dia, os tratamentos com adição de biodiesel (T4 e T5) tenderam a zero, enquanto que os tratamentos com diesel (T2 e T3) apresentaram um declínio constante no decorrer das avaliações. A partir do 22º dia, o tratamento controle se manteve mais elevado do que os demais tratamentos em todas as avaliações seguintes.

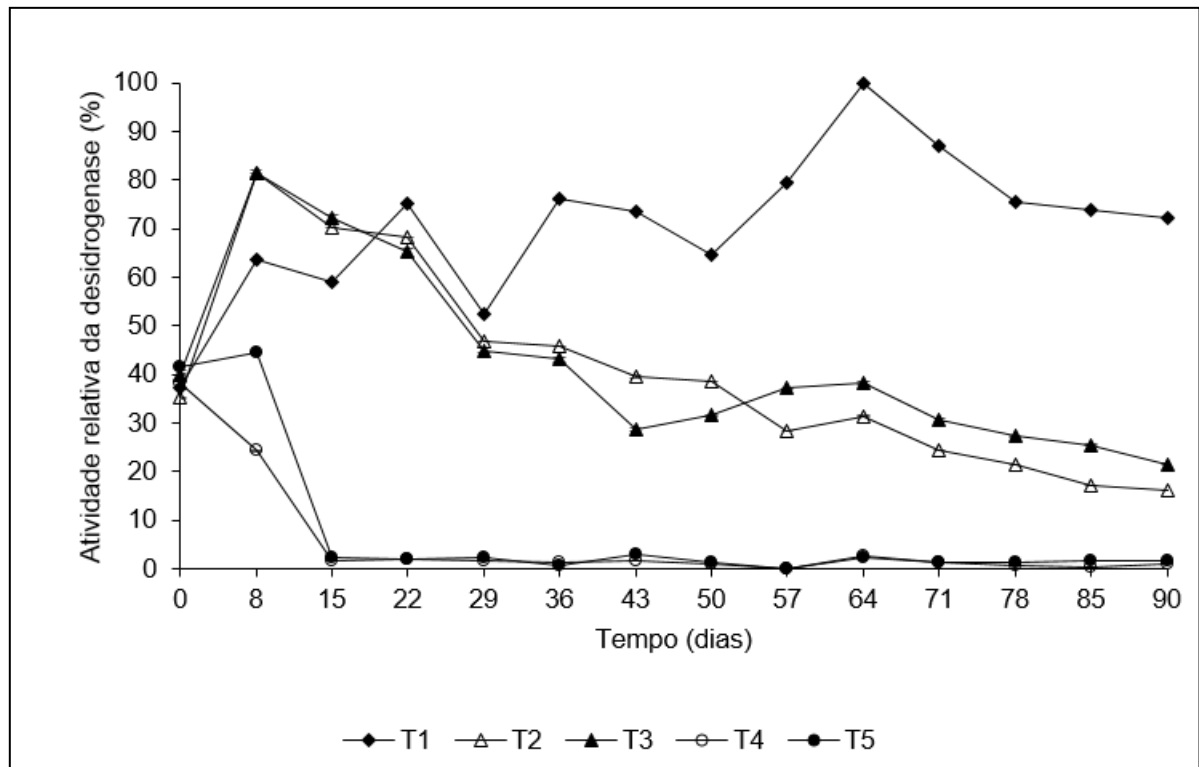


Figura 7 – Atividade da desidrogenase nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação.

4.4 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA E QUOCIENTE METABÓLICO

A Figura 8 apresenta os dados referentes ao carbono da biomassa microbiana nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação. Inicialmente, a biomassa microbiana se mostrou semelhante nos microcosmos com ambos os combustíveis, porém superior no solo sem contaminação (T1). Após 30 dias de incubação T1, T2 e T3 apresentaram elevação, sendo o BMS-C em T3 superior ao tratamento controle, e a BMS-C em T2 inferior ao controle.

Em contrapartida, após 30 dias houve declínio acentuado do BMS-C em ambos os tratamentos com biodiesel (T4 e T5), que nas avaliações realizadas aos 60 e 90 dias tenderam a aproximar-se de zero, porém ainda apresentavam biomassa. Ao final dos 90 dias de incubação, o BMS-C nos controles se manteve superior aos tratamentos com diesel; porém ambos (T2 e T3) se aproximaram de seus valores iniciais, com uma biomassa maior nos microcosmos com menor concentração de diesel (T2) em relação àqueles com maior concentração (T3).

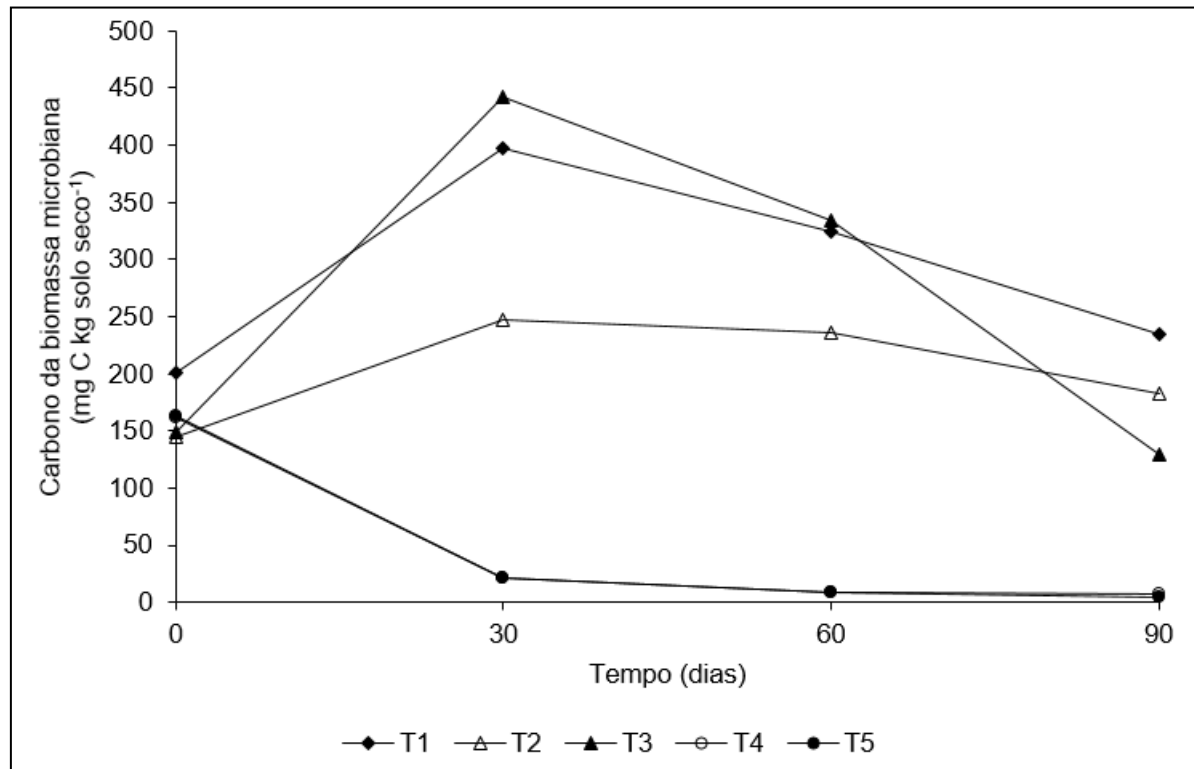


Figura 8 – Carbono da biomassa microbiana nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação.

O quociente metabólico (qCO_2), quantificado através da razão entre a quantidade de CO_2 liberado pela respiração e a quantidade de carbono da biomassa microbiana em função do tempo, representa a taxa de respiração específica da biomassa microbiana. A Figura 9 apresenta os valores do qCO_2 nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação.

O tratamento controle (T1) apresentou os menores valores para o quociente, sempre inferiores a $0,1 \text{ mg C-CO}_2 \text{ mg C mic}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ao longo dos 90 dias de incubação. Inicialmente, os tratamentos com adição de combustível apresentaram valores próximos ($0,25\text{-}0,28 \text{ mg C-CO}_2 \text{ mg C mic}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Nos microcosmos contaminados com diesel (T2 e T3), os valores de qCO_2 mantiveram-se virtualmente constantes ao longo do experimento. No entanto, os microcosmos com menor percentual de contaminação (T2) apresentaram qCO_2 inferior ($0,12 \text{ mg C-CO}_2 \text{ mg C mic}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) em relação àqueles com maior percentual de contaminação (T3; $0,20 \text{ mg C-CO}_2 \text{ mg C mic}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) ao final dos 90 de incubação.

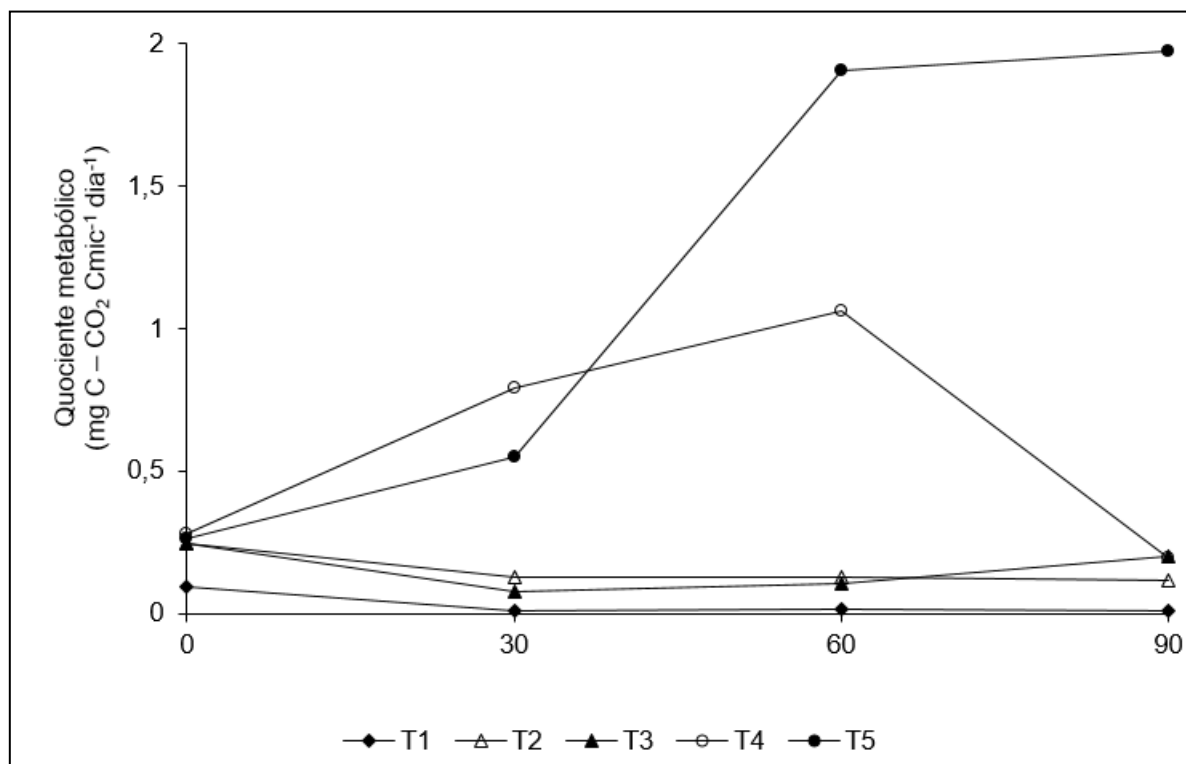


Figura 9 – Quociente metabólico nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação.

Os microcosmos contaminados com biodiesel apresentaram os maiores valores do quociente metabólico no decorrer do experimento (Figura 9). Os valores do tratamento com maior percentual de biodiesel (T5) aumentaram de forma significativa (de 0,23 para 1,97 mg C-CO₂ mg C mic⁻¹ dia⁻¹), explicados pelos teores relativamente elevados de CO₂ emitidos nos experimentos respirométricos e o baixo valor de biomassa microbiana. Tal fato também foi observado no tratamento com menor concentração de biodiesel (T4). Contudo, T4 apresentou declínio no q_{CO_2} (0,19 mg C-CO₂ mg C mic⁻¹ dia⁻¹ após 90 dias), pois tanto a biomassa, quanto a quantidade de CO₂ liberado sofreram redução.

4.5 ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS E MICRORGANISMOS DEGRADADORES

A técnica do NMP foi utilizada para estimar o tamanho das populações microbianas e assim monitorar seu crescimento ou redução ao longo de 90 dias de incubação dos microcosmos. Os números de microrganismos heterotróficos (Figura 10) e degradadores (Figuras 11 e 12) sofreram elevação logo ao oitavo dia de

monitoramento em todos os tratamentos, incluindo os controles, com relação ao tempo zero (dia em que os microcosmos foram montados e o solo contaminado com os combustíveis). Após esse período, os números de heterotróficos totais em T1 mantiveram certa constância, chegando ao final do período de incubação com praticamente o mesmo valor obtido no início da segunda semana de incubação (7,9 log NMP g⁻¹ solo).

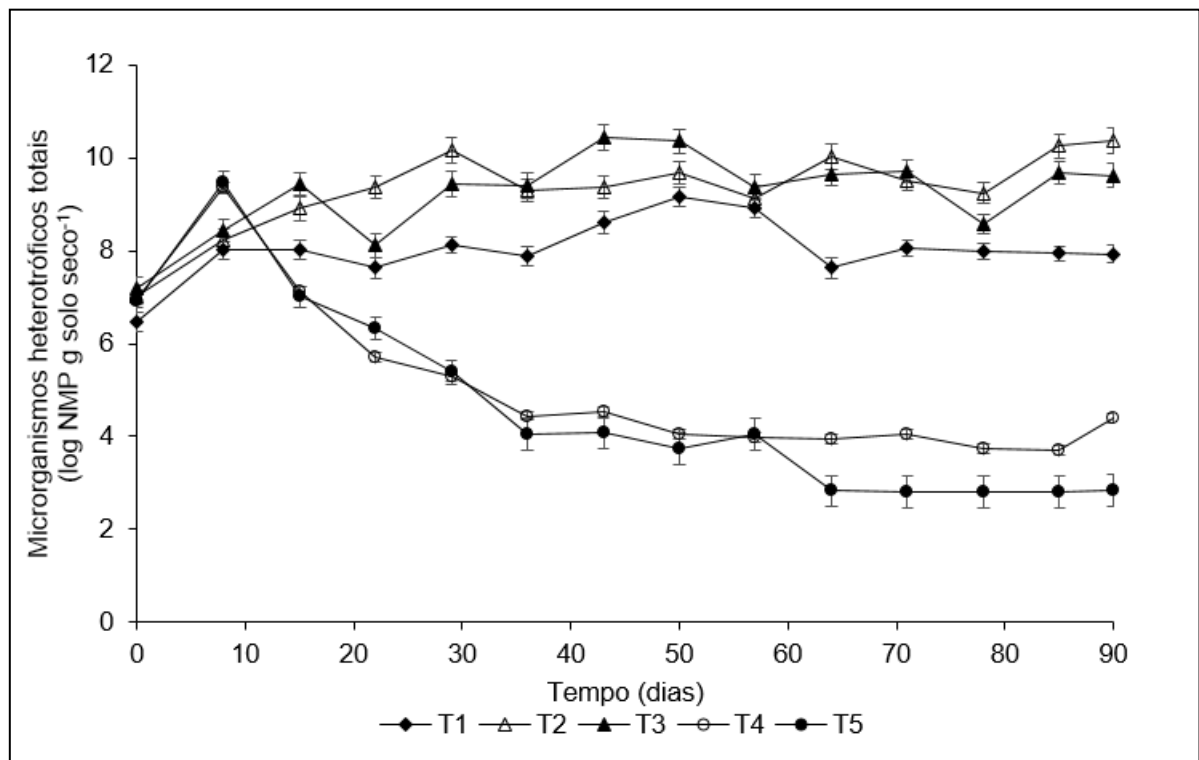


Figura 10 – Contagem de microrganismos heterotróficos totais pelo NMP nos cinco tratamentos ao longo de 90 dias de incubação.

Os microcosmos T2 e T3 apresentaram contagens sempre acima do controle (T1), chegando ao final do período de incubação com valores relativamente similares, porém com T2 apresentando o maior valor (10,4 log NMP g⁻¹), representando o tratamento com o maior valor de NMP. Já os microcosmos T4 e T5 apresentaram acentuada queda no número de heterotróficos totais no decorrer do período de avaliação, fato que foi verificado a partir do início da terceira semana (15 dias) de monitoramento (Figura 10).

Os microrganismos degradadores apresentaram comportamento semelhante aos heterotróficos totais. Os controles foram realizados utilizando o solo dos microcosmos não contaminados (T1), ou seja, essas amostras de solo não haviam

sido submetidas ao potencial estresse relacionado à presença dos contaminantes no solo.

Os controles para diesel (Figura 11) e biodiesel (Figura 12) apresentaram população degradadora ao longo de todo o experimento. As contagens de degradadores foram inferiores às contagens de heterotróficos totais (Figura 9). Apesar de pequenas variações, ambos os controles apresentaram contagens similares de microrganismos degradadores após 90 dias de incubação, sendo de 8,0 log NMP g⁻¹ solo para diesel (Figura 10) e 8,2 log NMP g⁻¹ solo para biodiesel (Figura 11).

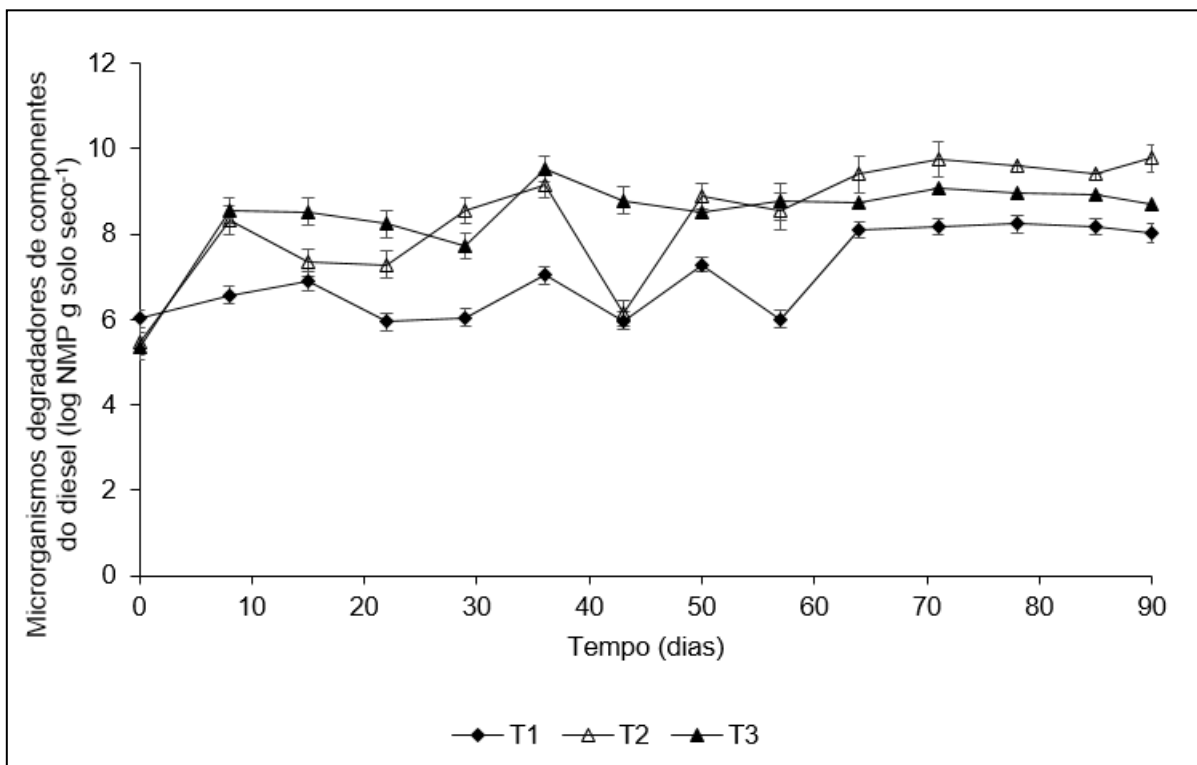


Figura 11 – Contagem de microrganismos degradadores pelo NMP nos tratamentos com diesel (incluindo controle) ao longo de 90 dias de incubação.

Os microrganismos degradadores dos microcosmos T2 e T3 também apresentaram contagens superiores ao controle (T1), com exceção da contagem no tempo zero. Ambos chegaram ao final do período de incubação com valores relativamente similares, com T2 apresentando um maior número (9,8 log de NMP/g) representando novamente o tratamento com o NMP mais elevado (Figura 11).

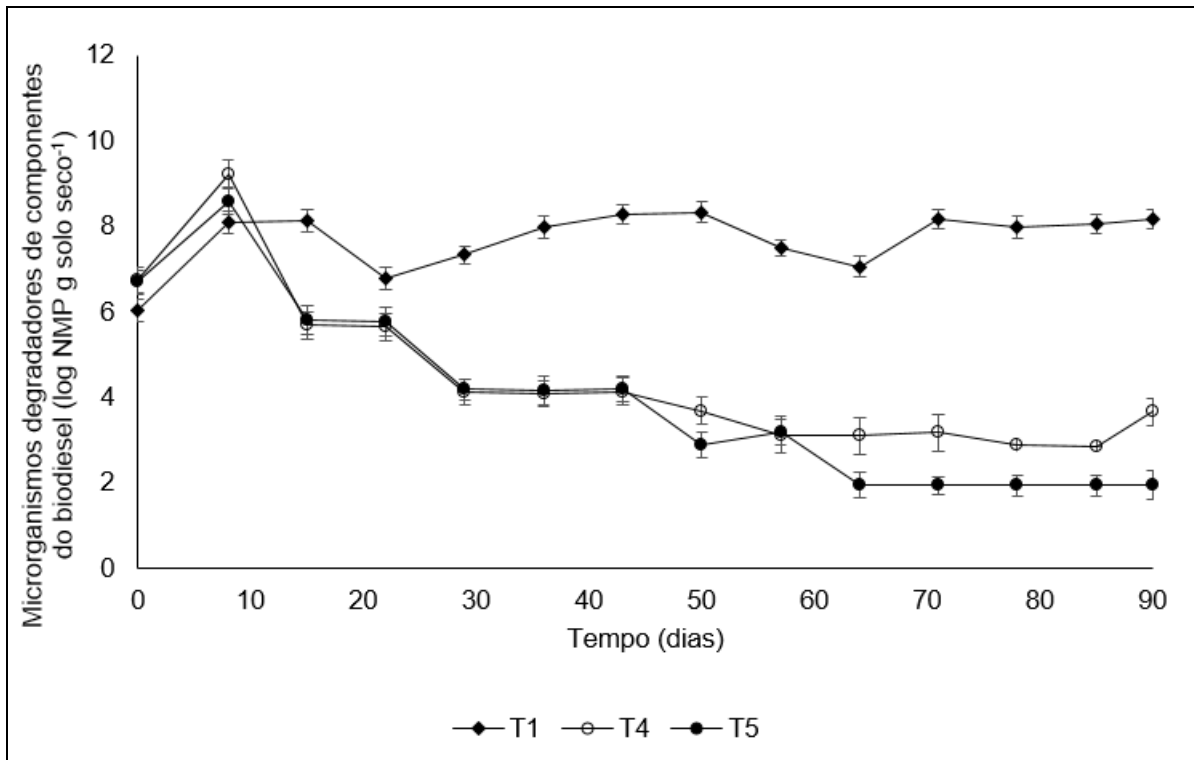


Figura 12 – Contagem de microrganismos degradadores pelo NMP nos tratamentos com biodiesel (incluindo controle) ao longo de 90 dias de incubação.

A partir da segunda semana os microcosmos T4 e T5 também apresentaram contagens inferiores ao solo controle (T1), demonstrando o mesmo comportamento dos heterotróficos totais. As contagens para degradadores decaíram de 9,2 e 8,6 log NMP g⁻¹ para 3,7 e 2,0 log NMP g⁻¹, respectivamente, ao final dos 90 dias (Figura 12).

4.6 AVALIAÇÃO DO pH DO SOLO

A avaliação do pH do solo nos cinco tratamentos, ao longo de 90 dias de incubação é apresentada na Figura 13. O pH inicial dos solos, dos microcosmos (tempo zero) foi similar em todos os tratamentos (pH em torno de 6,0) incluindo o solo controle. Ao longo do tempo, os valores de pH de todos os tratamentos apresentaram queda em relação ao pH inicial. Os solos contaminados com diesel apresentaram uma queda de pH, em relação ao inicial, entre 8% (T3; pH 5,73) a 13% (T2; pH 5,34), sendo que a maior variação foi observada nos microcosmos contaminados com biodiesel, os quais apresentaram uma redução variando entre 32% (T4; pH 4,02) a 42% (T5; pH 3,55).

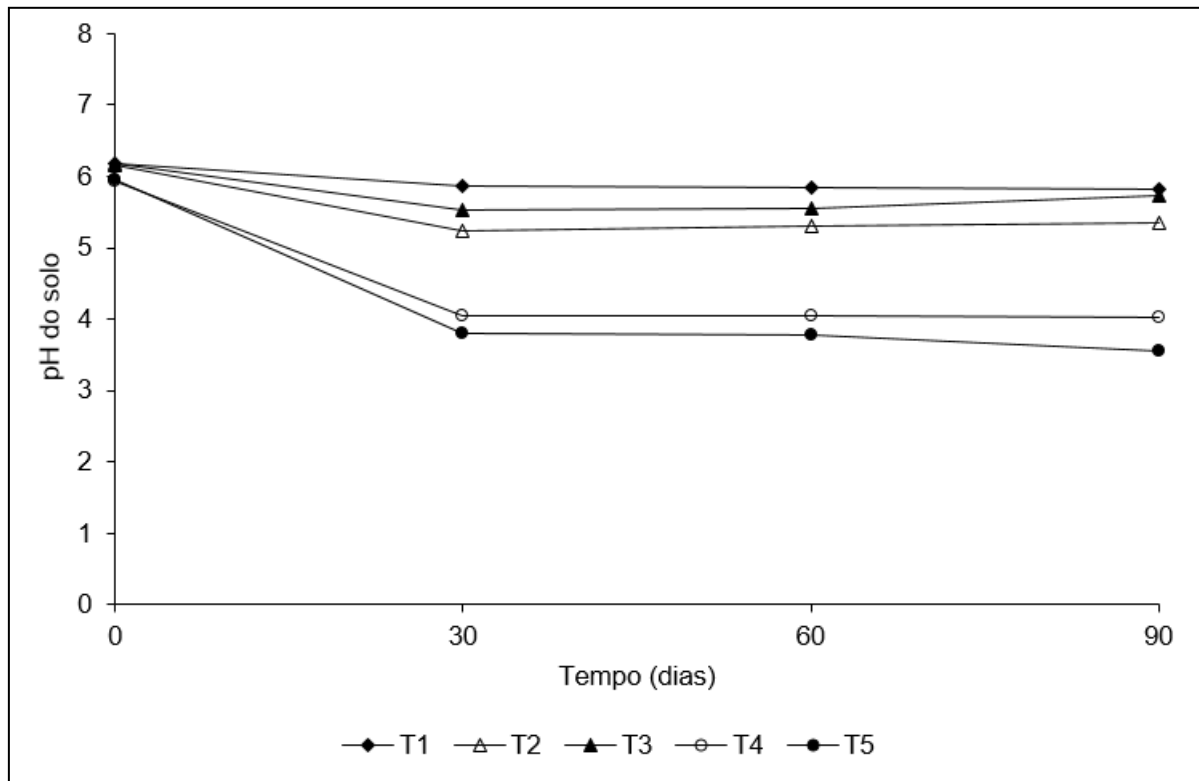


Figura 13 – pH do solo nos cinco tratamentos, ao longo de 90 dias de incubação.

4.7 AVALIAÇÃO DE FITOTOXICIDADE

O índice de germinação de sementes de alface (IG; %) referente aos tratamentos contaminados, ao longo de 90 dias de incubação, é apresentado na figura 12. Os IGs iniciais (tempo zero) das sementes de alface nos tratamentos com biodiesel foram os mais elevados, sendo maior para o tratamento T4 (41 %) em relação ao tratamento T5 (37 %). Esses valores atingiram IG zero (sem germinação) a partir da segunda avaliação (45 dias) e assim se mantiveram até o final do experimento.

No tratamento com menor percentual de diesel (T2) houve uma elevação de 50% no IG da alface após 45 dias de incubação (de 15% no tempo zero para 30%), enquanto no tratamento T3 o IG de cerca de 30% foi mantido nas duas primeiras avaliações. Após 90 dias, em ambos os tratamentos (T2 e T3) observou-se redução do IG para 15% (Figura 14).

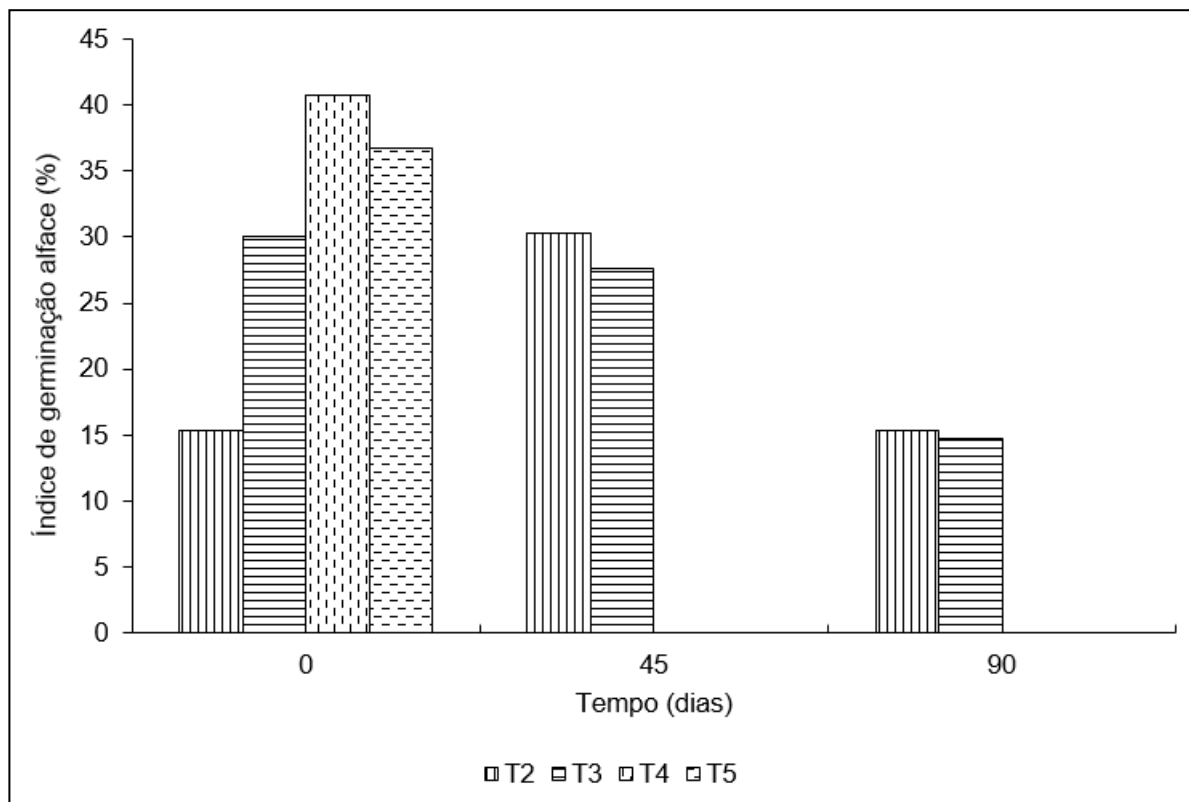


Figura 14 – Índice de germinação de sementes de alface (%) nos quatro tratamentos contaminados com diesel/biodiesel em relação ao controle, ao longo de 90 dias de incubação.

O índice de germinação de sementes de pepino (IG; %) referente aos tratamentos contaminados, ao longo de 90 dias de incubação, é apresentado na Figura 15. O IG inicial das sementes de pepino apresentou comportamento semelhante ao da alface com relação ao biodiesel, porém com valores iniciais inferiores. O tratamento com menor percentual de biodiesel (T4) apresentou IG maior do que o tratamento com maior percentual deste combustível (T5). Para ambos os tratamentos houve declínio durante a segunda avaliação (45 dias), sendo que após 90 dias de incubação T4 manteve o percentual similar ao da segunda avaliação (6%) e T5 apresentou nova redução, apresentando IG igual a zero.

Nos tratamentos com diesel pode-se observar um aumento gradual do IG. Após os 90 dias de incubação, T2 apresentou IG de aproximadamente 25% (6 vezes superior ao IG inicial). O IG em T3 também apresentou incremento, porém menos representativo (passou de 3 para 4,4%), visto que o teor de contaminante inicial era maior (Figura 15).

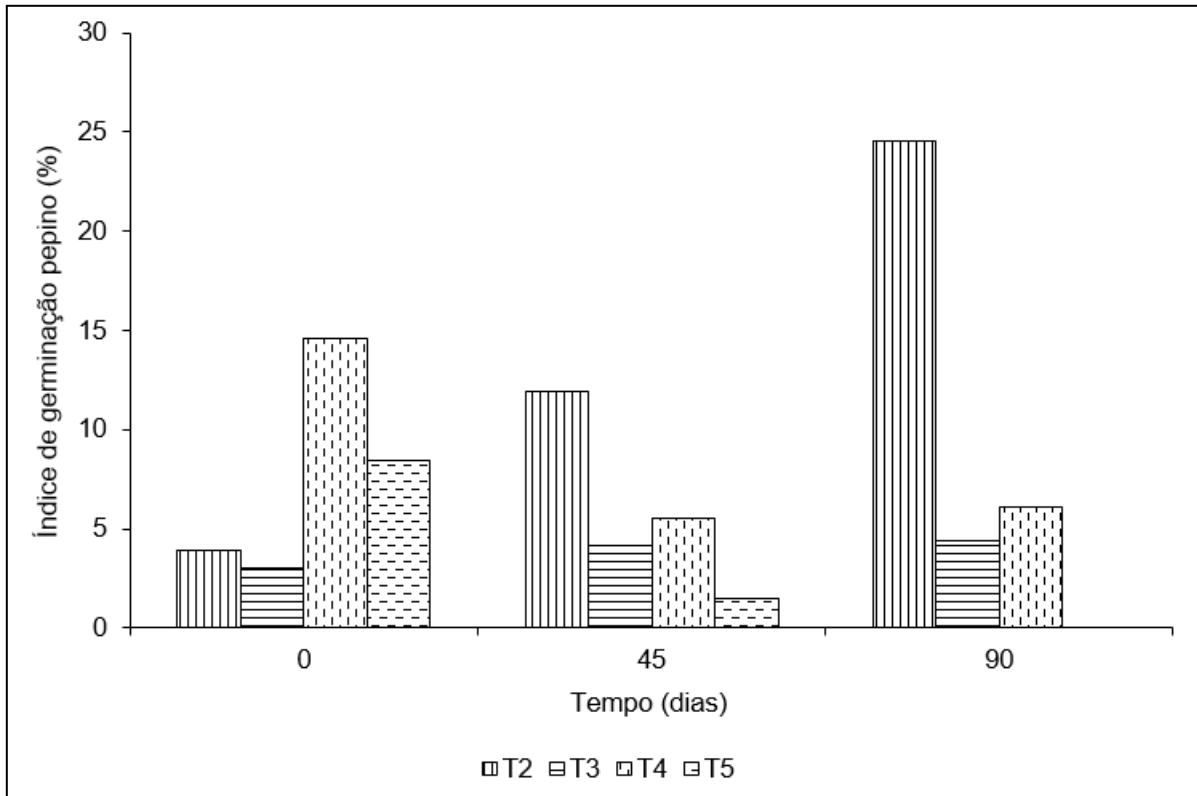


Figura 15 – Índice de germinação de sementes de pepino (%) nos quatro tratamentos contaminados com diesel/biodiesel em relação ao controle, ao longo de 90 dias de incubação.

Além do IG, também foram avaliadas a porcentagem de inibição de germinação das sementes de alface e pepino nos tratamentos contaminados em relação ao controle. As Figuras 16 e 17 apresentam os valores de inibição para ambas as sementes testadas. Com relação à inibição da germinação da alface (Figura 16), o solo do T2 apresentou redução na inibição da germinação de sementes aos 45 dias de incubação, chegando ao final do período com redução de 40% da inibição inicial. Já em T3 não houve reduções, matendo-se praticamente o mesmo percentual durante os 90 dias. Entretanto, em T4 e T5, após 45 dias de incubação, houve inibição de 100% da germinação de sementes de alface, que se seguiu até os 90 dias.

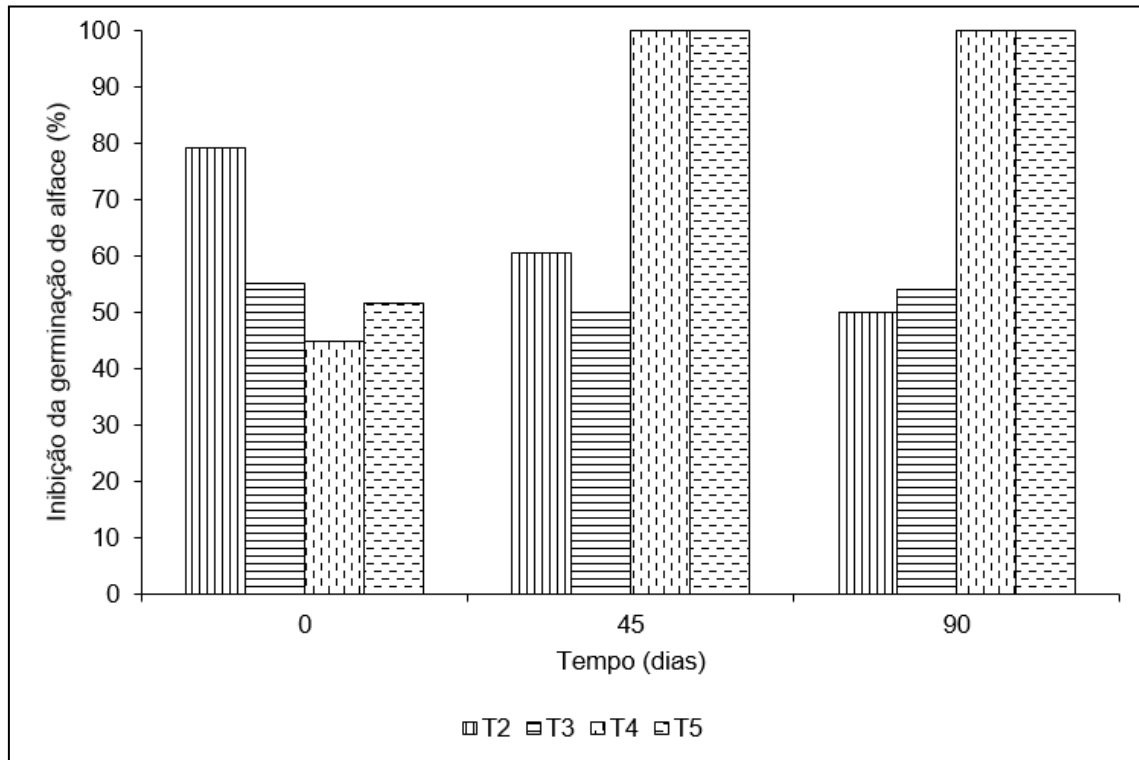


Figura 16 – Inibição de germinação de sementes de alface (%) nos quatro tratamentos contaminados com diesel/biodiesel em relação ao controle, ao longo de 90 dias de incubação.

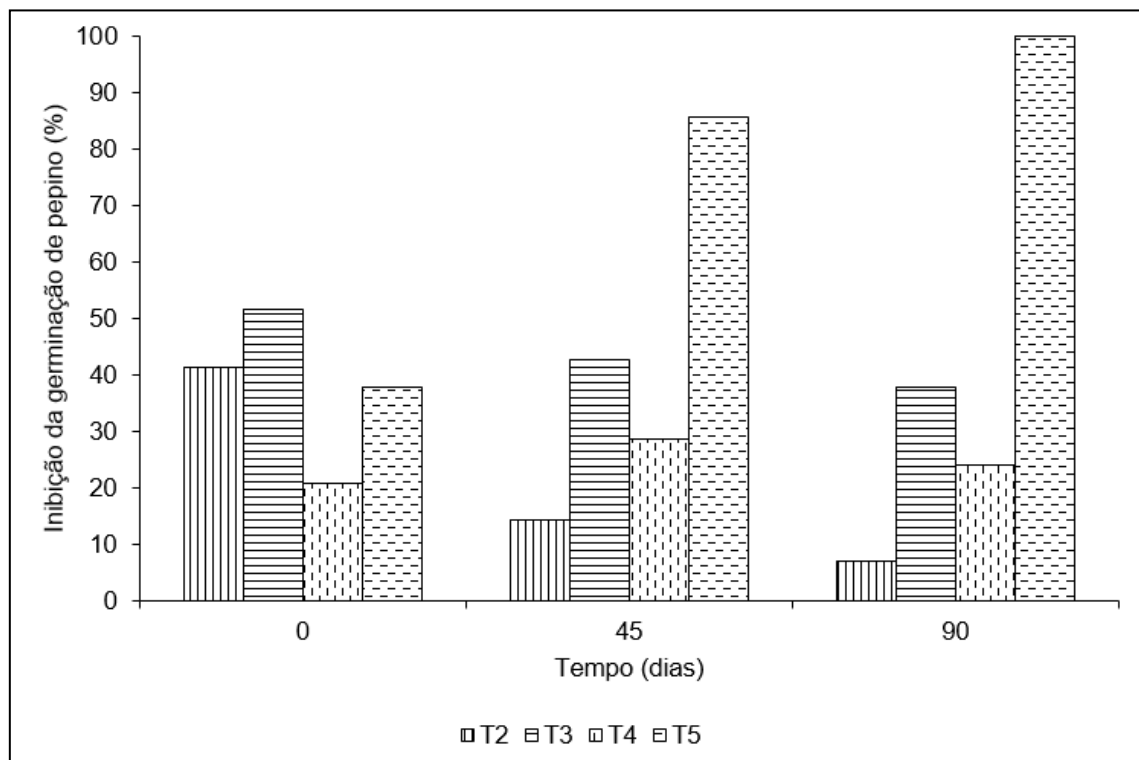


Figura 17 – Inibição de germinação de sementes de pepino (%) nos quatro tratamentos contaminados com diesel/biodiesel em relação ao controle, ao longo de 90 dias de incubação.

4.8 DEGRADAÇÃO DOS CONTAMINANTES

O óleo residual presente nos diferentes tratamentos foi extraído de amostras de solos a cada 30 dias durante a incubação dos microcosmos. O percentual de combustível extraído do solo de cada tratamento foi sempre inferior em cada amostragem sucessiva, conforme apresentado na Figura 18. O método foi padronizado em todas as extrações, na tentativa de minimizar e/ou padronizar possíveis perdas durante o processo. Os dados referentes à extração são apresentados na forma de percentuais de degradação ao longo do tempo. O biodiesel apresentou uma eficiência de extração total em torno de 95%, enquanto que o óleo diesel em torno 90%, valor esse com relação a massa aplicada durante a contaminação do solo e a massa extraída no tempo zero. A massa extraída no tempo zero foi considerada como base 100% do contaminante e a partir do qual as extrações posteriores foram calculadas.

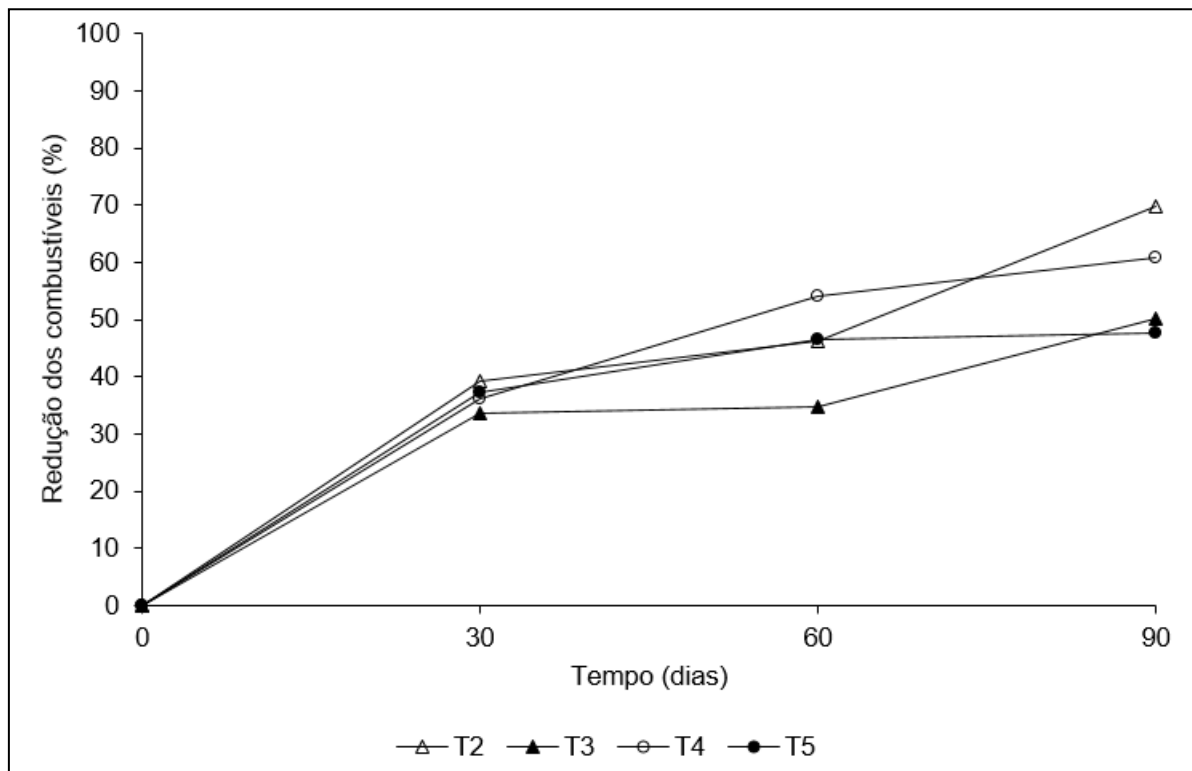


Figura 18 – Redução do teor de combustíveis (%) diesel/biodiesel extraídos dos solos contaminados, ao longo de 90 dias de incubação.

O maior percentual de redução de massa foi verificado no tratamento com menor concentração de diesel (T2), onde ocorreu uma redução de 70% do valor total

da massa inicial. O tratamento com menor concentração de biodiesel (T4) apresentou uma redução de massa de 61%, seguido pelo tratamento com maior concentração de diesel (T3; 50%) e do tratamento com maior concentração de biodiesel (T5; 48% de redução).

Os resultados obtidos relacionados redução dos combustíveis por gravimetria ao longo das amostragens foram correlacionados ao CO₂ acumulado ao longo do tempo em cada tratamento, os quais apresentaram correlação linear positiva estatisticamente significativas para T2 ($r = 0,98$, $p \leq 0.05$), para T3 ($r = 0,94$, $p \leq 0.05$) e para T4 ($r = 0,99$, $p \leq 0.05$). Não houve correlação significativa entre estes parâmetros para T5.

A redução dos teores de combustíveis também foi avaliada através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Para caráter demonstrativo e comparativo, também foram realizadas as análises cromatográficas, utilizando a mesma metodologia, dos combustíveis puros utilizados para a contaminação do solo. Abaixo são apresentados os cromatogramas de diesel (Figura 19) e biodiesel (Figura 20).

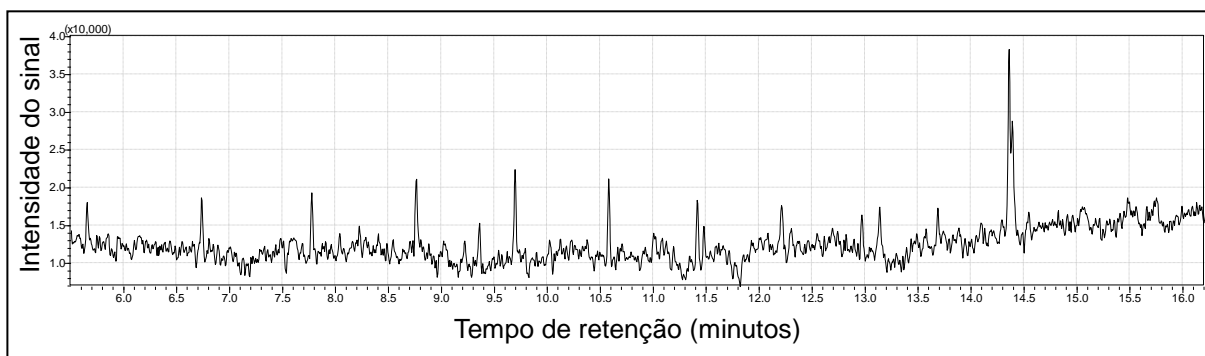


Figura 19 – Cromatograma de diesel (B8).



Figura 20 – Cromatograma de biodiesel de soja (B100).

Os cromatogramas dos combustíveis extraídos do solo dos microcosmos contaminados são apresentados de forma sobreposta, de forma que os cromatogramas referentes ao tempo zero (início) e tempo 90 dias (final) estão compondo uma única imagem para facilitar a visualização da redução de picos (compostos) nos tempos de retenção indicados. A figura 21 apresenta os cromatogramas referentes às amostras extraídas de solo contaminado com 5% de diesel (T2) e a figura 22 apresenta os cromatogramas referentes às amostras extraídas de solo contaminado com 10% de diesel (T3).

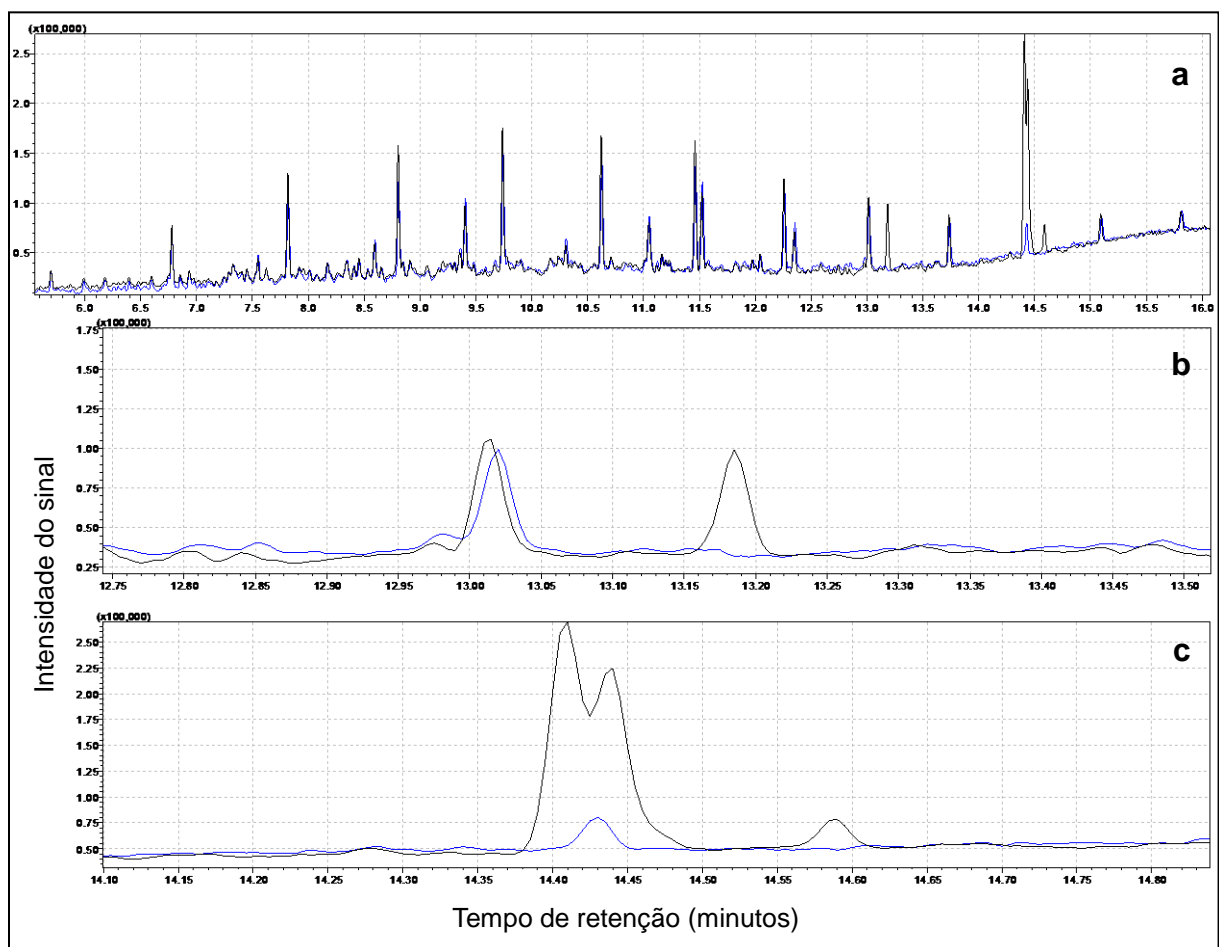


Figura 21 – Cromatogramas sobrepostos referentes às amostras extraídas do solo do tratamento com diesel 5% (T2) nos tempos 0 e 90 dias. As linhas pretas (—) representam as amostras no tempo 0 e as linhas azuis (—) as amostras no tempo 90. **a** apresenta o cromatograma completo; **b** e **c** os picos que foram totalmente reduzidos ao longo dos 90 dias de incubação (não foram mais detectados).

Os picos que apresentaram maior degradação e que não foram detectados,

em ambos os tratamentos com diesel (T2 e T3), foram os picos de retenção aos 13.185 min, 14.410 min, 14.440 min e 14.590 min. Estes quatro picos foram identificados, conforme a biblioteca interna do equipamento, como os seguintes ésteres metílicos, respectivamente: metil palmitato ($C_{17}H_{34}O_2$), metil linoleato ($C_{19}H_{34}O_2$), metil oleato ($C_{19}H_{36}O_2$) e metil estearato ($C_{19}H_{38}O_2$).

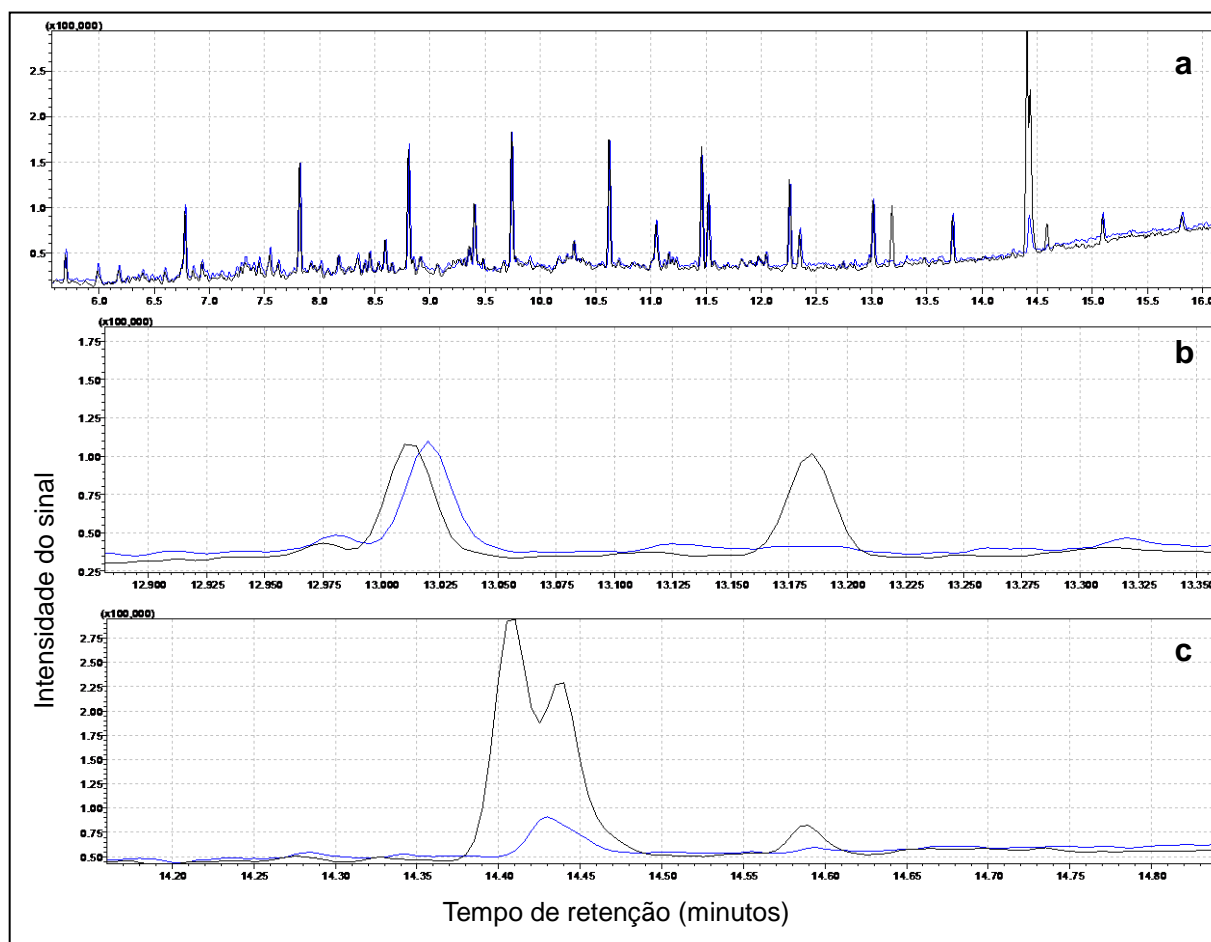


Figura 22 – Cromatogramas sobrepostos referentes às amostras extraídas do solo do tratamento com diesel 10% (T3) nos tempos 0 e 90 dias. As linhas pretas (—) representam as amostras no tempo 0 e as linhas azuis (—) as amostras no tempo 90. **a** apresenta o cromatograma completo; **b** e **c** os picos que foram totalmente reduzidos ao longo dos 90 dias de incubação.

Outros picos, com diferentes tempos de retenção, apresentaram redução, porém menos acentuadas. Os picos de retenção comuns a ambas as concentrações de diesel, além dos já citados, foram os picos nos tempos 9.740 min, 10.620 min, 11.460 min, 12.255 min, 13.015 min, e 15.090 min. Estes foram identificados pela biblioteca do equipamento como tetradecano ($C_{14}H_{30}$) pentadecano ($C_{15}H_{32}$),

hexadecano ($C_{16}H_{34}$), 7-metilpentadecano ($C_{16}H_{34}$), heptadecano ($C_{17}H_{36}$) e heneicosano ($C_{21}H_{44}$). O tratamento com diesel 5% (T2) foi o que apresentou maiores reduções das áreas dos picos, com relação ao diesel 10% (T3) conforme apresentado nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Compostos extraídos de solo contaminado com diesel 5% (T2), no início e ao término dos 90 dias de incubação (apresentadas apenas as reduções).

Tempo de retenção (min)	DIESEL 5% (compostos)	ÁREA (UD ^a)		Redução da área dos picos (%)
		0 dias	90 dias	
7.815	Dodecano ($C_{12}H_{26}$)	141002	118987	15,61
8.805	Tridecano ($C_{13}H_{28}$)	178993	139904	21,84
9.740	Tetradecano ($C_{14}H_{30}$)	184409	155051	15,92
10.620	Pentadecano ($C_{15}H_{32}$)	185882	162593	12,53
11.460	Hexadecano ($C_{16}H_{34}$)	183886	153637	16,45
12.255	7-metilpentadecano ($C_{16}H_{34}$)	125892	103429	17,84
13.015	Heptadecano ($C_{17}H_{36}$)	99587	96485	3,11
13.185	Metil palmitato ($C_{17}H_{34}O_2$)	93754	ND ^b	100,00
13.735	Octadecano ($C_{18}H_{36}$)	72950	65284	10,51
14.410	Metil linoleato ($C_{19}H_{34}O_2$)	363359	ND	100,00
14.440	Metil oleato ($C_{19}H_{36}O_2$)	283417	ND	100,00
14.590	Metil estearato ($C_{19}H_{38}O_2$)	52079	ND	100,00
15.090	Heneicosano ($C_{21}H_{44}$)	45366	31828	29,84

^a Unidades digitais. ^b Não detectado.

Tabela 4 – Compostos extraídos de solo contaminado com diesel 10% (T3), no início e ao término dos 90 dias de incubação (apresentadas apenas as reduções).

Tempo de retenção (min)	DIESEL 10% (compostos)	ÁREA (UD ^a)		Redução da área dos picos (%)
		0 dias	90 dias	
9.740	Tetradecano ($C_{14}H_{30}$)	199366	192499	3,44
10.620	Pentadecano ($C_{15}H_{32}$)	193558	186206	3,80
11.460	Hexadecano ($C_{16}H_{34}$)	188963	177465	6,08
11.520	2,7,10-trimetildodecano ($C_{15}H_{32}$)	116825	116661	0,14
12.255	7-metilpentadecano ($C_{16}H_{34}$)	135379	119946	11,40
13.015	Heptadecano ($C_{17}H_{36}$)	99475	94839	4,66
13.185	Metil palmitato ($C_{17}H_{34}O_2$)	94519	ND ^b	100,00
14.410	Metil linoleato ($C_{19}H_{32}O_2$)	413309	ND	100,00
14.440	Metil oleato ($C_{19}H_{36}O_2$)	292608	ND	100,00
14.590	Metil estearato ($C_{19}H_{38}O_2$)	57494	ND	100,00
15.090	Heneicosano ($C_{21}H_{44}$)	42157	40848	3,11

^a Unidades digitais. ^b Não detectado.

Também foi verificado que os compostos cíclicos do diesel apresentados nas análises cromatográficas não apresentaram sinais de redução/degradação durante o processo de incubação sendo eles: 1, 2, 3, 4-tetrahidro - 2, 7-dimetil naftaleno ($C_{12}H_{16}$ – 8.175 min), 4-ciclohexil dodecano ($C_{18}H_{36}$ – 9.360 min) e 5-ciclohexil eicosano ($C_{26}H_{52}$ – 10.310 min).

A figura 23 apresenta os cromatogramas referentes às amostras extraídas de solo contaminado com 5% biodiesel (T4) extraídas do solo, e a figura 24 apresenta os cromatogramas referentes às amostras extraídas de solo contaminado com 10% biodiesel 10% (T5).

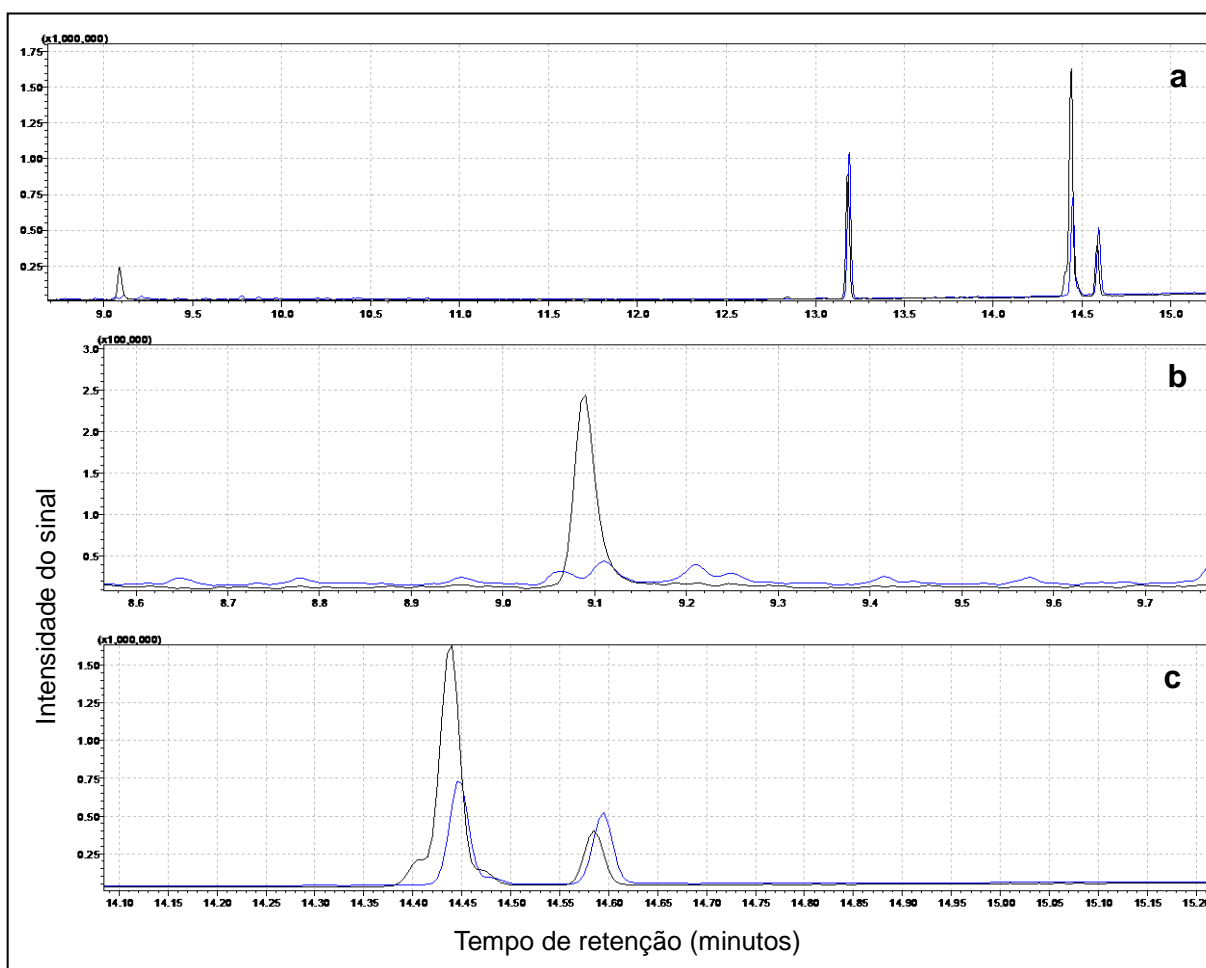


Figura 23 – Cromatogramas sobrepostos referentes às amostras extraídas do solo do tratamento com biodiesel 5% (T4) nos tempos 0 e 90 dias. As linhas pretas (—) representam as amostras no tempo 0 e as linhas azuis (—) as amostras no tempo 90. **a** apresenta o cromatograma completo; **b** e **c** os picos que foram totalmente ou parcialmente reduzidos ao longo dos 90 dias de incubação.

Com relação às amostras extraídas do solo contaminado com biodiesel, os picos de retenção relacionados à degradação dos compostos apresentaram comportamento similar. O pico que apresentou maior degradação, e que não foi detectado em T4 e T5 foi observado aos 14.410 min. Outro pico que não foi mais detectado em T4 e foi amplamente reduzido em T5, foi aquele observado aos 9.090 min. Estas substâncias foram identificadas como sendo metil linoleato ($C_{19}H_{32}O_2$) e 9-oxononanoato de metila ($C_{10}H_{18}O_3$), respectivamente, segundo a biblioteca interna do equipamento.

Outro pico que apresentou redução foi aos 14.440 min, sendo identificado como metil oleato ($C_{19}H_{36}O_2$). Em ambos os tratamentos ocorreu o aumento de dois picos no tempo 90 dias (final), com relação ao tempo zero (inicial). Esses picos foram registrados nos tempos 13.185 e 14.585 e foram identificados como metil palmitato ($C_{17}H_{34}O_2$) e metil estearato ($C_{19}H_{38}O_2$).

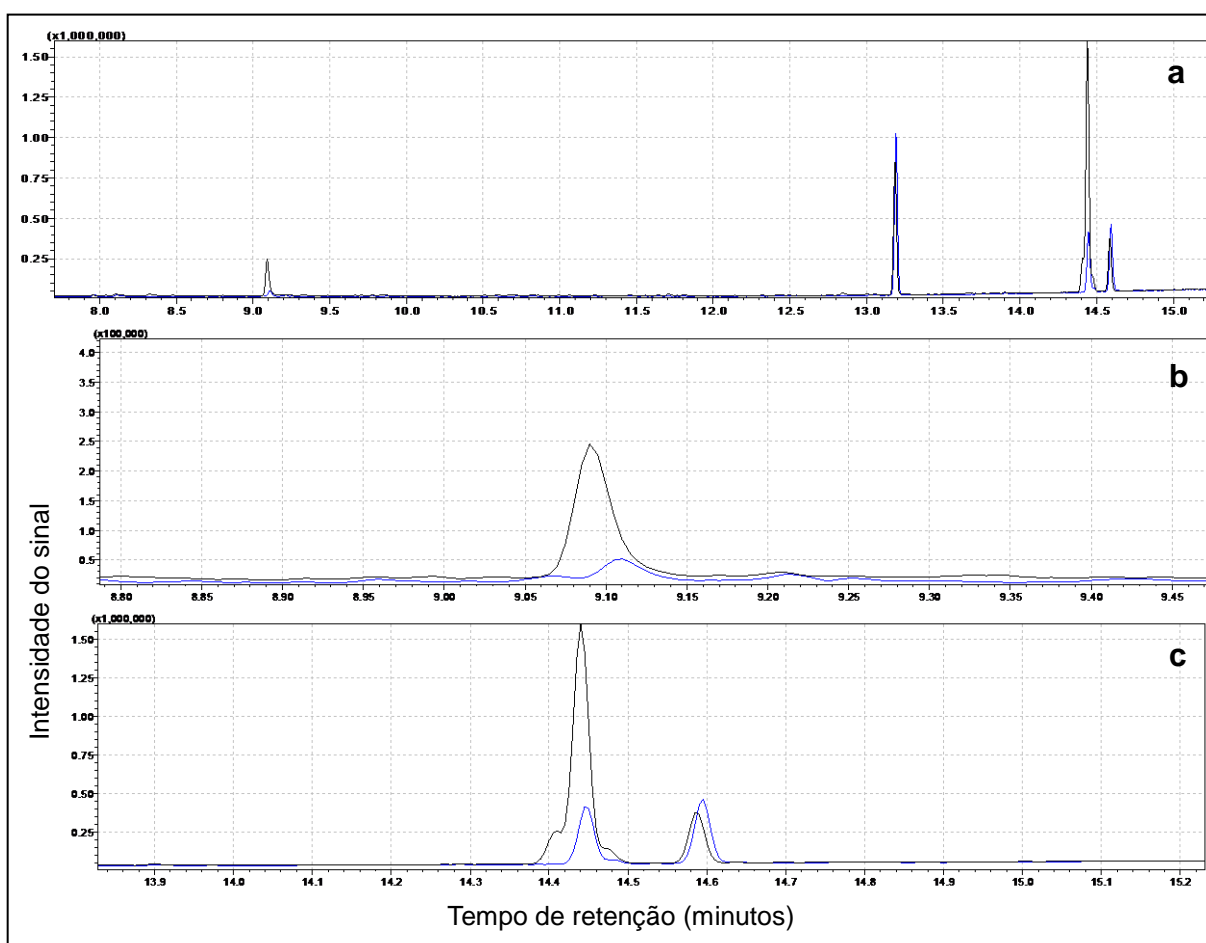


Figura 24 – Cromatogramas sobrepostos referentes às amostras extraídas do solo do tratamento com biodiesel 10% (T3) nos tempos 0 e 90 dias. As linhas pretas (—) representam as amostras no tempo 0 e as linhas azuis (—) as amostras no

tempo 90. **a** apresenta o cromatograma completo; **b** e **c** os picos que foram totalmente ou parcialmente reduzidos ao longo dos 90 dias de incubação.

As Tabelas 5 e 6 apresentam a identificação dos compostos extraídos do solo contaminado com 5% e 10% de biodiesel, respectivamente, e o percentual de redução/aumento das áreas relativas aos picos detectados.

Tabela 5 – Compostos extraídos de solo contaminado com biodiesel 5% (T4), no início e ao término dos 90 dias de incubação.

Tempo de retenção (min)	BIODIESEL 5% (compostos)	ÁREA (UD ^a)		Redução da área dos picos (%)
		0 dias	90 dias	
9.090	9-oxononanoato de metila (C ₁₀ H ₁₈ O ₃)	394359	ND ^b	100
13.185	Metil palmitato (C ₁₇ H ₃₄ O ₂)	1248549	1419178	↑ ^c 13,67
14.410	Metil linoleato (C ₁₉ H ₃₂ O ₂)	84536	ND	100
14.440	Metil oleato (C ₁₉ H ₃₆ O ₂)	2719068	1051116	61,34
14.585	Metil estearato (C ₁₉ H ₃₈ O ₂)	524318	680612	↑ 29,81

^a Unidades digitais. ^b Não detectado. ^c Símbolo para aumento.

Tabela 6 – Compostos extraídos de solo contaminado com biodiesel 10% (T5), no início e ao término dos 90 dias de incubação.

Tempo de retenção (min)	BIODIESEL 10% (compostos)	ÁREA (UD ^a)		Redução da área dos picos (%)
		0 dias	90 dias	
9.090	9-oxononanoato de metila (C ₁₀ H ₁₈ O ₃)	382225	53461	86,01
13.185	Metil palmitato (C ₁₇ H ₃₄ O ₂)	1160505	1409133	↑ ^c 21,42
14.410	Metil linoleato (C ₁₉ H ₃₂ O ₂)	73570	ND ^b	100
14.440	Metil oleato (C ₁₉ H ₃₄ O ₂)	2663757	572244	78,52
14.585	Metil estearato (C ₁₉ H ₃₈ O ₂)	473915	586875	↑ 23,84

^a Unidades digitais. ^b Não detectado. ^c Símbolo para aumento.

Interpretação complementar surge da avaliação em relação ao tempo com que cada substância foi completamente degradada. No tratamento com 5% de diesel (T2) os metil palmitato, metil linoleato e metil estearato não foram mais detectados nas cromatografias a partir dos 30 dias de incubação dos microcosmos, enquanto que o metil oleato somente não foi detectado após os 90 de incubação. Em relação ao tratamento com 10% de diesel (T3) os metil linoleato e estearato também não foram mais detectados após 30 dias de incubação; no entanto, para os metil

palmitato e oleato, somente após 90 de incubação tal fato foi observado.

Quanto aos tratamentos com biodiesel, apenas um dos compostos, o metil linoleato ($C_{19}H_{32}O_2$), foi completamente degradado em ambos os tratamentos (T4 e T5) o qual não foi mais detectado nas cromatografias após 30 dias de incubação e apenas em T4 o 9-oxononanoato de metila ($C_{10}H_{18}O_3$) não foi mais detectado após 90 dias de incubação do solo nos microcosmos.

4.9 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DOS MICROCOSMOS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DEGRADADORA

Os resultados das análises de liberação cumulativa de CO_2 , atividade da desidrogenase, enumeração de degradadores, fitotoxicidade e análises de degradação dos contaminantes (por gravimetria e cromatografias) durante o período de incubação destacaram a capacidade da microbiota autóctone do solo em degradar diesel e biodiesel. O isolamento dos microrganismos foi realizado com o objetivo de selecionar potenciais bactérias, de forma individual (linhagens puras), e assim avaliar a capacidade de degradação de cada um dos isolados.

Para tanto, após 90 dias de incubação dos microcosmos contaminados com diesel e biodiesel, colônias bacterianas foram isoladas em culturas puras. O tratamento com a maior concentração de biodiesel (T5) não apresentou crescimento bacteriano em nenhuma diluição, não tendo sido possível obter isolados desse tratamento. Todos os demais tratamentos (T2, T3 e T4) apresentaram, em diferentes escalas, crescimento bacteriano.

Este procedimento resultou em 10 isolados bacterianos diferentes para o solo contaminado com biodiesel (T4) e 24 isolados bacterianos diferentes para diesel (sendo 12 isolados a partir de T2 e 12 isolados a partir de T3). Os 34 isolados bacterianos foram caracterizados quanto à morfologia celular e o perfil tintorial de Gram (Tabelas 7 e 8). Dos 34 isolados avaliados a maioria apresentou perfil tintorial gram-negativo (65%) e morfologia do tipo coco (59%).

Tabela 7 – Morfologia e perfil tintorial de Gram de isolados bacterianos de biodiesel.

Isolado	Morfologia	Gram^a	Isolado	Morfologia	Gram
B1	Coco	G -	B6	Coco	G -
B2	Coco	G +	B7	Bastonete	G +
B3	Coco	G -	B8	Coco	G -
B4	Coco	G -	B9	Coco	G -
B5	Coco	G -	B10	Coco	G -

^a G + = Gram-positivo; G - = Gram-negativo.

Tabela 8 – Morfologia e perfil tintorial de Gram de isolados bacterianos de diesel.

Isolado	Morfologia	Gram^a	Isolado	Morfologia	Gram
D1	Coco	G +	D13	Coco	G -
D2	Bastonete	G -	D14	Bastonete	G -
D3	Bastonete	G +	D15	Coc	G -
D4	Coco	G +	D16	Coco	G +
D5	Bastonete	G +	D17	Bastonete	G -
D6	Bastonete	G +	D18	Bastonete	G -
D7	Bastonete	G +	D19	Bastonete	G -
D8	Bastonete	G +	D20	Coco	G -
D9	Coco	G +	D21	Coco	G -
D10	Coco	G -	D22	Bastonete	G -
D11	Coco	G +	D23	Bastonete	G -
D12	Coco	G -	D24	Bastonete	G -

^a G + = Gram-positivo; G - = Gram-negativo.

A capacidade de degradação dos isolados bacterianos, conforme o respectivo tratamento do qual o isolado foi obtido (diesel ou biodiesel), foi avaliada inicialmente através do crescimento celular a partir da inoculação individual de cada isolado em meio mineral Bushnell Haas adicionado de TTC e contendo o combustível (10%) como único substrato orgânico. As incubações foram realizadas a 30 °C por 10 dias e monitoradas diariamente.

As Tabelas 9 e 10 apresentam os resultados obtidos neste teste de biodegradação para os isolados de biodiesel e diesel, respectivamente. Todos os 10 isolados bacterianos provenientes dos microcosmos com biodiesel apresentaram a capacidade de degradação do combustível, através do teste utilizado. Os 10 isolados reduziram o indicador TTC nos dois primeiros dias de incubação (Tabela 9).

Tabela 9 – Avaliação de 10 isolados bacterianos, obtidos a partir de tratamento com biodiesel (T4), quanto à potencial utilização de componentes deste combustível como substratos orgânicos^a.

Isolado	Degradação^b	Isolado	Degradação
B1	++	B6	++
B2	++	B7	++
B3	++	B8	++
B4	++	B9	++
B5	++	B10	++

^a Testes realizados em meio mineral contendo o indicador redox TTC e 10% de biodiesel.

^b Tempo de incubação necessário para mudança de coloração do TTC. -: sem mudança; ++: mudança de coloração até o 5º dia de incubação; +: mudança de coloração do 6º ao 10º dia de incubação.

Dos 24 isolados bacterianos obtidos a partir de microcosmos contaminados com diesel, 20 apresentaram capacidade de degradação através do teste utilizado. Destes, 11 isolados reduziram o indicador TTC nos cinco primeiros dias de incubação, enquanto os outros 9 isolados até o 10º dia (Tabela 10).

Tabela 10 – Avaliação de 24 isolados bacterianos, obtidos a partir de tratamentos com diesel (T2 e T3), quanto à potencial utilização de componentes deste combustível como substratos orgânicos^a.

Isolado	Degradação^b	Isolado	Degradação
D1	-	D13	++
D2	+	D14	++
D3	-	D15	++
D4	+	D16	++
D5	+	D17	+
D6	+	D18	++
D7	+	D19	+
D8	-	D20	++
D9	+	D21	++
D10	++	D22	++
D11	+	D23	++
D12	++	D24	-

^a Testes realizados em meio mineral contendo o indicador redox TTC e 10% de diesel.

^b Tempo de incubação necessário para mudança de coloração do TTC. -: sem mudança; ++: mudança de coloração até o 5º dia de incubação; +: mudança de coloração do 6º ao 10º dia de incubação.

4.9.1 Avaliação da capacidade de produção de biossurfactantes e hidrofobicidade celular

Os 34 isolados bacterianos foram submetidos a ensaios para verificar a capacidade de produção de biossurfactantes, após cultivos realizados com cada isolado bacteriano em meio mineral Bushnell Haas contendo combustível (biodiesel ou diesel) como substrato orgânico. O método avalia a formação de emulsões quando adicionado tolueno (hidrocarboneto). A partir dos resultados obtidos foram calculados os Índices de Emulsificação (IE₂₄) que são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Índice de emulsificação (IE₂₄), na presença ou ausência de células bacterianas, após 10 dias de cultivo em meio contendo biodiesel (B) ou óleo diesel (D) como único substrato orgânico.

Isolados	IE (24h)		Isolados	IE (24h)	
	Com Células	Sem Células		Com Células	Sem Células
B1	65,70 ± 3,74	65,93 ± 0,99	D8	ND	ND
B2	ND ^a	ND	D9	ND	ND
B3	66,59 ± 0,63	67,37 ± 3,69	D10	64,44 ± 4,98	58,83 ± 7,19
B4	66,53 ± 0,67	61,49 ± 1,76	D11	ND	ND
B5	69,70 ± 0,45	66,14 ± 2,50	D12	60,85 ± 4,06	ND
B6	65,25 ± 2,87	61,68 ± 0,39	D13	46,91 ± 2,05	ND
B7	52,66 ± 0,79	61,91 ± 1,37	D14	74,91 ± 0,60	64,17 ± 3,34
B8	64,61 ± 0,60	61,92 ± 0,61	D15	61,33 ± 0,47	ND
B9	66,77 ± 0,33	30,45 ± 3,88	D16	ND	ND
B10	67,44 ± 0,91	35,11 ± 3,53	D17	ND	ND
D1	ND	ND	D18	ND	ND
D2	ND	ND	D19	ND	ND
D3	ND	ND	D20	58,49 ± 4,29	ND
D4	ND	ND	D21	63,99 ± 0,06	ND
D5	ND	ND	D22	73,28 ± 0,65	ND
D6	ND	ND	D23	62,70 ± 3,57	58,98 ± 2,15
D7	ND	ND	D24	ND	ND

^a Não detectado.

Dos 10 isolados do tratamento com biodiesel, nove apresentaram resultados positivos para a produção de biossurfactantes na presença e na ausência de células. Estes nove isolados apresentaram índice acima de 50% na presença de células (Tabela 11). Para os 24 isolados bacterianos obtidos dos tratamentos com diesel,

também nove apresentaram resultados positivos para a produção de biossurfactantes associados às células, sendo três deles positivos também quando avaliado somente o sobrenadante (ausência de células).

Os índices mais elevados foram encontrados para isolados de tratamentos com diesel, que apresentaram IE₂₄ acima de 70% (isolados D14 e D22). Todos os 18 isolados bacterianos produtores de biossurfactantes apresentaram produção acima de 40% na presença de células e destes, 10 apresentaram produção acima de 40% na ausência de células.

Visto que ambos os combustíveis avaliados são hidrofóbicos, a hidrofobicidade celular pode ser avaliada indiretamente através da adesão bacteriana a hidrocarbonetos. Foram avaliados somente os isolados que apresentaram crescimento celular em meio mineral Bushnell Haas com combustível após 10 dias de incubação.

Os resultados desta análise para os isolados bacterianos são apresentados na Figura 25. Os valores variaram conforme os isolados e, para um mesmo isolado, diferentes percentuais de adesão foram observados conforme o hidrocarboneto empregado no teste.

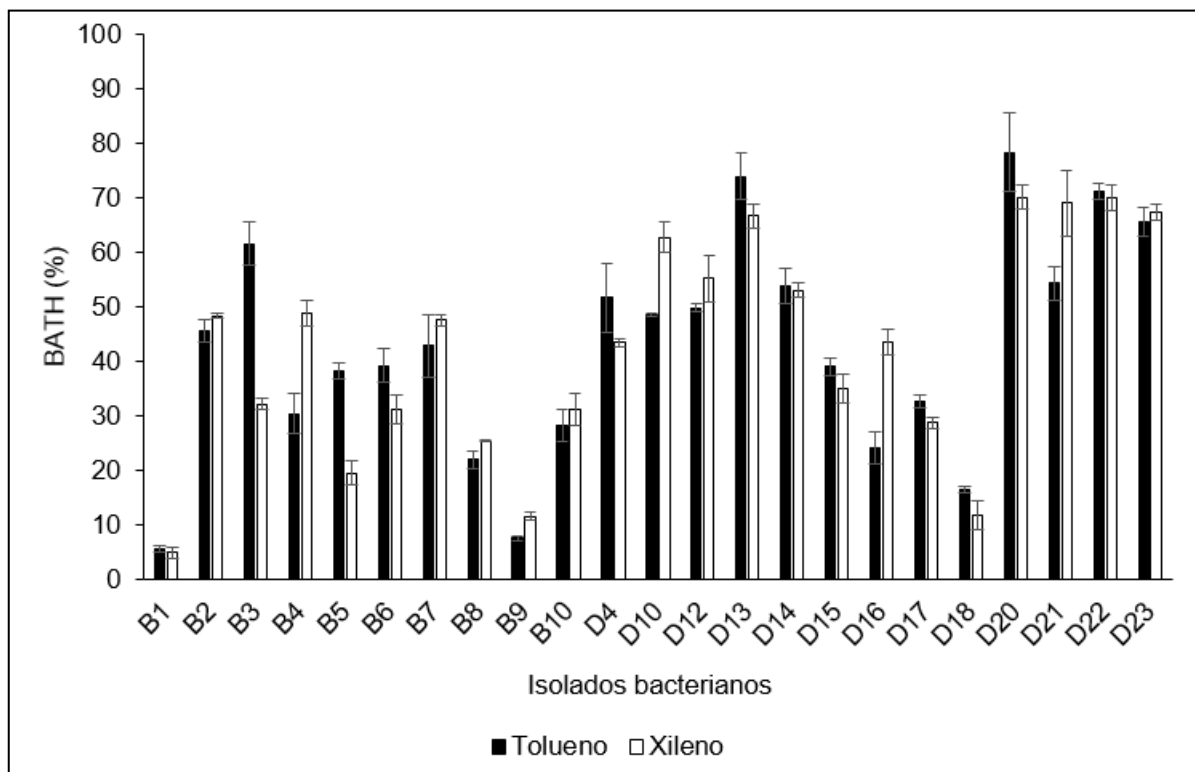


Figura 25 – Adesão bacteriana a hidrocarbonetos (BATH; %), determinada utilizando tolueno e xileno, após 10 dias de cultivo dos isolados em meio contendo biodiesel (B)

ou óleo diesel (D).

Em geral, a adesão foi maior quando o cultivo ocorreu em óleo diesel. No entanto, parte dos isolados cultivados em biodiesel apresentou maiores percentuais do que alguns dos isolados cultivados em diesel. Os percentuais de adesão dos isolados de microcosmos contaminados com diesel variaram entre 17 a 78%, enquanto que os isolados de microcosmos contaminados com biodiesel variaram entre 6 a 61%, contabilizando os valores mais elevados independente do hidrocarboneto utilizado no teste (tolueno ou xileno) (Figura 25).

5 DISCUSSÃO

5.1 COMPORTAMENTO DOS PARÂMETROS DA MICROBIOTA, pH, DEGRADAÇÃO DE COMBUSTÍVEIS E FITOTOXICIDADE EM MICROCOSMOS

Condições ambientais como temperatura, pH, fontes de carbono e energia afetam a atividade microbiana e podem modificar a ecologia e dinâmica da população de microrganismos no solo, pois modificam o habitat (NANNIPIERI et al., 2003). Temperaturas desfavoráveis podem retardar ou inibir o crescimento e o metabolismo da microbiota local, resultando em redução da eficiência do processo de biodegradação e, conseqüentemente, na persistência desse resíduo por períodos mais longos (CERQUEIRA et al., 2014).

A temperatura de incubação durante os 90 dias de experimento foi monitorada, apresentando média mínima de $20^{\circ}\text{C} \pm 2,51^{\circ}\text{C}$ e máxima de $24^{\circ}\text{C} \pm 2,51^{\circ}\text{C}$. Essa temperatura foi condizente com o indicado como temperatura ótima para a biodegradação de hidrocarbonetos de óleo mineral em climas temperados, que se encontra na faixa de 20°C a 30°C (ATLAS; BARTHA, 1992).

A atividade respiratória, mensurada através da liberação de CO_2 é uma medida indireta utilizada para avaliar a atividade microbiana no solo (MEYER et al., 2015). Visto que os combustíveis disponíveis no solo podem ser usados como fonte de energia, e a energia produzida através da respiração pode ser utilizada para o crescimento microbiano (LAPINSKIENÉ et al., 2006).

O maior acúmulo de CO_2 verificado nos microcosmos contaminados com combustível em relação ao controle (Figura 5) já foi constatado em diversos estudos. Labud et al. (2007) observaram maior liberação acumulada de CO_2 em solo argiloso com concentrações de 5 e 10% de diesel, do que em relação ao do solo controle (sem contaminação). Ainda, maior respiração foi reportada por Colla et al. (2014) em solo contaminado pela mistura B10 (diesel contendo 10% de biodiesel) do que em solo sem contaminação. Quadros et al. (2016) em experimento utilizando lodo oleoso petroquímico (6%), também verificaram maior taxa de respiração nos solos contaminados.

Tal comportamento também foi evidenciado em outros tipos de solos/substratos. Mercado et al. (2015) em estudo realizado em solo com textura arenosa contaminado com B10, observaram a respiração duas vezes maior nos

solos contaminados do que em solo sem contaminação. Lisiecki et al. (2014), em experimento realizado em areia com diferentes concentrações de diesel/biodiesel, variando de B0 a B100, verificaram que o CO₂ acumulado aumentou proporcionalmente conforme o aumento da concentração de biodiesel na mistura, chegando a ser três vezes maior a respiração em B100 do que em B0.

O incremento da atividade respiratória foi relacionado ao aumento da concentração do combustível, ou seja, em solos com o mesmo combustível, porém em diferentes concentrações, maior quantidade de CO₂ tende a acumular conforme a concentração do combustível aumenta (LABUD et al., 2007). Cerqueira et al. (2014) constataram maior respiração em solos argilosos, contaminados com lodo oleoso petroquímico em duas concentrações (1,5 e 6,0%), sendo que o aumento da respiração também foi proporcional ao aumento do contaminante utilizado.

Meyer et al. (2015) observaram comportamento similar em solo argiloso contaminado com diesel, biodiesel e suas misturas, em comparação com solos não contaminados. No entanto, estes autores reportaram maior quantidade de CO₂ acumulado nos tratamentos com biodiesel, e esse valor se elevou à medida que o teor de biodiesel aumentou na mistura. Lapinskiené et al. (2006) também relataram processo de respiração mais intenso em amostras de solo contaminadas com biodiesel do que em amostras de solo contaminadas com diesel, assim como Mariano et al. (2008). Esses comportamentos são opostos ao apresentado no presente trabalho, visto que foi observado um maior teor de CO₂ liberado a partir dos tratamentos com diesel (B8) do que nos tratamentos com biodiesel (B100) (Figura 5).

Os aumentos na respiração observados nos solos poluídos sugerem que os microrganismos resistentes à potencial toxicidade dos compostos foram capazes de degradar essas novas fontes de carbono. O aumento da atividade microbiana também pode ser causado pela morte dos microrganismos sensíveis durante o primeiro impacto do óleo e sua subsequente mineralização, bem como por uma resposta de estresse à contaminação (LABUD et al., 2007).

No início da incubação, maior respiração acumulada foi observada em T4 e T5 do que em T2 e T3. Contudo, depois de 20 dias, maior liberação acumulada de CO₂ foi detectada nos solos contaminados com diesel do que com biodiesel (Figura 5). A menor quantidade de CO₂ acumulada nos tratamentos com biodiesel, em relação ao diesel, pode ser devida à diminuição no número de microrganismos, corroborada pela redução do carbono da biomassa microbiana. Componentes

gerados durante ou por causa de degradação do biodiesel podem apresentar maior efeito inibidor sobre microrganismos do que os compostos originais (CRUZ et al. 2013a); contudo os resultados de microrganismos heterotróficos totais (Figura 10) e degradadores (Figura 12), oito dias após o impacto inicial da contaminação com biodiesel, aparentemente não suportam esta hipótese.

O biodiesel é considerado um composto menos tóxico e mais biodegradável do que o diesel (BALAT, 2006). No entanto a presença de óleos vegetais pode reduzir o pH do solo, devido a sua degradação que resulta na produção de ácidos. Gong et al. (2008) relataram que quanto maior o teor de óleo vegetal, menor o pH do solo. Segundo os autores, a falta de nutrientes e o acúmulo do óleo não degradado no solo resultou na queda do pH, visto que em solos onde foram adicionados nutrientes não ocorreu queda do pH.

O pH do solo é fator importante no controle e manutenção dos processos biológicos, sendo que a faixa de pH necessária para a melhor atividade da microbiota está entre 5,5 e 8,8 (MEYER et al., 2015). Nos microcosmos controle, o pH do solo se manteve próximo a 6 durante toda a incubação, enquanto que o pH dos solos com diesel se mantiveram próximos a 5,5 (T2) e 5,7 (T3). Já os solos tratados com biodiesel sofreram acidificação durante o processo de incubação, que foi intensificada no decorrer do tempo, principalmente para a maior concentração de biodiesel (T5) que atingiu pH de 3,5 (Figura 13). De fato, o pH do solo está diretamente correlacionado com a atividade da microbiota. Rousk et al. (2009) verificaram que a diminuição do pH (entre 4,0 e 4,5) causou uma redução de cinco vezes no crescimento bacteriano, o que também reduziu a respiração (mineralização total de carbono) em mais de 50% em relação àquela observada em pH 7,0.

Os produtos gerados pela (bio)degradação do biodiesel podem ter causado a redução do pH do solo (Figura 13). Metabólitos microbianos, como ácidos orgânicos, podem reduzir o pH; contudo, este fenômeno também pode ser provocado por lise celular, e por ácidos orgânicos e ácidos graxos livres gerados pela degradação abiótica do diesel e, particularmente, do biodiesel (LEUNG et al., 2006; SCHLEICHER et al., 2011; BÜCKER et al., 2011; ZULETA et al., 2012). Restrepo-Flórez et al. (2013) observaram acidificação de meio mineral contendo B100, de pH 6,5 no início dos ensaios para pH 3,5 após 200 dias. A acidificação foi menos pronunciada com outras misturas de diesel/biodiesel (B25-B75), e leve alcalinização do meio foi reportada em B0 (diesel puro). Estes autores indicaram que a queda do

pH foi provavelmente provocada pela produção de ácidos de baixa massa molecular pelo metabolismo microbiano. A queda do pH pode estar relacionada, diretamente, à diminuição de populações e biomassa microbianas o que, indiretamente, provocou a redução da liberação de CO₂ nos microcosmos contendo biodiesel.

Após 90 dias de incubação, apesar da respiração diária ter reduzido, os microcosmos ainda não apresentavam sinais de tendência a estabilização da respiração acumulada, diferentemente de Cerqueira et al. (2014) onde a estabilização ocorreu em um período de 30 dias de incubação em solos contaminados por lodo oleoso petroquímico. Uma diminuição nos valores respiratórios conforme o tempo decorrido pode indicar o consumo dos substratos disponíveis no solo para ataque pela microbiota (LABUD et al., 2007).

As atividades enzimáticas vêm sendo consideradas como parâmetros para avaliar e monitorar a remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos. São diversas as atividades enzimáticas propostas para avaliação e monitoramento de solos contaminados por hidrocarbonetos (ALRUMMAN et al., 2015). O FDA, um substrato fluorogênico clivado por diferentes enzimas microbianas, predominantemente extracelulares, presentes no solo, tem sido considerada uma medida da atividade enzimática do solo (ANDREONI et al., 2004).

Os dados do presente estudo mostraram uma maior atividade da hidrólise do FDA, do início ao final do experimento, no solo controle, em detrimento aos solos contaminados (Figura 6). Em contrapartida, Margesin et al. (2000a) verificaram que a presença de óleo diesel resultou em uma hidrólise do FDA significativamente aumentada em relação aos controles não contaminados. A hidrólise do FDA foi indicativa do início da biodegradação do óleo; porém, a atividade não diminuiu após a redução da biodegradação.

Shahsavari et al. (2013a,b) também encontraram maiores valores de atividade hidrolítica em solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo (1%) do que em solo sem contaminação, após 90 dias de experimento. Contudo, a atividade hidrolítica de FDA não se demonstrou adequada como indicadora da atividade microbiana envolvida na biorremediação de diesel neste estudo (SHAHSVARI et al., 2013a). Em outra investigação, Margesin et al. (2003) não observaram correlação entre o teor de hidrocarbonetos totais de petróleo e atividade de enzimas hidrolíticas (lipase e hidrólise de FDA).

No que se refere à biodegradação do biodiesel, como esse processo pode

iniciar pela hidrólise de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos pela ação de lipases ou esterases (BOCZAR et al., 2001), a análise dessa atividade hidrolítica poderia fornecer dados indiretos relacionados à biodegradação destes compostos. Contudo, Meyer et al. (2015) relataram que, à medida que a concentração de biodiesel na mistura diesel/biodiesel aumentou (de 0 a 100%), a atividade de hidrólise de FDA diminuiu. Nas menores concentrações, a adição de diesel ao solo possivelmente estressou a microbiota nativa, estimulando a produção da enzima na tentativa de degradar os xenobióticos e assim apresentando uma maior atividade no diesel (B0) e nas misturas (B5 e B20). Estes autores sugeriram que os resultados obtidos pela análise da hidrólise do FDA em tratamento com B100 em solos teriam apontado a impossibilidade de uso deste parâmetro como indicador da degradação dos contaminantes, pois, possivelmente, a presença do biodiesel havia interferido na detecção da atividade enzimática com o substrato FDA.

De forma similar à presente investigação, Miethe et al. (1994) encontraram valores relacionados a hidrólise do FDA nitidamente inferiores (chegando a ser 10 vezes menores) em solos contaminados com óleo diesel do que em solos não contaminados. O diesel também inibiu a hidrólise do FDA em solos da Antártida quando comparada à atividade na ausência de contaminação, em experimentos realizados a 4 °C e 10 °C (HAN et al., 2012).

Mesmo em níveis moderados de contaminação, hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos apolares podem causar declínio significativo na atividade de várias enzimas do solo, indicando que cada enzima pode apresentar sensibilidade diferente à presença de poluentes. Estes compostos podem ser tóxicos para os microrganismos, o que pode refletir em atividade enzimática reduzida e/ou recobrirem superfícies orgânicas, minerais e celulares, dificultando assim a interação entre os sítios ativos das enzimas e os substratos solúveis, com efeito adverso sobre expressão da atividade enzimática (ANDREONI et al., 2004; LI et al., 2007). Por outro lado, o aumento da população microbiana nem sempre resulta na elevação da hidrólise de FDA e, ainda, esta atividade pode não estar relacionada à eficiência da biodegradação dos hidrocarbonetos (MA et al., 2015).

Em relevante contribuição, Song e Bartha (1990) reportaram inibição da hidrólise de FDA em solo contaminado com combustível de aviação, sendo que este efeito inibitório perdurou por 18 semanas; contudo, a adição do combustível resultou em incremento nas contagens de bactérias. Considerando que o FDA é clivado por

esterases e outras enzimas hidrolíticas, pode ocorrer uma competição entre produtos da biodegradação e o substrato enzimático pelos sítios catalíticos das mesmas enzimas, resultando na inibição da hidrólise de FDA (SONG; BARTHA, 1990). Tal competição pode ter mascarado a real atividade hidrolítica total nos solos contaminados. Desta forma, estudos mais aprofundados são necessários para verificar os reais motivos da inibição da atividade hidrolítica mensurada com o substrato FDA.

Embora a atividade hidrolítica inferior nos microcosmos contaminados possa sugerir o efeito negativo do diesel sobre a atividade da microbiota, outros parâmetros como respiração (Figura 5), enumeração de heterotróficos (Figura 10) e degradadores (Figura 11) indicam maior atividade microbiana e condições adequadas para o desenvolvimento de microrganismos, respectivamente, em relação aos microcosmos sem contaminação. O mesmo não pode ser afirmado com relação aos microcosmos com biodiesel, os quais apresentaram queda de todos os parâmetros avaliados, em relação ao diesel (Figuras 5, 10 e 12).

Enquanto que a avaliação da atividade hidrolítica total está majoritariamente relacionada a enzimas microbianas extracelulares, a atividade de desidrogenase se relaciona a enzimas intracelulares (ANDREONI et al., 2004). A atividade da desidrogenase dos solos contaminados com diesel (T2 e T3) aumentou (25% acima do controle) após 8 dias da contaminação do solo, mantendo-se similares ao controle até o 29º dia de incubação (Figura 7). O aumento inicial da desidrogenase em solos poluídos por diesel pode ser atribuída à adaptação e reprodução dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (MARGESIN; SCHINNER, 1997; MARGESIN et al., 2000b; DADRASNIA; AGAMUTHU, 2013).

No entanto, a partir do 8º dia, a atividade de desidrogenase em T2 e T3 decaiu a cada sucessiva avaliação, representando 77 e 70%, respectivamente, do total da atividade da desidrogenase em relação ao controle para o mesmo período. Já os tratamentos com biodiesel apresentaram queda logo após os primeiros dias de incubação (entre 8 a 15 dias), com valores próximos a zero a partir do 15º dia, seguindo sem variações substanciais até o final dos 90 dias de incubação (Figura 7). A atividade de desidrogenase demonstrou correlação positiva com o CO₂ acumulado ao longo do tempo, relacionado à respiração, no tratamento sem contaminação (T1) o que demonstrou que o incremento de ambos está relacionado, o inverso foi verificado para os demais tratamentos que apresentaram correlação negativa entre

estas variáveis nos tratamentos contaminados, onde foi verificado um aumento na respiração, porém um decréscimo na atividade da desidrogenase. Esse resultado foi oposto ao obtido por Dadrasnia e Agamuthu (2013) que verificaram uma correlação positiva entre as variáveis citadas em solo contaminado com 5% de diesel.

Similarmente, Meyer et al. (2014) verificaram menor atividade da desidrogenase em solo não contaminado e maior atividade inicial em solo contaminado com biodiesel (B100) até o sétimo dia de avaliação; após, foi observada queda da atividade, chegando aos 60 dias com valores próximos a zero, inferiores ao do solo controle. Aos 60 dias, o tratamento com diesel (B0) também apresentou declínio na atividade, porém não tão acentuado como em B100, apresentando sempre maior atividade que o solo controle. Ao final dos 60 dias, o solo contaminado com B0 apresentou maior biodegradação, estando acima de 90%, enquanto o biodiesel apresentou degradação de 50%. Os autores sugerem que a escassez de micronutrientes nos solos sob atenuação natural poderia ter levado a redução da atividade da desidrogenase no decorrer do tempo (MEYER et al., 2014).

Ogboosingha et al. (2015) observaram maior atividade da desidrogenase em solos não contaminados do que em solos contaminados com petróleo cru (1, 2 e 4%), a qual se manteve acima dos solos contaminados durante 90 dias de avaliação. Li et al. (2007) verificaram que, no geral, solos com maior quantidade de hidrocarbonetos apresentaram atividade de desidrogenase inferiores a solos com menores quantidades, e que estas atividades diminuíram ao longo de 110 dias de incubação, independentemente da concentração do poluente. De fato, a atividade de desidrogenase foi inibida significativamente, com relação a controles não contaminados, em solos tratados com quantidade de diesel acima de 0,5% (LI et al., 2007).

A atividade de desidrogenase poderia aumentar à medida que a concentração de hidrocarbonetos aumenta e, em alguns casos, é maior em solo contaminado do que em solo sem contaminação (MARGESIN et al., 2000b). Bento et al. (2005a) observaram um aumento sucessivo da desidrogenase ao longo de 84 dias de monitoramento em solo arenoso e argiloso sob atenuação natural. Dawson et al. (2007) verificaram correlação negativa entre a atividade de desidrogenase e a concentração de hidrocarbonetos determinada por extração química, o que significa que com a redução dos hidrocarbonetos a atividade da desidrogenase aumentou, e o mesmo foi reportado por Megharaj et al. (2000) em solos contaminados com

hidrocarbonetos residuais de diesel a longo prazo. Em contrapartida, Shen et al. (2005) não constataram diferença entre a atividade da desidrogenase em solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo e solo não contaminado.

As desidrogenases ocorrem tipicamente em todas as células microbianas intactas e viáveis, e sua mensuração geralmente está relacionada à capacidade oxidativa de microrganismos (ANDREONI et al., 2004). A redução da atividade da desidrogenase ao longo do tempo indicaria diminuição da atividade microbiana, que pode estar relacionada tanto ao efeito inibitório do combustível/metabólitos sobre a microbiota, quanto à redução da disponibilidade de substratos passíveis de degradação. Assim a atividade de desidrogenase poderia ser útil indicadora do início do processo de biodegradação, uma vez que a sua atividade diminui após a atenuação da taxa de biodegradação (OGBOLOSINGHA et al., 2015).

Apesar de a redução da atividade desidrogenase do solo ter ocorrido no decorrer do tempo e a quantidade de combustível extraído também ter sido reduzida, principalmente em T2 e T3, indicando degradação, não houve correlação estatística significativa entre ambas. Marin et al. (2005) observaram redução da atividade de desidrogenase em solo contaminado com lodo de petróleo, que também ocorreu no solo controle sem contaminação, porém mesmo com as reduções o solo contaminado se manteve sempre com maior atividade. Serrano et al. (2008) também observaram que a atividade da desidrogenase decaiu, em mais de 50%, no início de um experimento simulando o vazamento de óleo diesel em solo; porém esses valores foram reestabelecidos aos níveis originais após 200 dias, quando parte dos hidrocarbonetos já haviam sido degradados.

Entretanto, embora a atividade de desidrogenase seja um bom indicador da vitalidade de populações microbianas no solo, esta pode não estar diretamente relacionada às atividades metabólicas dos microrganismos (SOFO et al., 2014). Tang et al. (2010) demonstraram que a atividade de desidrogenase não refletiu a atividade microbiana envolvida na degradação de hidrocarbonetos, e resultados análogos foram reportados por Shahsavari et al. (2013a).

A atividade e a estimativa de populações e biomassa microbianas são usualmente utilizadas para avaliar perturbações no solo. A adição de compostos orgânicos ao solo pode causar efeitos positivos ou negativos à biomassa microbiana, bem como à sua atividade (BÖHME et al., 2005). O contato do solo com os combustíveis aplicados parece ter causado um estresse inicial às populações

microbianas, tendo em vista a menor quantidade de carbono da biomassa microbiana nos tratamentos contaminados em relação ao solo sem contaminação, no tempo zero (Figura 8).

O impacto positivo dos combustíveis, no sentido de incremento da biomassa, parece ter sido maior conforme o aumento da concentração do combustível, no caso do diesel, evidenciada pela maior produção de biomassa em T3 com relação a T2 entre os tempos 30 e 60 dias (Figura 8). Dawson et al. (2007), no entanto, observaram que a biomassa microbiana diminuiu com o aumento da poluição por hidrocarbonetos.

Após 90 dias de incubação, ocorreu queda da biomassa em T2 e T3, sendo que em T2 a biomassa final foi superior à inicial e em T3 a biomassa final foi inferior a inicial. Ao final de 90 dias, a biomassa microbiana nestes microcosmos foi inferior àquela no solo sem contaminação (Figura 8). Resultado similar foi encontrado por Labud et al. (2007), que verificaram que, após 180 dias, a biomassa microbiana foi maior no tratamento com menor percentual de diesel (5%) em relação ao maior percentual (10%).

O diesel e biodiesel adicionados aos solos podem atuar como fontes de carbono para o crescimento e a atividade microbiana, e assim contribuir para o incremento dos valores de carbono da biomassa microbiana (ALRUMMAN et al., 2015). Caravaca e Roldan (2003) verificaram que a biomassa poderia ser maior em solo contaminado por hidrocarbonetos do que em solo sem contaminação, devido a uma maior fonte de carbono estimulando a atividade microbiana. Marin et al. (2005) verificaram que o solo contaminado com lodo de petróleo apresentou maior biomassa microbiana do que o solo não contaminado durante 11 meses de monitoramento.

O fato de a biomassa ter reduzido ao longo do tempo no solo contaminado por diesel pode ter sido relacionado à redução dos combustíveis (Figura 18), pois conforme o substrato é utilizado há tendência de diminuição das populações (MARIN et al., 2005). Em oposição, Serrano et al. (2008) observaram que os valores da biomassa microbiana decaíram, em mais de 50% dos valores iniciais, no início de experimento simulando o vazamento de óleo diesel em solo, valores esses que foram reestabelecidos aos níveis originais após 200 dias da contaminação, quando parte dos hidrocarbonetos já haviam sido degradados.

Diferentemente do diesel, o biodiesel exerceu um efeito inibidor sobre a

biomassa, que foi visualizado após 30 dias de incubação e que aumentou nas avaliações seguintes, chegando a valores extremamente baixos (Figura 8). Possivelmente, a redução do pH ao longo do processo de incubação (Figura 13) tenha participado de tal inibição, visto que solos mais ácidos suportam uma gama menos ampla de microrganismos (VANACE et al., 1987).

Hawrot-Paw e Martynus (2011) também verificam uma redução na biomassa de solos arenosos e argilosos contaminados com biodiesel (B100) no decorrer de 112 dias de incubação. Ao final desse período, a biomassa do solo controle argiloso foi nove vezes superior ao mesmo solo contaminado, e este parâmetro foi 13 vezes superior no solo controle arenoso em relação ao mesmo solo contaminado. Os autores relataram que este biocombustível é uma substância estranha para o ambiente natural, semelhante ao combustível convencional, e que a presença do biodiesel no solo pode afetar desfavoravelmente a atividade da microbiota do solo.

A partir da quantificação da produção de CO_2 e da estimativa da biomassa microbiana foi calculado o quociente metabólico ($q\text{CO}_2$), que reflete a eficiência com a qual o carbono é utilizado e indica o estresse frente a contaminações (MARIN et al., 2005), podendo representar um índice mais sensível de poluição do solo do que estes parâmetros isoladamente (MARGESIN et al., 2000a).

Com relação ao $q\text{CO}_2$ nos microcosmos contaminados com diesel (Figura 9), os valores indicam um estresse maior logo após a aplicação do combustível, e uma redução aos 90 de incubação, principalmente na menor concentração de diesel (T2). Valores menores de $q\text{CO}_2$ apontam para uma maior estabilidade da biomassa microbiana e do sistema. Margesin et al. (2000a) verificaram que a presença de óleo diesel resultou em um $q\text{CO}_2$ elevado em comparação ao controle; o $q\text{CO}_2$ foi diminuído após quatro a cinco semanas, o que sugere que os microrganismos do solo se adaptaram à contaminação ou que com a diminuição do conteúdo de hidrocarbonetos, ao longo do tempo, resultou em um $q\text{CO}_2$ mais baixo.

Os tratamentos com biodiesel apresentaram os maiores valores de $q\text{CO}_2$ (Figura 9). Ao longo do tempo houve um aumento destes valores, principalmente na maior concentração (T5). Já em T4 o valor decaiu, chegando ao final com valor abaixo do inicial. Neste contexto, cabe ressaltar que especialmente a biomassa microbiana foi afetada negativamente, em relação aos controles, nos tratamentos com biodiesel. Valores elevados de $q\text{CO}_2$ têm sido associados a estresse ecossistêmico causados por condições adversas (ISLAM; WEIL, 2000). Esses

resultados indicam que o biodiesel causou maior estresse ao solo do que o diesel. O $q\text{CO}_2$ pode indicar o equilíbrio da microbiota do solo e a não estabilização do $q\text{CO}_2$ pode estar ligado ao tempo de avaliação que pode ter sido pequeno para que ocorresse o completo consumo dos contaminantes (CHAER; TÓTOLA, 2007).

Marin et al. (2005) verificaram aumento significativo do $q\text{CO}_2$ após a adição de lodo de petróleo em solo em comparação a solo não contaminado, demonstrando a perturbação causada pelo substrato adicionado. Segundo os autores, os microrganismos presentes no solo contaminado elevariam a sua respiração por unidade de biomassa para realizar a degradação dos hidrocarbonetos. Caravaca e Roldán (2003) também verificaram que, mesmo após 49 dias de incubação, o quociente metabólico do solo contaminado com lodo oleoso petroquímico foi significativamente maior que o do solo não contaminado, apontando para uma redução na eficiência do uso de substratos no solo contaminado.

Além da avaliação da biomassa microbiana, foram também realizadas enumerações dos microrganismos heterotróficos totais e degradadores de combustíveis através da técnica do NMP, amplamente empregada para estes propósitos, incluindo estimativas de microrganismos capazes de degradar diesel ou biodiesel (BRADDOCK; CATTERALL, 1999; BENTO et al., 2005a; CERQUEIRA et al., 2011). Através da utilização do substrato alvo da degradação como fonte única de carbono, microrganismos degradadores vêm sendo encontrados tanto em solos com histórico de exposição prévia a hidrocarbonetos de petróleo quanto em solos naturais não contaminados (LABUD et al., 2007; COLLA et al., 2014), como é o caso do solo utilizado na presente investigação.

Os números de microrganismos heterotróficos e degradadores em T1 permaneceram relativamente constantes ao longo dos 90 dias de incubação. As contagens de heterotróficos e degradadores em diesel (T2 e T3) foram similares entre si, e ambas superiores ao controle (Figuras 10 e 11). O aumento no número de microrganismos degradadores de diesel durante a biorremediação de solos pode estar correlacionado à biodegradação e atividades biológicas do solo (MARGESIN; SCHINNER, 1997; BENTO et al., 2005a; DADRASNIA; AGAMUTHU, 2013). Esse incremento, principalmente no período inicial, demonstra o quão rapidamente os microrganismos indígenas do solo são capazes de se adaptar a novos substratos (MARGESIN et al., 2000b).

Diversos autores reportam que solos contaminados com hidrocarbonetos não

inibiram a microbiota nativa. Em vez disso, atuaram como fonte de carbono e nutrientes, onde os solos contaminados apresentaram maior nível de respiração e maior número de microrganismos heterotróficos totais e degradadores do que solos não contaminados (MERCADO et al., 2015; QUADROS et al. 2016). Desta forma, os resultados obtidos nos microcosmos contendo diesel indicam que os microrganismos do solo, para além de tolerar a contaminação, foram potencialmente capazes de utilizar os hidrocarbonetos em seu metabolismo, o que estimulou seu crescimento (MARGESIN et al., 2000b; DADRASNIA; AGAMUTHU, 2013; ALRUMMAN et al., 2015).

Colla et al. (2014) também reportaram um aumento do número de heterotróficos totais e degradadores em solos contaminados com B10 sob estratégia de atenuação natural ao longo de 30 dias, valores esses superiores aos do solo sem contaminação. As populações microbianas do controle também aumentaram, principalmente nos primeiros 12 dias de incubação (COLLA et al., 2014), assim como visualizado no presente trabalho (Figuras 10 e 11). Margesin et al. (1999) observaram que o aumento de degradadores coincidiu com os maiores índices de biodegradação no mesmo período.

Cerqueira et al. (2014) verificaram que os microrganismos apresentaram tolerância e capacidade de crescimento em solo contaminado com lodo oleoso petroquímico, porém houve um decréscimo dos degradadores ao longo de 90 dias de incubação. Segundo estes autores, em ambientes contaminados por hidrocarbonetos, a sobrevivência de microrganismos, o conteúdo e a diversidade das comunidades microbianas autóctones e o esgotamento de nutrientes são fatores importantes que afetam a taxa biodegradação dos contaminantes.

As contagens de heterotróficos e degradadores nos tratamentos com biodiesel também foram similares entre si, apresentando, tanto em T4 quanto em T5, um aumento populacional no 8º dia, que se seguiu por uma queda verificada a partir do 15º dia até o final da incubação (Figuras 10 e 12). Esta redução populacional, assim como as reduções dos outros parâmetros avaliados, que também ocorreram a partir do 15º dia também (exceção feita àqueles avaliados com periodicidade inferior), pode ter sido originada pela degradação do biodiesel, acarretando na diminuição do pH, o que afetou negativamente a microbiota do solo (SASAKI et al., 2003).

Complementarmente às análises relacionadas ao impacto dos combustíveis sobre a microbiota do solo, os solos contaminados também foram avaliados quanto

aos efeitos sobre a germinação de sementes. A avaliação da toxicidade através de germinação de sementes é considerada ferramenta útil na avaliação do risco em solos contaminados (BANKS; SCHULTZ, 2005), devido à sua sensibilidade em indicar a presença de inibidores tóxicos químicos ou biológicos (TAMADA et al., 2012).

Os solos poluídos com hidrocarbonetos de petróleo causam redução da germinação de sementes conforme o aumento do nível de poluição, o que pode ser atribuído, além da toxicidade dos compostos, às condições desfavoráveis criadas pela contaminação, que causam a compactação do solo e por consequência diminuição da aeração e a mobilidade dos compostos (OGBOGHODO et al., 2004). Além disso, hidrocarbonetos bem como o biodiesel, devido à sua hidrofobicidade, podem revestir as raízes das plantas e impedir ou reduzir as trocas gasosas e absorção de água e nutrientes. Ainda, estes compostos podem adentrar nas sementes e alterar as reações metabólicas e/ou matar o embrião por toxicidade aguda direta (XU; JOHNSON, 1995; ADAM; DUCAN 2002; LABUD, et al., 2007).

O índice de Germinação (IG) pode demonstrar o efeito da contaminação do solo tanto na germinação de sementes quanto no crescimento das raízes (LABUD et al., 2007). O IG classifica uma substância quanto à fitotoxicidade considerando como moderadamente fitotóxicos valores inferiores a 80 até 60%, fitotóxicos valores abaixo de 60 até 30%, enquanto que valores inferiores a 30% são considerados muito tóxicos (ZUCCONI et al., 1985). Além do IG, também foi avaliada a porcentagem de inibição da germinação de sementes, que foi relacionada ao controle (solo sem contaminação). Os valores de inibição superiores a 40% nos organismos teste são considerados tóxicos, enquanto os valores de inibição não tóxicos variam entre 0 e 10% de inibição. Quando os valores de inibição da germinação estão entre 10 e 40% o composto é indicado por apresentar sinais de toxicidade (LOPES et al., 2010; CRUZ et al., 2013a).

O IG relacionado às sementes de alface em T2 após 45 dias havia aumentado em 100%, e o IG em T3 havia apresentado queda de 7% (Figura 14). Porém, após 90 dias de incubação dos solos nestes microcosmos, o IG em ambos apresentou queda em torno de 50%, atingindo valores similares. Diferentemente do IG, que leva em conta a germinação relativa e o crescimento da radícula, a porcentagem de inibição de germinação das sementes de alface decaiu principalmente em T2, aproximadamente 40% em relação ao tempo zero, enquanto

em T3 foi observada redução mínima (Figura 16).

Plaza et al. (2005) indicaram que alface seria um dos organismos mais sensíveis a hidrocarbonetos de petróleo. Banks e Schultz (2005) também utilizaram sementes de alface em bioensaios de fitotoxicidade em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, que demonstraram sensibilidade ao contaminante. Hamdi et al. (2007) verificam que o IG de alface aumentou ao longo de 120 dias como resultado da diminuição da concentração de hidrocarbonetos aromáticos de petróleo no mesmo período.

Com relação ao IG das sementes de pepino (Figura 15), o efeito inibitório foi reduzido nos tratamentos com diesel ao longo do experimento, elevando o IG principalmente do solo com menor teor de contaminação (T2), mas também com elevação no solo com maior contaminação (T3). Os valores de redução da inibição da fitotoxicidade são ainda mais perceptíveis quando considerada a porcentagem de inibição da germinação de sementes de pepino ao longo do tempo (Figura 17).

Considerando os valores indicados por Zucconi et al. (1985) ambas as concentrações de diesel foram consideradas muito tóxicas para alface e para pepino (valores inferiores a 30%), mesmo com a redução dos contaminantes nos tratamentos (Figura 18). Quando levado em conta apenas o valor da inibição da germinação de sementes de alface ambos os combustíveis também foram considerados tóxicos (inibição superior a 40%). Já para as sementes de pepino ambas as concentrações de diesel, que inicialmente eram tóxicas, passaram a apresentar apenas sinais de toxicidade (T3) e ausência de toxicidade (T2) (LOPES et al., 2010; CRUZ et al., 2013a).

A redução da toxicidade nos solos com diesel provavelmente ocorreu devido à degradação de alguns dos compostos fitotóxicos contidos nos hidrocarbonetos, sendo os metabolitos resultantes menos fitotóxicos, ou ao sequestro e formação de resíduos ligados ao solo (LABUD et al., 2007). Particularmente, a diminuição da fitotoxicidade após 45 dias nas sementes de alface em T2 e T3, seguida pelo aumento da toxicidade após 90 dias, pode estar relacionada a absorção de hidrocarbonetos pelos colóides do solo, que faz com que a toxicidade do hidrocarboneto apareça algum tempo após a contaminação, quando em solo com característica argilosa. Nestes solos, os hidrocarbonetos são inicialmente absorvidos pelos colóides e à medida que os processos de mineralização e/ou dessorção da matéria orgânica ocorrem, a concentração de hidrocarbonetos na fase aquosa e

gasosa aumenta e o efeito tóxico dos hidrocarbonetos se torna mais perceptível (LABUD et al., 2007).

Diferentemente dos tratamentos com diesel, os tratamentos com biodiesel apresentaram um aparente aumento da toxicidade ao longo do tempo. Além de um menor grau de degradação dos compostos, como consequência da diminuição do número e da atividade microbiana. A (bio)degradação do biodiesel também pode gerar intermediários mais fitotóxicos com relação à germinação de sementes do que os compostos originais (LAPINSKIENE et al., 2006). Outro fator relevante, no contexto da presente investigação, foi o aumento da acidez nos solos contendo biodiesel (Figura 13), o que pode afetar o processo de germinação de sementes (CRUZ et al., 2013a).

Cruz et al. (2013a) demonstraram que o biodiesel foi extremamente tóxico à germinação de sementes de pepino, as quais apresentaram germinação inicial em torno de 15% e, após 90 dias de biorremediação do solo analisado, o percentual foi elevado para 100% de inibição. Tamada et al. (2012) também verificaram que o biodiesel inibiu 100% da germinação de sementes de alface após 180 dias de atenuação natural do solo.

Diferentemente, Cruz et al. (2014) avaliaram a fitotoxicidade de solo contaminado com diesel e biodiesel em germinação de sementes de alface, através da inibição da raiz e do hipocótilo. Embora ambos os combustíveis tenham apresentado fitotoxicidade no período inicial, após 240 dias de biorremediação solos contaminados com diesel continuaram apresentando fitotoxicidade, diferentemente daqueles contaminados com biodiesel, que deixaram de apresentar fitotoxicidade. Tal fato foi correlacionado à redução dos combustíveis durante o processo de biorremediação, no qual o biodiesel havia sido degradado quase completamente e o diesel apresentava quantidade residual de cerca de 30%.

A redução do pH do solo, apresentada principalmente nos tratamentos onde os solos foram contaminados com biodiesel, é reconhecida por diminuir a biodisponibilidade dos nutrientes presentes no solo (como cálcio, potássio e magnésio), assim como o pH baixo aumenta a disponibilidade de alumínio livre em solução que pode causar fitotoxicidade a germinação de sementes (GOULDING, 2016). O alumínio em excesso causa fitotoxicidade em plantas, pois tem o potencial de causar bloqueio ao mecanismo de divisão celular dos organismos vegetais (PANDA et al., 2009).

As respostas obtidas para as duas espécies de vegetais utilizadas nos testes evidenciam a diferença que dois organismos testes distintos podem apresentar com relação à sensibilidade a um mesmo contaminante. Labud et al. (2007) verificou o IG de sementes de cevada e avevém em solo argiloso contaminado com 5% e 10% de diesel. Nos tratamentos com sementes de cevada houve o aumento do IG ao longo do tempo; já nos tratamentos com avevém houve um aumento da fitotoxicidade com relação à primeira avaliação (tempo zero), apenas na maior concentração, após 120 dias, que voltou a crescer aos 180 dias. As sementes de avevém foram mais sensíveis do que a cevada ao diesel. O percentual de diesel também influenciou, visto que a maior concentração casou maior inibição.

Em estudo realizado por Adam e Duncan (2002), os autores demonstraram que germinação de sementes em solos variam em sensibilidade em relação à contaminação por diesel. Por exemplo, a germinação de espécies de gramíneas foi mais sensível ao diesel, enquanto ervas, legumes e culturas comerciais, como canola e linho, foram menos afetadas. Ainda, a inibição da germinação geralmente foi maior com o aumento da concentração de combustível (ADAM; DUNCAN, 2002).

Adicionalmente aos parâmetros biológicos, que indicam a biodegradação dos combustíveis, também foi realizada a extração dos compostos a partir dos solos contaminados no intuito de evidenciar sua degradação. Os resultados gravimétricos e cromatográficos apontam para a degradação em todos os tratamentos, independente do teor de combustível inicialmente aplicado, porém em diferentes intensidades. Em nenhum dos tratamentos houve redução integral da massa total dos combustíveis aplicados no tempo inicial (Figura 18).

Nos primeiros 30 dias de incubação, as reduções na massa dos combustíveis extraídos foram similares entre os tratamentos (34-39%). Os tratamentos com biodiesel apresentaram valores mais elevados de biodegradação dos 30 aos 60 dias, quando comparados aos tratamentos com diesel nas mesmas concentrações (Figura 18). Porém, aos 90 dias, os tratamentos com diesel demonstraram maiores reduções do que os tratamentos com biodiesel, quando realizada a comparação entre as mesmas concentrações inicialmente aplicadas. T2 foi o tratamento que apresentou a maior redução gravimétrica do teor inicial de combustível (Figura 18).

Maior taxa de degradação, visualizada no período inicial de incubação, pode ser devida ao estímulo à atividade metabólica da microbiota causado pela adição do combustível. No caso de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, estes

utilizariam as fontes mais lábeis, como hidrocarbonetos alifáticos de cadeia curta, e, com a diminuição destas fontes, as populações microbianas poderiam passar a utilizar hidrocarbonetos mais recalcitrantes, como hidrocarbonetos de maior massa molecular e/ou cíclicos, menos eficientemente. As razões para a reduzida taxa de degradação final podem incluir a diminuída biodisponibilidade do contaminante, o acúmulo de componentes recalcitrantes, a inibição por metabólitos e a falta de fatores de crescimento microbiano (MARGESIN; SCHINNER, 1997; MARGESIN et al., 2000b).

A degradação de hidrocarbonetos de maior massa molecular pode originar intermediários tóxicos capazes que inibir microrganismos degradadores (BENTO et al., 2005a). Além disso, pode haver a possibilidade de não recuperação de contaminantes devido à adsorção aos coloides do solo, tais como minerais de argila ou partículas de húmus. A baixa solubilidade em água e interações hidrofóbicas às partículas do solo possivelmente contribuem para a sua persistência. Ainda, certa proporção também pode ser adsorvida ou incorporada à biomassa ou aos metabólitos microbianos (MARGESIN; SCHINNER, 1997; MARGESIN et al., 2000b).

Para os tratamentos T2, T3 e T4, correlação linear positiva foi encontrada entre a redução dos combustíveis, verificada por gravimetria, e a quantidade de CO₂ acumulado ao longo do tempo, assim como verificado por Dadrasnia e Agamathu (2013). Neste sentido, a respiração do solo pode atuar como indicadora da atividade microbiana no solo e da quantidade e qualidade de substratos suscetíveis à degradação e mineralização, demonstrando que no período de maior atividade, no caso da respiração, ocorre maior degradação. A emissão de CO₂ pode diminuir gradualmente à medida que as frações de hidrocarbonetos lábeis desaparecem, com apenas frações mais recalcitrantes restantes (MARIN et al., 2005). Isso indicaria a diminuição das taxas de degradação, resultando no aumento da concentração residual de combustível (DADRASNIA; AGAMUTHU, 2013).

Os percentuais de biodegradação dos contaminantes em solos costumam variar em diferentes estudos, pois há variações nas características dos solos utilizados, na composição química dos contaminantes, na forma de extração, metodologias, quantificação do nível de degradação, entre outras. Independentemente destes aspectos e das características de processos aplicados na biorremediação de hidrocarbonetos, o teor total não é usualmente reduzido a zero. Comumente são reportadas permanências entre 10 a 30% em relação à

contaminação inicial, mesmo em tratamentos prolongados (MARGESIN; SCHINNER, 1997; MARGESIN et al., 2000b).

Marchal et al. (2003) relatam que muitos estudos realizados em microcosmos com solos apresentaram degradação incompleta do óleo diesel. Mariano et al. (2007) verificaram que após 55 dias de tratamento, a biodegradação de hidrocarbonetos correspondeu a 57,8%, enquanto Bento et al. (2003) observaram, em 84 dias, remoção de hidrocarbonetos de aproximadamente 50% através de atenuação natural. Safdari et al. (2018) avaliaram a atenuação natural em solo, originário de uma refinaria de derivados de petróleo, contaminado com hidrocarbonetos de petróleo, que resultou na biodegradação de 51% dos hidrocarbonetos totais de petróleo, em 60 dias de experimento.

Dadrasnia e Agamuthu (2013), em solo contaminado com 5% de diesel, relataram 35% de degradação do combustível após 84 dias sob atenuação natural. Em trabalho realizado por Cerqueira et al. (2014), avaliando a atenuação natural em solos argilosos, contaminados com lodo oleoso petroquímico em duas concentrações (1,5% e 6,0%), verificaram degradação de 59,7% na menor concentração e de 74,9% na maior concentração. Lisiecki et al. (2014), mesmo após 578 dias de biorremediação de misturas de diesel e biodiesel em solo, reportaram a presença de hidrocarbonetos em todos os tratamentos e traços de biodiesel na maioria deles.

Cecchin et al. (2016) verificaram que parte do biodiesel aplicado a um solo argiloso foi absorvida imediatamente, não permitindo a total extração do contaminante desse solo. A umidade do solo é um dos fatores que aumenta a interação entre a matéria orgânica mineral do solo (partículas hidrofílicas) e orgânica do contaminante (partículas hidrofóbicas), alterando assim a quantidade residual do contaminante. Outro fator a ser avaliado é o período de contato com o contaminante, que demonstrou ser mais rápido nos primeiros 15 dias, os processos de sorção subsequentes estão associados com migração do contaminante para sulcos microscópicos presentes na partícula mineral do solo.

Componentes do diesel e do biodiesel, no início e ao final da incubação dos microcosmos, foram identificados a partir de seus espectros de massa e tempos de retenção em análises de cromatografia gasosa (Figuras 21-24). Os dados referentes aos compostos identificados também são apresentados na forma de área relativa (Tabelas 3-6), pois está se correlaciona à quantidade do composto na amostra,

enquanto que a altura do pico pode ser influenciada, entre outros, pela velocidade de injeção da amostra no equipamento de GC-MS (FEELISCH et al., 2002).

Quando observados os cromatogramas e os compostos identificados a partir dos solos contaminados com diesel (Figuras 21 e 22; Tabelas 3 e 4), foi possível visualizar que apenas os ésteres componentes do biodiesel adicionado ao diesel (B8) foram completamente degradados. O fato de os hidrocarbonetos terem sido mais persistentes, no sentido de nenhum dos hidrocarbonetos ter apresentado degradação completa, indica que, no óleo diesel, há mais compostos resistentes à oxidação microbológica, enquanto os compostos orgânicos presentes no biodiesel são mais facilmente acessíveis como fontes de carbono e energia (LI et al., 2007).

A maioria dos hidrocarbonetos biodegradados, conforme as análises cromatográficas, correspondeu a alcanos lineares e apenas alguns alcanos ramificados (Tabelas 3 e 4). Os alcanos são considerados mais lábeis, menos tóxicos e mais facilmente utilizáveis pelos microrganismos como fontes de carbono e energia. De modo geral hidrocarbonetos cíclicos e aromáticos são menos biodegradáveis do que os alcanos, e alcanos ramificados menos biodegradáveis que alcanos lineares (MARCHAL et al., 2003). Já o aumento no número de anéis eleva a estabilidade química e a hidrofobicidade da molécula dos hidrocarbonetos aromáticos, tornando-os menos suscetíveis à biodegradação (YU et al., 2005). Utilizando a mesma abordagem metodológica, Dadrasnia e Agamuthu (2013) observaram diminuição nas intensidades de picos de hidrocarbonetos (C₈-C₂₆) em solos contaminados com óleo diesel, após 84 dias de atenuação natural.

A elevada biodegradabilidade do biodiesel em relação a hidrocarbonetos de petróleo vem sendo relatada na literatura (PASQUALINO et al., 2006; MARIANO et al., 2008 BÜCKER et al., 2011; SOUZA et al., 2016). O biodiesel é mais facilmente metabolizado do que o diesel devido à sua composição, sendo que diversas enzimas podem reconhecer e atacar imediatamente os ésteres metílicos de ácidos graxos (ZHANG et al., 1998). Além da biodegradação causada pelos microrganismos, ainda pode ocorrer a (auto)oxidação, influenciada pela presença de umidade, oxigênio, temperatura e luz (PASSMAN, 2013). Em contrapartida, a biodegradação do diesel, que contém uma grande quantidade de alcanos, sem moléculas de oxigênio associadas às suas estruturas, exige microrganismos capazes de produzir enzimas que reconheçam essas moléculas (MARIANO et al., 2008).

Aparentemente a fração de biodiesel acrescida ao diesel foi completamente

degradada segundo as análises cromatográficas (Tabelas 3 e 4). Alguns autores relatam que o acréscimo de biodiesel ao diesel tornaria o último mais biodegradável (PASQUALINO et al., 2006). Mariano et al. (2008) verificaram a biodegradabilidade de misturas de diesel/biodiesel e apenas a mistura com maior concentração de biodiesel (B20) apresentou biodegradabilidade significativamente diferente do diesel e não foi verificada uma melhora na biodegradação do diesel por cometabolismo.

Entre os ácidos graxos também existe relação entre a quantidade carbonos das moléculas e a degradação, sendo aqueles de cadeia curta (menor que C₁₅) são mais biodegradáveis. Da mesma forma, os ésteres metílicos de ácidos graxos saturados são menos facilmente biodegradáveis do que os insaturados (PASSMAN, 2013). Os resultados encontrados na presente investigação (Tabelas 5 e 6) indicam que os compostos insaturados apresentaram melhores taxas de degradação.

Os resultados obtidos pelas análises realizadas de GC-MS para o biodiesel (T4 e T5) apresentaram um composto no tempo de retenção 9.090 identificado, segundo a biblioteca do equipamento, como 9-oxononanoato de metila (Figuras 23 e 24; Tabelas 5 e 6), que não estava presente no cromatograma efetuado da amostra de biodiesel (B100) puro (Figura 20). O composto 9-oxononanoato de metila é originado da oxidação do metil linoleato. A oxidação dos ácidos graxos linoleicos pode gerar dois produtos formados pela oxidação da dupla ligação presente no composto, formando 9-oxononanoato de metila e o 10-oxo-8-decenoato de metila. O fato de apenas o primeiro composto ter sido identificado no cromatograma, pode ter sido devido ao tempo de retenção do segundo composto (10-oxo-8-decenoato de metila) que deveria ter sido em torno de 14,3 min (PINHO et al., 2014), portanto pode esse composto por ter sido sobreposto pelos picos aos 14.410 (metil linoleato) e 14.440 (metil oleato) e por isso não ter sido identificado.

Como este composto não estava presente na amostra de biodiesel adicionada durante a contaminação, nem mesmo atualmente na amostra de biodiesel sobressalente (testada por nova cromatografia), é provável que a oxidação dos ácidos graxos linoleicos, que aparece ainda no tempo zero, podem ter ocorrido devido à termo-oxidação (GOODMAN et al., 2016), causada pela temperatura de extração do equipamento Soxhlet. A oxidação dos graxos está totalmente ligada com o número de duplas ligações e sua posição. O ácido linoleico é mais vulnerável a oxidação porque contém grupos metileno que são alílicos para duas ligações duplas (BOUAID et al., 2007).

A degradação dos compostos presentes no biodiesel pode gerar compostos intermediários. A degradação também revela quais os componentes do combustível específicos são preferencialmente degradados ou não. O composto metil oleato ($C_{19}H_{36}O_2$), que apresentou redução em T4 e T5 (Tabelas 5 e 6) pode ter sido parcialmente degradado, via β -oxidação, a metil palmitato ($C_{17}H_{34}O_2$) o que corroborou com o aumento do composto. Essa via catabólica converte os intermediários de ácidos graxos pela remoção sucessiva de dois átomos de carbono da extremidade da molécula, na forma de acetil-CoA. Possivelmente, ácidos graxos de menor peso molecular também foram produzidos e consumidos, mas não foram detectados pelo procedimento de GC-MS empregado (AKTAS et al., 2010; AZAMBUJA et al., 2017).

O composto metil estearato ($C_{19}H_{38}O_2$), que aumentou durante a incubação em T4 e T5 (Tabelas 5 e 6) pode ter sido incrementado devido a hidrogenação do metil oleato ($C_{19}H_{36}O_2$). Microrganismos, particularmente anaeróbios, podem inicialmente hidrogenar ácidos graxos insaturados, que é o caso do metil oleato, para convertê-los em compostos saturados, como o metil estearato, antes da β -oxidação, ou simplesmente biodegradá-los mais rapidamente do que seus ácidos graxos saturados correspondentes (SOUSA et al., 2009; AKTAS et al., 2010). Vieira et al. (2006) também detectaram, através de análises cromatográficas, a formação produtos da biodegradação de biodiesel de óleo de palma como o ácido palmítico e o ácido esteárico.

Mesmo com a reconhecida maior biodegradabilidade de componentes do biodiesel, como observado em T2 e T3, nos microcosmos com os tratamentos T4 e T5 houve redução da taxa de biodegradação, mais acentuada no tratamento com maior concentração de biodiesel (T5). Este tratamento (T5) apresentou o menor valor de pH final no mesmo período (Figura 13), as menores contagens de microrganismos heterotróficos totais (Figura 10) e degradadores (Figura 12), sendo também o único tratamento do qual não foi possível obter nenhum isolado bacteriano cultivável ao final dos 90 dias de incubação do solo. Como anteriormente indicado para outros parâmetros avaliados, a drástica redução do pH em T4 e T5 possivelmente esteja relacionada aos menores valores de biodegradação, já o que solo praticamente não mais apresentava atividade e biomassa microbianas, com exceção da respiração (Figura 5) (SASAKI et al., 2003). Valores baixos de pH afetam a taxa de decomposição por bactérias em solos contaminados com combustíveis

(OKOH, 2006).

Além dos fatores relacionados às atividades microbiológicas, os fatores físicos e químicos como a lixiviação, volatilização e foto-oxidação, também podem influenciar no abatimento dos contaminantes em sistemas de biorremediação. Hidrocarbonetos com mais de 14 carbonos, por exemplo, tendem a adsorver às partículas do solo, o que os torna menos voláteis (DADRASNIA e AGAMUTHU, 2013). Considerando a baixa volatilidade dos componentes do biodiesel (SINGH; SINGH, 2010) e do óleo diesel em temperatura ambiente (FINOTTI et al., 2001), e que os experimentos foram realizados em sistemas fechados (impedindo a lixiviação) e incubados sob proteção da luz (evitando a foto-oxidação), a redução da massa dos combustíveis extraídos no decorrer do experimento e as análises cromatográficas indicam que a degradação observada corresponde a processos majoritariamente bióticos.

5.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DEGRADADORA E DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Uma das estratégias empregadas visando avaliar a capacidade de degradação por microrganismos é a utilização de hidrocarbonetos do petróleo e componentes do biodiesel como única fonte de carbono para o crescimento microbiano em meio líquido, na presença de indicadores redox, como o TTC (MEYER et al., 2012; OBI et al., 2016; SOUZA et al., 2016; GOMES et al., 2018). Estes indicadores atuam como aceptores artificiais de elétrons, e sua redução indica, indiretamente, a oxidação e utilização microbiana do substrato orgânico presente no meio, neste caso o diesel e o biodiesel (CERQUEIRA et al., 2012).

Dos 30 isolados com capacidade de degradar combustível, 10 foram obtidos de solo contaminado com biodiesel (Tabela 9) e 20 de solo contaminado com diesel (Tabela 10). O fato de não terem sido isolados bactérias dos microcosmos T5 não significa que as mesmas não estejam presentes, visto que ainda havia produção de CO₂ (Figura 4) e a presença de biomassa (Figura 7). Visto que é possível que apenas 1% de bactérias cultiváveis seja representativo de toda a população e que os outros 99% estejam em um estado fisiológico que escapa à nossa capacidade de cultivá-los (KIRK et al., 2004).

Do total de isolados, 20 foram classificados como gram-negativos (Tabelas 7

e 8). As bactérias Gram-negativas são consideradas ligeiramente mais tolerantes do que as bactérias Gram-positivas, devido à membrana externa das bactérias Gram-negativas, que atua como uma barreira de proteção, particularmente para a penetração de compostos hidrofóbicos (DENYER; MAILLARD, 2002). Diversas áreas contaminadas com petróleo são dominadas por bactérias Gram-negativas (KAPLAN; KITTS 2004; RÖLING et al., 2004; MOLITERNI et al., 2012; OBI et al., 2016).

Os resultados indicam que isolados bacterianos, possivelmente expostos ao óleo diesel pela primeira vez, demonstraram capacidade de catabolizar hidrocarbonetos constituintes deste combustível. Sugere-se, assim, a versatilidade metabólica da microbiota autóctone do solo investigado, ou seja, a potencial presença de microrganismos que possuem maquinaria enzimática capaz de transformar os hidrocarbonetos do óleo diesel em intermediários comuns das suas rotas catabólicas (JACQUES et al., 2007b).

O fato de todos os isolados de solo contaminado com biodiesel degradarem o biodiesel, quando fresco, em até dois dias, está relacionado com o fato do biodiesel de soja ser composto por ésteres de ácidos graxos, que são mais facilmente degradados por microrganismos quando comparados aos hidrocarbonetos do óleo diesel (BUCKER et al. 2011). Embora os isolados bacterianos de solo contaminado com diesel tenham demorado mais para apresentar degradação do combustível, a mudança de coloração do indicador da maioria ocorreu em até cinco dias de cultivo (Tabela 10).

Experimentos realizados por Cerqueira et al. (2012) indicaram que, de 45 bactérias isoladas de ambientes contaminados por resíduos de petróleo, 26 apresentaram alguma capacidade de redução do TTC em meio contendo óleo diesel (1% e/ou 3%, v v⁻¹) como única fonte de carbono. Meyer et al. (2012), de 24 bactérias isoladas de ambientes contaminados por hidrocarbonetos e ésteres, selecionaram 10 isolados com potencial para degradação de mistura diesel/biodiesel a partir dos resultados de ensaios com indicadores redox. Outro indicador redox [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2 H-tetrazolium bromide; MTT] foi utilizado por Gomes et al. (2018), para avaliar a capacidade de degradação de hidrocarbonetos por bactérias halófilas. De 79 isolados bacterianos geneticamente diferentes, 20 foram capazes de crescer na presença de um ou mais hidrocarbonetos testados.

A produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solos

contaminados com combustíveis, através do índice de emulsificação (IE_{24}), é uma metodologia empregada por diversos autores (BENTO et al., 2005a, CERQUEIRA et al., 2012; MEYER et al., 2012). Dos 30 isolados com capacidade de degradar biodiesel ou diesel, 18 isolados apresentaram produção de biossurfactantes (IE_{24}) entre 46,9-74,9% na presença de células e entre 0-67,4% na ausência de células (Tabela 11). Cerqueira et al. (2011), a partir do estudo de cinco isolados bacterianos, observaram IE_{24} de 20,0-48,0% para testes realizados na presença de células e de 23,3-40,0% na ausência de células; enquanto que Meyer et al. (2012) reportaram, para sete isolados bacterianos, IE_{24} de 8,7-65,2% e de 0,0-60,9% para ensaios realizados na presença e na ausência de células, respectivamente.

Dos 18 isolados bacterianos produtores de biossurfactantes na presença de células, 17 apresentaram valores de IE_{24} acima de 50%; e na ausência de células 10 isolados apresentaram valor acima de 50%. Segundo Plaza et al. (2006), emulsões são consideradas estáveis quando o IE_{24} for maior ou igual a 50%. O fato de a maioria dos isolados terem apresentado índice de emulsificação na presença e na ausência de células indica a maior contribuição de moléculas solúveis secretadas pelos microrganismos, já os isolados que produziram biossurfactantes apenas na presença de células podem ter parte das moléculas com capacidade emulsificante associadas à superfície celular. Os resultados de IE_{24} indicam que, para os isolados B1, B3-B8, D10, D14 e D23, a capacidade emulsificante está relacionada, majoritariamente, à produção de moléculas surfactantes solúveis. Por outro lado, para os isolados D12, D13, D15, D20-D22, este índice sugere a produção de biossurfactantes associados à superfície celular (Tabela 11).

Considerando que a hidrofobicidade dos hidrocarbonetos de petróleo pode afetar negativamente sua disponibilidade para os microrganismos (ANDRADE et al., 2010), a produção de bioemulsificantes é importante no processo de biodegradação, permitindo aos microrganismos elevar a solubilidade e biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos, de forma a incrementar a assimilação e o catabolismo dos contaminantes (RON; ROSENBERG, 2002; CERQUEIRA et al., 2012).

De fato, os biossurfactantes podem influenciar a taxa de biodegradação por duas diferentes maneiras, sendo pelo aumento da dissolução das moléculas hidrofóbicas na fase aquosa e pela mudança na afinidade entre a célula bacteriana e o contaminante, o que aumenta a hidrofobicidade celular. O biossurfactante então acarretaria em maior interação entre o microrganismo e o contaminante, o que

aumentaria as taxas de biodegradação (ZHANG; MILLER, 1995; PARIA, 2008).

A hidrofobicidade celular microbiana pode ser definida, resumidamente, como a capacidade de adesão à interface óleo-água, ou seja, a afinidade da superfície celular a compostos orgânicos hidrofóbicos (CHRZANOWSKI et al., 2005). A medida avalia o grau de hidrofobicidade da superfície celular através da porcentagem de células aderidas a compostos hidrofóbicos. Várias espécies de bactérias são capazes de degradar os hidrocarbonetos líquidos depois de aderirem às superfícies das gotículas. Este contato direto entre uma célula bacteriana e um hidrocarboneto alvo pode incrementar significativamente a taxa de difusão para dentro da célula, aumentando assim tanto o crescimento microbiano quanto a taxa aparente de dissolução e degradação do hidrocarboneto (VASILEVA-TONKOVA; GESHEVA, 2004).

Valores de hidrofobicidade celular acima de 40% indicam que a superfície celular do microrganismo é altamente hidrofóbica (VASILEVA-TONKOVA; GESHEVA, 2004; CERQUEIRA et al., 2012), valores entre 20% e 40% indicam média hidrofobicidade, e valores inferiores a 20% baixa hidrofobicidade (VASILEVA-TONKOVA; GESHEVA, 2004). Os isolados degradadores de diesel apresentaram maiores valores de hidrofobicidade, onde a maioria dos isolados apresentou hidrofobicidade celular acima de 40%, do que os isolados degradadores de biodiesel (Figura 25). Isso pode ter ocorrido pois as bactérias foram inoculadas em meio mineral com o combustível correspondente ao ambiente do qual foram isoladas (diesel ou biodiesel), sendo que o diesel é considerado um substrato mais hidrofóbico do que o biodiesel (POPOVICHEVA et al., 2014).

A hidrofobicidade da superfície celular é afetada pelo tipo de fonte de carbono na qual o microrganismo foi inoculado (CHRZANOWSKI et al., 2005). O crescimento em diferentes substratos leva a variações no número de células com propriedades superficiais hidrofóbicas ou hidrofílicas, sendo que fontes de carbono mais hidrofóbicas resultam na maior hidrofobicidade celular dos microrganismos, desde que o microrganismo possua capacidade de utilizá-lo (GÓRNA et al., 2011). Assim, um mesmo isolado pode apresentar diferentes graus de hidrofobicidade conforme os componentes hidrofóbicos utilizados (VASILEVA-TONKOVA; GESHEVA, 2004).

Quase todos os isolados degradadores de biodiesel produziram biossurfactantes; porém, sendo que quatro deles (B2, B3, B4 e B7) apresentaram hidrofobicidade acima de 40% em um ou em ambos os substratos avaliados (Figura

24). Os isolados B1 e B9, mesmo produzindo altos valores de biossurfactantes (Tabela 11) apresentaram baixos valores de hidrofobicidade celular em ambos os substratos avaliados (Figura 24). O mesmo não foi verificado para diesel, sendo que o menor valor de hidrofobicidade foi encontrado para D18 (12-17%), um isolado que não produziu biossurfactantes nas condições avaliadas.

Dos isolados degradadores de diesel, três (D10, D14 e D23) apresentaram IE_{24} de 60%, em média (Tabela 11); além deste elevado índice, para estes isolados a adesão a hidrocarbonetos também esteve acima de 40% (Figura 25). Dentre os produtores de biossurfactantes isolados de solo com diesel, o menor valor de hidrofobicidade celular foi referente aos isolados D16, que em tolueno apresentou 24% de hidrofobicidade (porém em xileno a hidrofobicidade foi de 43%), e D17, que apresentou 33% de hidrofobicidade em tolueno e 29% em xileno. Ainda há isolados degradadores que não produziram biossurfactantes, porém apresentaram hidrofobicidade acima de 40% (B2 e D4).

Vasileva-Tonkova e Gesheva (2004) verificaram hidrofobicidade celular (testada em heptano) entre 7,6% a 85,6% durante o cultivo de diferentes isolados bacterianos de solo, a maioria capaz de crescer utilizando hidrocarbonetos como fonte de carbono, cultivados em meio mineral contendo glicose (2%) como única fonte de carbono. Obuekwe et al. (2009) avaliaram 46 isolados capazes de crescer em petróleo bruto e verificaram que 74% dos isolados que apresentaram maior taxa de degradação de hidrocarbonetos (>40%) apresentavam altos níveis de hidrofobicidade celular. O aumento da biodegradação pode ocorrer quando há amplificação da adesão a superfície celular, sendo atribuída principalmente a proteínas e a lipídeos situados na parede celular de uma ampla faixa de microrganismos (CHRZANOWSKI et al., 2005). Em contrapartida, Owsianiak et al. (2009) não verificaram correlação entre biodegradação de diesel e hidrofobicidade celular avaliando 218 isolados capazes de utilizar diesel como única fonte de carbono.

Cerqueira et al. (2012) avaliaram a produção de biossurfactantes pelo índice de emulsificação (IE_{24}) e hidrofobicidade celular (BATH) de 20 isolados bacterianos originários de resíduos petroquímicos. Foram utilizados querosene para o IE_{24} e octano e querosene para a hidrofobicidade celular, sendo que os isolados apresentaram comportamento diferente conforme o hidrocarboneto avaliado. Apenas um do isolados apresentou IE_{24} acima de 40%, sendo que os valores variaram entre

0-40 na presença de células e 0-32 na ausência de células. Ainda, apenas dois isolados apresentaram hidrofobicidade acima de 40%, quando testados com querosene.

Há relatos de correlação entre a produção de biossurfactantes e a hidrofobicidade da superfície celular dos microrganismos, o que demonstraria um efeito benéfico em relação à taxa de degradação de hidrocarbonetos (CHANDRAN; DAS, 2010). Quanto maior o percentual de hidrofobicidade, maior a possibilidade de o microrganismo produzir biossurfactantes e de estes estarem ligados à sua superfície celular e assim haver interação com o contaminante, iniciando a formação de biofilmes para o processo de biodegradação (LIN, 1996).

6 CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que latossolo sem histórico de contaminação possui microbiota autóctone com habilidade de degradar diesel e biodiesel. Tais observações evidenciam o potencial do solo na atenuação natural desses contaminantes, bem como a possibilidade do emprego de outras técnicas de biorremediação como bioestimulação e bioaugmentação realizada com as bactérias isoladas no presente estudo.

Em um cenário de contaminação do solo por derramamento de combustíveis, este perfil microbiano encontrado no solo utilizado é interessante, pois demonstra que parte da microbiota não somente tolerou condições potencialmente tóxicas, mas apresentou a capacidade de aclimatação ao impacto inicial e subsequente participação em processos de descontaminação.

Embora o biodiesel tenda a ser mais biodegradável que hidrocarbonetos de petróleo, este combustível pode exercer pressão seletiva indireta sobre a microbiota, devido à acidificação do solo causada pela sua degradação inicial. Este fenômeno exerceu influência na redução de populações, tanto na diversidade quanto na abundância, biomassa e atividades microbianas, bem como corroborou para que o solo se tornasse prejudicial à germinação de sementes.

Sendo assim, o diesel, no solo em questão, corroborou com o aumento da abundância e diversidade (morfotipos) dos microrganismos, bem como com o incremento dos parâmetros microbianos quando comparados ao biodiesel, independente da concentração dos combustíveis aplicados (5 ou 10%). Além disso, o solo contaminado com diesel apresentou um potencial fitotóxico inferior ao verificado para o mesmo solo contaminado com biodiesel em ambos os organismos testados.

REFERÊNCIAS

- ABBASIAN, F.; LOCKINGTON, R.; MALLAVARAPU, M.; NAIDU, R. A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 3, p. 670-699, 2015.
- ABBASNEZHAD, H.; GRAY, M.; FOGHT, J. M. Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 653-675, 2011.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, n. 7-8, p. 943-951, 2001.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental Pollution**, v. 120, p. 363-370, 2002.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Disponibilidade e demandas de recursos hídricos no Brasil**. Brasília, ANA. 2005. 123 p.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS (ANP). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro: ANP, 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS (ANP). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro: ANP, 2017.
- AKTAS, D. F.; LEE, J. S.; LITTLE, B. J.; RAY, R. I.; DAVIDOVA, I. A.; LYLES, C. N.; SUFLITA, J. M. Anaerobic metabolism of biodiesel and its impact on metal corrosion. **Energy Fuels**, v. 24, p. 2924-2928, 2010.
- ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. 1. ed. London: Academic Press, 1995. p. 214-219.
- ALRUMMAN, S. A.; STANDING, D. B.; PATON, G. I. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. **Journal of King Saud University Science**, v. 27, n. 1, p. 31-41, 2015.
- ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient from CO₂ (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p. 393-395, 1993.
- ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, v. 35, p. 17-43, 2010.
- ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M. A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL'AMICO, E.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. **Chemosphere**, v. 57, p. 401-412, 2004.
- ASHRAFUL, A. M; MASJUKI, H. H; KALAM, M. A; RASHEDUL, H. K; SAIJAD, H. ABE, M. J. Influence of anti-corrosion additive on the performance, emission and engine component wear characteristics of an IDI diesel engine fueled with palm biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 87, p. 48-57, 2014.
- ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v. 45, n. 1, p. 180-209, 1981.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. In: MARSHALL, K. C. **Advances in microbial ecology**, 1992, cap 12, p. 287-338.
- AZAMBUJA, A. O.; CAZAROLLI, J. C.; QUADROS, P. D.; BÜCKER, F.; CORREA, C.; CASAGRANDE, J. C.; FERRÃO, M. F.; CELIKKOL, S.; OGAWA, A.; BONIFAY, V.;

- SUNNER, J. A.; BEECH, I. B.; BENTO, F. M. Effect of Sulfur Content on Microbial Composition and Biodegradation of a Brazilian Diesel and Biodiesel Blend (B10). **Energy Fuels**, v. 31, p. 12305-12316, 2017.
- BALAT, M. Fuel Characteristics and the Use of Biodiesel as a Transportation Fuel. **Energy Sources**, v. 28, p. 855-864, 2006.
- BAMFORTH, S. M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of chemical technology and Biotechnology**, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.
- BAMGBOSE, I.; ANDERSON, T. A. Phytotoxicity of three plant-based biodiesels, unmodified castor oil, and Diesel fuel to alfalfa (*Medicago sativa* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), radish (*Raphanus sativus*), and wheatgrass (*Triticum aestivum*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 268-274, 2015.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, n.2, p.427-444, 2010.
- BANKS, M. K.; SCHULTZ, K. E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 167, n. 1, p. 211-219, 2005.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER Jr., W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 65-68, 2003.
- BENTO, F. M., CAMARGO, F. A. O., OKEKE, B. C., FRANKENBERGER Jr., W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 9, p 1049-1055, 2005a.
- BENTO, F. M., CAMARGO, F. A. O., OKEKE, B. C., FRANKENBERGER Jr., W. T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, v. 160, n. 3, p. 249-255, 2005b.
- BENTO, F. M.; VISCARDI, S. L. R.; DARODA, R.; MENENDEZ, A. G.; CAMARGO, F. A. O.; GAYLARDE, C. C. Suscetibilidade do óleo diesel com 2 e 5% de biodiesel á contaminação microbiana durante a estocagem. **Revista Biodiesel**, v. 4, p. 24-26, 2006.
- BLOCH, H. P. Lubricant testing. BLOCH, H. P. In: **Practical Lubrication for Industrial Facilities**. 1. ed. Lilburn: The Fairmont Press. 2000. cap. 3, p. 33-90.
- BLODGETT, R. **Bacterial Analytical Manual, Appendix 2 Most Probable Number from Serial Dilutions**. Food and Drug Administration (FDA), 2010. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>> Acesso em: nov. 2017.
- 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**, v. 35, n. 17, p. 4208-4216, 2001.
- BÖHME, L; LANGER, U; BÖHME, F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. Agriculture. **Ecosystems & Environment**, v.109, p.141-152, 2005.

- BOLL, M.; HEIDER, J. Anaerobic Degradation of Hydrocarbons: Mechanisms of C-H Bond activation in the absence of oxygen. In: TIMMIS, K. N. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 1012-1024.
- BONA, C.; REZENDE, I. M.; SANTOS, G. O.; SOUZA, L. A. Effect of soil contaminated by diesel oil on the germination of seeds and the growth of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) seedlings. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 1379-1387, 2011.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 63-67, 2000.
- BORDEN, R. C.; GOMES, C. A.; BECKER, M. T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. **Ground Water**, v. 33, n. 2, p. 180-189, 1995.
- BOUAID, A.; MERCEDES, M.; ARACIL, J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. **Fuel**, v. 86, p. 2596-2602, 2007.
- BRADDOCK, J. F.; CATTERALL, P. H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, v. 3, n. 2, p. 81-84, 1999.
- BRIVIO, M.; SCHLOSRIK, J.; AHMAD, M.; TOLON, C.; BUGG, T. D. Investigation of acid-base catalysis in the extradiol and intradiol catechol dioxygenase reactions using a broad specificity mutant enzyme and model chemistry. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 1368-1373, 2009.
- BROOKES, P. C.; POWLSON, D. S.; JENKINSON, D. S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 14, n. 4, p. 319-329, 1982.
- BROOKES, P.C.; JOERGENSEN, R.G. Microbial biomass measurements by fumigation extraction. In: BLOEM, J.; HOPKINS, D.W.; BENEDETTI, A. **Microbiological methods for assessing soil quality**. 1. ed. Wallingford: CABI, 2005. cap. 7, p. 77-83.
- BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N. A.; ROESCH, L. F.; JACQUES, R. J. S.; PERALBA, M. DO C. R.; CAMARGO, F. A. DE O.; BENTO, F. M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 172-178, 2011.
- CAO, B.; NAGARAJAN, K.; LOH, K. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 207-228, 2009.
- CARAVACA, F.; ROLDAN, A. Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. **Geoderma**, v. 117, p. 53-61, 2003.
- CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S.M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. 1. ed. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.
- CECCHIN, I.; REGINATTO, C.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M.; REDDY, K. R. Influence of Physicochemical Factors on Biodiesel Retention in Clayey Residual Soil. **Journal of Environmental Engineering**, n. 142, v. 4, 2016.
- CERNIGLIA, C. E. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Advances in Applied Microbiology**, v. 30, p. 31-71, 1984.
- CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, v.4, n.3, p.331-338, 1993.
- CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI F.; VAINSTEIN, M.; CAMARGO, F.; DOCARMO, R. P. M.; BENTO, F. M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p.

- 11003-11010, 2011.
- CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH E. B.; MABONI, F.; CAMARGO, F. A. O.; PERALBA, M. C. R.; BENTO, F. M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1203-1222, 2012.
- CERQUEIRA, V. S.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 338-345, 2014.
- CHANDRAN, P.; DAS, N. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 2, n. 12, p. 6942-6953, 2010.
- CHANG, Y. Z. D.; GERPEN, V. H. J.; LEE, I.; JOHNSON, A. L.; HAMMOND, G. E.; MARLEY, J. S. Fuel properties and emissions of soybean oil esters as diesel fuel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 11, p. 1549-1555, 1996.
- CHAER, G. M.; TÓTOLA, M. R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.31, n.6, p.1381-1396, 2007.
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n.6, p. 915-929, 2002.
- CHRZANOWSKI, L.; KACZOREK, E.; OLSZANOWSKI, A. Relation between *Candida maltosa* Hydrophobicity and Hydrocarbon Biodegradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 1273–1277, 2005.
- CLAASSENS, S.; VAN RENSBURG, P. J. J.; MABOETA, M. S.; VAN RENSBURG, L. Soil microbial community function and structure in a post-mining chronosequence. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 194, n. 1-4, p. 315-329, 2008.
- CLAXTON, L. D. The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions. Part 3: Diesel and gasoline. **Mutation research/ reviews in mutation research**, v. 763, p. 30-85, 2015.
- COLLA, T. S.; ANDREAZZA, R.; BÜCKER, F.; SOUZA, M. M.; TRAMONTINI, L.; PRADO, G. R.; FRAZZON, A. P. G.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Bioremediation assessment of diesel-biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n.4, p. 2592-2602, 2014.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Emergências Químicas**. Disponível em: <<http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/emergencia/relatorio.php>>. Acesso em: 27 abri. 2018.
- CONFEDERAÇÃO NACIONAL DO TRANSPORTE (CNT). **Pesquisa CNT de rodovias 2009: Relatório gerencial**. Brasília: CNT: SEST: SENAT, 2009.152 p.
- CORRÊA, O. L. S. **Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.102 p.
- CRUZ, J. C.; LOPES P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; TAMADA, I. S.; SILVA, N. M. M. G.; BIDOIA, E. D. Toxicity Assessment of Contaminated Soil Using Seeds as Bioindicators. **Journal of Applied Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2013a.
- CRUZ, J. C.; LOPES P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; TAMADA, I. S.; SILVA, N. M. M. G.; BIDOIA, E. D. Phytotoxicity of Soil Contaminated with Petroleum Derivatives and Biodiesel. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 1, p.

- 49-54, 2013b.
- CRUZ, J. C.; TAMADA, I. S.; LOPES P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; BIDOIA, E. D. Biodegradation and Phytotoxicity of Biodiesel, Diesel, and Petroleum in Soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225, n. 1962, p. 1-9, 2014.
- DADRASNIA, D.; AGAMUTHU, P. Dynamics of diesel fuel degradation in contaminated soil using organic wastes. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 10, p. 769-778, 2013.
- DAWSON, J. J. C.; GODSIFFE, E. J.; THOMPSON, I. P.; RALEBITSO-SENIOR, T. K.; KILLHAM, K. S.; PATON, G. I. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 164-177, 2007.
- DENYER, S. P.; MAILLARD, J. Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 92, p. 35-45, 2002.
- DEON, M. C.; ROSSI, A.; DAL'MAGRO, C.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, n. 1, p. 73-82, 2012.
- DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of biosurfactants. In: KOSARIC, N.; SUKAN, F. V. **Biosurfactants: production, properties, applications**. 1. ed. NainKosaric, University of Western Ontario: London, Canada, 1993. cap. 3, p. 65-97.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M.; Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Manual de métodos de análises de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 212 p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, 2013. 306 p.
- ENEH, O. C. A. Review on petroleum: source, uses, processing, products and the environment. **Journal of applied sciences**, v. 11, n. 12, p. 2084-2091, 2011.
- EVANS, P. J.; LING, W.; GOLDSCHMIDT, B.; RITTER, E. R.; YOUNG, L. Y. Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and ortho-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 496-501, 1992.
- FEELISCH, M.; RASSAF, T.; MNAIMNEH, S.; SINGH, N.; BRYAN, N. S.; JOURD'HEUIL, D.; KELM, M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 13, p. 1775-1785, 2002.
- FERELLA, F.; MAZZIOTTI, G.; MICHELIS, I.; STANISCI, V.; VEGLIO, F. Optimization of the transesterification reaction in biodiesel production. **Fuel**, v. 89, n. 1, p. 36-42, 2010.
- FERREIRA, S. L.; DOS SANTOS, A. M.; SOUZA, G. R. Análise por cromatografia gasosa de btex nas emissões de motor de combustão interna alimentado com diesel e mistura diesel-biodiesel (B10). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 539-545, 2008.
- FINOTTI, A. R.; CAICEDO, N. O. L.; RODRIGUEZ, M. T. R. Contaminações Subterrâneas com Combustíveis Derivados de Petróleo: Toxicidade e a Legislação Brasileira. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 6, n. 2, p. 29-

- 46, 2001.
- FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL HENRIQUE LUIZ ROESSLER – RS (FEPAM). **Acidentes de transporte de produtos e resíduos perigoso**. Porto Alegre – RS. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/emergencia/rel_acidentes.asp?ordem=&pagina_Atual=8>. Acesso em: 25 abr. 2018.
- FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE (FEAM). **Inventário de áreas contaminadas do Estado de Minas: 2015**. Belo Horizonte: FEAM, 2015.
- GARCIA, C.; HERNÁNDEZ, T.; COSTA, F. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 28, n.1, p. 123-134, 1997.
- GHATTAS, A-K.; FISCHER, F.; WICK, A.; TERNES, T. A. Anaerobic biodegradation of (emerging) organic contaminants in the aquatic environment. **Water Research**, v. 116, p. 268-295, 2017.
- GIANFREDA, L.; RAO, M. A.; PIOTROWSKA, A.; PALUMBO, G.; COLOMBO, C. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. **Science of the Total Environment**, v. 341, p. 265-279, 2005.
- GOMES, M. B.; GONZALES-LIMACHE, E. E.; SOUSA, S. T. P.; DELLAGNEZZE, B. M.; SARTORATTO, A.; SILVA, L. C. F.; GIEG, L. M.; SOUZA, R. S.; TORRES, A. P. R.; SOUSA, M. P.; PAULA, S. O.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, V. M. Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 126, p. 231-242, 2018.
- GONG, Z.; LI, P.; WILKE, B. M.; ALEF, K. Effects of vegetable oil residue after soil extraction on physical-chemical properties of sandy soil and plant growth. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 1458-1462, 2008.
- GOODMAN, M. R.; KALEY, E. A.; FINNEY, E. E. Forensic analysis of biodiesel. **Forensic Science International**, v. 263, p. 10-26, 2016.
- GÓRNA, H.; LAWNICZAK, L.; ZGOLA-GRZESKOWIAK, 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**, v. 102, p. 3028-3033, 2011.
- GOSPODAREK, J.; RUSIN, M. Residual effect of soil pollution with oil derivatives on the occurrence of Acarina. **Proceedings of ECOpole**, v. 9, p. 71-77, 2015.
- GOSPODAREK, J.; PETRYSZAK, P.; KOŁOCZEK, H. The effect of the bioremediation of soil contaminated with petroleum derivatives on the occurrence of epigeic and edaphic fauna. **Bioremediation Journal**, v. 20, p. 38-53, 2016.
- GOUDA, M.K.; OMAR, S.H.; NOURELDIN, H.M.; CHEKROUD, Z.A. Bioremediation of kerosene II: a case study in contaminated clay (laboratory and field: scale microcosms). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1451-1460, 2008.
- GOULGING, K. W. T. Soil acidification and the importance of liming agricultural soils with particular reference to the United Kingdom. **Soil Use and Management**, n. 32, v.3, p. 390-399, 2016.
- GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. M. Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 39-45, 2003.
- GOUVEIA, J. L. N.; NARDOCCI, A. C. Acidentes em postos e sistemas retalhistas de

- combustíveis: subsídios para a vigilância em saúde ambiental. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 317-324, 2007.
- GRABOSKI, M. S.; MCCORMICK, R. L. Combustion of fat and vegetable oil derived fuels. In diesel engines. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 24, p. 126-128, 1998.
- GRADY, C. P. L. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 27, n. 5, p. 660-674, 1985.
- GRISHCHENKOV, V. G.; TOWNSEND, R. T.; MCDONALD, T. J.; AUTENRIETH, J. S.; BORONIN, A. M. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v.35, n. 9, p.889-896, 2000.
- GROSSI, V.; CRAVO-LAUREAU, C.; RONTANI, J.-F.; CROS, M.; HIRSCHLER-RÉA, A. Anaerobic oxidation of n-alkenes by sulphate-reducing bacteria from the genus *Desulfatiferula*: n-ketones as potential metabolites. *Research in Microbiology*, v. 162, n. 9, p. 915-922, 2011.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.
- HAMDI, H.; BENZARTI, S.; MANUSADŽINAS, L.; AOYAMA, I.; JEDIDI, N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1926-1935, 2007.
- HAMME, J. D. V.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.
- HAN, J.; JUNG, J.; HYUN, S.; PARK, H.; PARK, W. Effects of nutritional input and diesel contamination on soil enzyme activities and microbial communities in Antarctic soils. **The Journal of Microbiology**, v. 50, p. 916-924, 2012.
- HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1-30, p. 1-15, 2009.
- HATZINGER, P. B.; ALEXANDER, M. Effect of aging chemicals in soil on their biodegradability and extractability. **Environmental Science and Technology**, v. 29, n. 2, p. 537-545, 1995.
- HAWROT-PAW, M.; MARTYNUS, M. The Influence of Diesel Fuel and Biodiesel on Soil Microbial Biomass. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 20, n. 2, p. 497-501, 2011.
- HILL, J.; NELSON, E. J.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 30, p. 11206-11210, 2006.
- HILL, E. C.; HILL, G. C. Microbial contamination and associated corrosion in fuels during storage distribution and use. **Advanced Materials Research**, v. 38, p. 257-268, 2008.
- HOEKMAN, S. K.; BROCH, A.; ROBBINS, C.; CENICEROS, E.; NATARAJAN, M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 1, p. 143-169, 2012.
- HOFFMANN, J.; JENSEN, C. U.; ROSENDAHL, L. A. Co-processing potential of HTL bio-crude at petroleum refineries – Part 1: Fractional distillation and characterization. **Fuel**, v. 165, n. 1, p. 526-535, 2016.

- HUBÁLEK, T.; VOSÁHLOVÁ, S.; MATĚJŮ, V.; KOVÁČOVÁ, N.; NOVOTNÝ, C. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: a case study. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 1-7, p. 1-7, 2007.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; KASCHUK, G.; SOUZA, R. A. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems. **Applied Soil Ecology**, v. 42, n.3, p. 288-296, 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2002. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico - 2000**. Rio de Janeiro: IBGE.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC monographs on the evaluation on the carcinogenic risks to humans**, v. 1–108, 2013. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>>. Acesso em: 03 abri. 2018.
- ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Land use effects on soil quality in a tropical forest ecosystem of Bangladesh. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 79, n. 1, p. 9-16, 2000.
- JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M. A.; CAMARGO, F. A. O., ANTONIOLLI, Z. I. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natureza, UFSM**, v. 29, n. 1, p. 7-24, 2007a.
- JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M. A.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007b.
- JAFARABADI, A. R.; BAKHTIARIA, A. R.; ALIABADIAN, M.; LAETITIA, H.; TOOSI, A. S.; YAP, C. K. First report of bioaccumulation and bioconcentration of aliphatic hydrocarbons (AHs) and persistent organic pollutants (PAHs, PCBs and PCNs) and their effects on alcyonacea and scleractinian corals and their endosymbiotic algae from the Persian Gulf, Iran: Inter and intra-species differences. **Science of the Total Environment**, v. 627, p. 141-157, 2018.
- JAIN, S.; SHARMA, M. P. Stability of biodiesel and its blends: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 667-678, 2010.
- JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil - I. Fumigation with chloroform. **Soil Biology Biochemistry**, v. 8, n. 3, p. 167-177, 1976.
- JONES, D. M.; HEAD, I. M.; GRAY, N. D.; ADAMS, J. J.; ROWAN, A. K.; AITKEN, C. M.; BENNETT, B.; HUANG, H.; BROWN, A., BOWLER, B. F. J.; OLDENBURG, T.; ERDMANN, M.; LARTER, S. R. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. **Nature**, v. 451, n. 7175, p. 176-180, 2008.
- KALBITZ, K.; SCMERWITZ, J.; SCHWESIG, D.; MATZNER, E. Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. **Geoderma**, v. 113, n. 3-4, p. 273-291, 2003.
- KAPLAN, C. W.; KITTS, C. L. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1777-1786, 2004.
- KHAN, N.; WARITH, M. A.; LUK, G. A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms. **Journal of the Air & Waste Management**, v. 57, n. 3, p. 286-296, 2007.
- KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.
- KOLESNIKOVAS, C.; OLIVEIRA E.; DUARTE, U. Avaliação de risco toxicológico

- para hidrocarbonetos totais de petróleo em forma fracionada aplicada à gestão e monitoramento de água subterrânea em um complexo industrial. **Águas Subterrâneas**, v.23, n.01, p.31-44, 2009.
- LABUD, V.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. **Chemosphere**, v. 66, n. 10, p. 1863-1871, 2007.
- LADINO-ORJUELA, G.; GOMES, E.; SILVA, R.; SALT, C.; PARSONS, J. R. Metabolic pathways for degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 237, p. 105-121, 2016.
- LAPINSKIENE, A.; MARTINKUS, P.; REBŽDAITE, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. **Environmental Pollution**, v. 142, n. 3, p. 432-437, 2006.
- LEME, D. M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; RENZ, S.; REINEL, S.; DE OLIVEIRA, D. P.; FERRAZ, E. R. A.; DE MARCHI, M. R. R.; MACHADO, M. C.; ZOCOLO, G. J.; MARIN-MORALES, M. A. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 199-200, p. 343-349, 2012.
- LEUNG, D. Y. C.; KOO, B. C. P.; GUO, Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, n.2, p. 250-256, 2006.
- LI, H.; ZHANG, Y.; KRAVCHENKO, I.; XU, H.; ZHANG, C. Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: a laboratory experiment. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 1003-1013, 2007.
- LIM, M. W.; LAU, E. V.; POH, P. E. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil - Present works and future directions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, n. 1, p. 14-45, 2016.
- LIN, S. Biosurfactants: Recent Advances. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 109-120, 1996.
- LISIECKI, P.; CHRZANOWSKI, L.; SZULC, A.; LAWNICZAK, L.; BIALAS, W.; DZIADAS, M.; OWSIANIAK, M.; STANIEWSKI, J.; CYPLIK, P.; MARECIK, R.; JELEN, H.; HEIPIEPER, H. J. Biodegradation of diesel/biodiesel blends in saturated sand microcosms. **Fuel**, v. 116, p. 321-327, 2014.
- LIU, S.; SULFITA, M. Anaerobic biodegradation of methyl esters by *Acetobacterium woodii* and *Eubacterium limosum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 321-327, 1994.
- LOPES, C. F.; MILANELLI, J. C. C.; PROSPERI, V. A.; ZANARDI, E.; TRUZZI, A. C. Coastal monitoring program of São Sebastião Channel: assessing the effects of "TEBAR V" oil spill on rocky shores populations. **Marine Pollution Bulletin**, v. 34, n. 11, p. 923-927, 1997.
- LOPES, P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; DOMINGUES, R. F.; BIDOIA, E. D. Toxicity and biodegradation in sandy soil contaminated by lubricant oils. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 454-458, 2010.
- MA, X. M.; DING, N.; PETERSON, E. C. Bioaugmentation of soil contaminated with high-level crude oil through inoculation with mixed cultures including *Acremonium* sp. **Biodegradation**, v. 26, p. 259-269, 2015.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 428-434, 2002.
- MALETIĆ, S.; DALMACIJA, B.; RONČEVIĆ, S. Petroleum Hydrocarbon Biodegradability in Soil – Implications for Bioremediation. In: KUTCHEROV, V.;

- KOLESNIKOV, A. **Hydrocarbon**. 1. ed. InTechOpen: Croatia, 2013. cap. 3, p. 43-64.
- MAPA/ACS. **Benefícios ambientais da produção e do uso do biodiesel**. Brasília; 2014.
- MARCHAL, R.; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J.P. Gasoline and diesel oil biodegradation. **Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP**, v. 58, n. 4, p. 441-448, 2003.
- MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 462-468, 1997.
- MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Soil lipase activity—a useful indicator of oil biodegradation. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 859-863, 1999.
- MARGESIN, R.; WALDER, G.; SCHINNER, F. The Impact of Hydrocarbon Remediation (Diesel Oil and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) on Enzyme Activities and Microbial Properties of Soil. *Acta Biotechnology*, v. 20, p. 313-333, 2000a.
- MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, v. 40, n. 4, p. 393-346, 2000b.
- MARGESIN, R.; LABBÉ, D.; SCHINNER, F.; GREER, C. W.; WHYTE, L. G. Characterization of Hydrocarbon-Degrading Microbial Populations in Contaminated and Pristine Alpine Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, 2003.
- MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. 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**, v. 38, p. 346-353, 2007.
- MARIANO, A. P.; TOMASELE, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; CONTIEIRO, J.; ANGELIS, D. F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1323-1328, 2008.
- MARIN, J. A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. **Environmental Research**, v. 98, p. 185-195, 2005.
- MARSCHNER, H.; OBERLE, H.; CAKMAK, I.; RÖMHLED, V. Growth enhancement by silicon in cucumber (*Cucumis sativus*) plantas depends on imbalance in phosphorus and zinc supply. **Plant and Soil**, v. 124, n. 2, p. 211–219. 1990.
- MARTINEZ, E.; CARBONELL, M. V.; FLOREZ, M.; AMAYA, J. M.; MAQUEDA, R. Germination of tomato seeds (*Lycopersicon esculentum* L.) under magnetic field. **International Agrophysics**, v. 23, n. 1, p. 45-49, 2009.
- MATTOS, M. L. T. Microbiologia do Solo. In: NUNES, R. R.; REZENDE, M. O. O. **Recurso solo: propriedades e usos**. 1ed. São Carlos: Cubo, 2015. v. 1, cap. 8, p. 250-272.
- MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2011.
- MEDAURA, M.; ÉRCOLI, E. C. Bioconversion of petroleum hydrocarbons in soil using apple filter cake. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 427-432, 2008.
- MEGHARAJ, M.; SINGLETON, I.; MCCLURE, N. C.; NAIDU, R. Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil. **Archives in Environmental Contamination and**

- Toxicology**, v. 38, p. 439-445, 2000.
- MERCADO, L. W.; TRAMONTINI, L.; BÜCKER, F.; DIAS, R.; QUADROS, P. D.; ZHALNINA, K.; DREW, J.; ANDREAZZA, R.; TRIPLETT, E. T.; FRAZZON, A. P. G.; CAMARGO, F. A. de O.; BENTO, M. F. Culture-Independent Analysis of Bacterial Diversity during Bioremediation of Soil Contaminated with a Diesel-Biodiesel Blend (B10). **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v. 6, n. 6, p. 1, 2015.
- MERCANTE, F. M.; SILVA, R. F.; FRANCELINO, C. S. F.; CAVALHEIRO, J. C. T.; OTSUBO, A. A. Biomassa microbiana, em um Argissolo Vermelho, em diferentes coberturas vegetais, em área cultivada com mandioca. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, n. 4, p. 479-485, 2008.
- MEYER, D. D.; SANTESTEVAN, N. A.; BÜCKER, F.; SALAMONI, S. P.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Capability of a selected bacterial consortium for degrading diesel/biodiesel blends (B20): Enzyme and biosurfactant production. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 47, n. 12, p. 1776-1784, 2012.
- MEYER, D. D.; BEKER, S. A.; BÜCKER, F.; PERALBA, M. C. R.; FRAZZON, A. P. G.; OSTI, J. F.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O., BENTO, F. M. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 356-363, 2014.
- MEYER, D. D.; HECK, K.; ANDRIGHETTI, M.; BENTO, F. M. Microbial activity in two soils with different clay content contaminated by different diesel/biodiesel mixtures. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 17, p. 1175-1183, 2015.
- MIETHE, D.; RIIS, V.; BABEL, W. The Relationship between the Microbial Activity of the Autochthonous Microorganisms of Pristine and Contaminated Soils and their Potential for the Degradation of Mineral Oil Hydrocarbons. **Acta Biotechnologica**, v. 14, n. 2, p. 131-140, 1994.
- MINISTÉRIO DOS TRANSPORTES, PORTOS E AVIAÇÃO CIVÍL (MTPA). **Anuário estatístico de transportes 2010-2016**. Brasília. 2017. 57p.
- MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, v. 27, n.2, p. 165-175, 2004.
- MOLITERNI, E.; JIMÉNEZ-TUSSET, R. G.; VILLAR RAYO, M.; RODRIGUEZ, L.; FERNÁNDEZ, F. J.; VILLASENÑOR, J. Kinetics of biodegradation of diesel fuel by enriched microbial consortia from polluted soils. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, n. 4, p. 749-758, 2012.
- MORALES, G. C. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. 1. ed. México: IMTA, 2004. 188 p.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N. Natural attenuation of contaminated soils. **Environment International**, v.30, n. 4, p. 587-601, 2004.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183-198, 2005.
- NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 6, p. 655-670, 2003.

- NANNIPIERI, P.; BADALUCCO, L. Biological processes. In: BEMBI, D. K.; NIEDER, R. Processes in the Soil–Plant System: Modelling Concepts and Applications. The Haworth Press: Binghamton, NY, 2003. p. 57-82.
- NARASIMHARAO, K.; LEE, A.; WILSON, K. J. Catalysts in production of biodiesel: a review. **Biobased Materials and Bioenergy**, v. 1, p. 19-30, 2007.
- NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: BLACK, C.A. **Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods**. Madison, Soil Science of America and American Society of Agronomy, 1996. p.961-1010.
- NJOKU, K. L.; AKINOLA, M. O.; TAIWO, B. G. Effect of gasoline diesel fuel mixture on the germination and the growth of *Vigna unguiculata* (Cowpea). **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 3, p. 466-471, 2009.
- NOORDMAN, W. H.; JANSSEN, D. B. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4502-4508, 2002.
- OBI, L. U.; ATAGANA, H. I.; ADELEKE, R. A. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2016.
- 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 & Biodegradation**, v. 63, p. 273-279, 2009.
- OGBOGHODO, I. A., IRUAGA, E. K., OSEMWOTA, I. O., CHOKOR, J. U. Na assessment of the effects of crude oil pollution on soil properties, germination and growth of maize (*Zea mays*) using two crude types for cados light and escravos light. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 96, n. 1-3, p. 143-152, 2004.
- OGBOLOSINGHA, A. K.; ESSIEN, E. B.; OHIRI, R. C. Variation of Lipase, Catalase and Dehydrogenase Activities during Bioremediation of Crude Oil Polluted Soil. **Journal of Environment and Earth Science**, v. 5, n. 14, 2015.
- OKOH, A. I. Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 1, n. 2, p. 38-50, 2006.
- OLIVEIRA, L. I.; LOUREIRO, C. O. 1998, Contaminação de aquíferos por combustíveis orgânicos em Belo Horizonte: Avaliação preliminar. In: X Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas. 21 Abril 2000 <<http://www.abas.org/congressos/x1998/art61.html>>. Acesso em: abr. 2016.
- OLIVEIRA, F. C. de.; COELHO, S. T. History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, p. 168-179, 2017.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Proposal for Updating Guideline 208: Terrestrial (Non-Target) Plant Test 208A–Seedling emergence and seedling growth test**. European Committee, Paris, France. P. 208-209, 2000.
- O'ROURKE, D.; CONNOLLY, S. Just oil? The Distribution of Environmental and Social Impacts of Oil Production and Consumption. **Annual Reviews of Environment and Resources**, v. 28, p. 587-617, 2003.
- 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**, v. 84, p. 545-553, 2009.
- PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a

- biofilm. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 577-588, 2007.
- PANDA, S. K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 7, p. 592-597, 2009.
- PARIA, S. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. **Advances Colloid and Interface Science**, 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**, v. 30, n. 10, p.874-879, 2006.
- PASSMAN, F. J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 e a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 88-114, 2013.
- PATZELT, H. Hydrocarbon Metabolism. In: WILEY, J.; SONS. **Encyclopedia of life sciences**, 2007, p 1- 9.
- PAUDYN, K.; RUTTER, A.; ROWE, R. K.; POLAND, J. S. Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming. **Cold Regions Science and Technology**, v. 53, p. 102-114, 2008.
- PEREIRA, S. V.; MARTINEZ, C. R.; PORTO, E. R.; OLIVEIRA, B. R. B.; MAIA, L. C. Atividade microbiana em solo do Semi-Árido sob cultivo de *Atriplex nummularia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 757-762, 2004.
- PEREIRA Jr., N.; GOMES, E. B.; SORIANO, A. U. Biodegradação de Hidrocarbonetos. **Séries em biotecnologia, (Online) Escola de Química/ UFRJ**, v. 75, n. 3, p. 7-74, 2009.
- PEREIRA, L. A. G.; FERREIRA, W. R. Redes de transportes e comércio internacional: uma abordagem geográfica dos fluxos das exportações e das importações de mercadorias em Montes Claros – MG. **Revista Eletrônica de Geografia**, v. 6, n. 17, p. 104-125, 2014.
- PÉREZ, C.; VELANDO, A.; MUNILLA, I.; LÓPES-ALONSO, M.; ORO, D. Monitoring PAH pollution in the marine environment after the Prestige oil-spill by means of seabird blood analysis. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 3, p. 707-713, 2008.
- PESO-AGUIAR, M. C.; SMITH, D. H.; ASSIS, R. C. F.; SANTA-ISABEL, L. M.; PEIXINHO, S.; GOUVEIA, E. P.; ALMEIDA, T. C. A.; ANDRADE, W. S.; CARQUEIJA, C. R. G.; KELMO, F.; CARROZZO, G.; RODRIGUES, C. V.; CARVALHO, G. C.; JESUS, A. C. S. Effects of petroleum and its derivatives in benthic communities at Baía de Todos os Santos/Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 3, p. 459-470, 2000.
- PHILLIPS, T. M.; SEECH, A. G.; LIU, D.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Monitoring biodegradation of creosote in soils using radiolabels, toxicity tests, and chemical analysis. **Environmental Toxicology**, v. 15, n. 2, p. 99-106, 2000.
- 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**, v. 23, n. 5, p. 677-682, 2007.
- PINHO, D. M. M.; SANTOS Jr., V. O.; SANTOS, V. M. L.; OLIVEIRA, M. C. S.; SILVA, M. T.; PIZA, P. G. T.; PINTO, A. C.; REZENDE, M. J. C.; SUAREZ, P. A. Z. Evaluating the use of EN 14078 for determination of biodiesel in diesel blends sold in the Brazilian market. **Fuel**, v. 136, p. 136-142, 2014.
- PLAZA, G.; NAŁĘCZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R. L. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated oil remediation. **Chemosphere**,

- v. 59, n. 2, p. 289-296, 2005.
- PLAZA, G.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I. M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated bioremediated soils. **Jornal of Petroleum Science & Engineering**, v. 50, p. 71-77, 2006.
- POPOVICHEVA, O. B.; KIREEVA, E. D.; STEINER, S.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; PERSIANTSEVA, N. M.; TIMOFEEV, M. A.; SHONIJA, N. K.; COMTE, P.; CZERWINSKI, J. Microstructure and Chemical Composition of Diesel and Biodiesel Particle Exhaust. **Aerosol and Air Quality Research**, v. 14, p. 1392-1401, 2014.
- POUSA, G. P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v.35, n.11, p.5393-5398, 2007.
- PRINCE, R. C.; BARE, R. E.; GARRETT, R. M.; GROSSMAN, M. J.; HAITH, C. E.; KEIM, L. G.; LEE, K.; HOLTOM, G. J.; LAMBERT, P.; SERGY, G. A. Bioremediation of stranded oil on an Arctic shoreline. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 8, n. 3, p. 303-312, 2003.
- PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n.9. p. 671-674, 1997.
- QUADROS, P. D.; CERQUEIRA, V. S.; CAZAROLLI, J. C.; PERALBA, M. do C. R.; CAMARGO, F. A. O.; GIONGO, A.; BENTO, F. M. Oily slugde stimulates microbial activity and changes microbial structure in a landfarming soil. **International Bioderiation & Biodegradation**, v. 115, p. 90-101, 2016.
- RABUS, R.; BOLL, M.; HEIDER, J.; MECKENSTOCK, R. U.; BUCKEL, W.; EINSLE, O.; GOLDING, B. T.; GUNSALUS, R. P.; KRONECK, P. M.; KRÜGER, M.; LUEDERS, T.; MARTINS, B. M.; MUSAT, F.; RICHNOW, H. H.; SCHINK, B.; SEIFERT, J.; SZALENIEC, M.; TREUDE, T.; ULLMANN, G. M.; VOGT, C.; VON BERGEN, M.; WILKES, H. Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: from enzymatic reactions to the environment. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1-3, p. 5-28, 2016.
- RAHMAN, K. S. M.; THAHIRA-RAHMAN, J; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 3, p. 257-261, 2002.
- RAZA, Z. A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M, REHMAN A. Production kinetics and tensioactive characteristics of biosurfactant from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oils. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 20, p. 1623-1631, 2006.
- REHM, H. J.; I. REIFF. Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. In: FIECHTER, A. **Advances in biochemical engineering**, v. 19. Springer-Verlag: Berlin, Germany, 1981. p. 175-215.
- RESTREPO-FLÓREZ, J-M.; BASSI, A.; REHMANN, L.; THOMPSON, M. R. Effect of biodiesel addition on microbial community structure in a simulated fuel storage system. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 456-463, 2013.
- ROBLES-GONZÁLEZ, I. V.; FAVA, F.; POGGI-VARALDO, H. M. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 5, p. 1-16, 2008.
- ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2477-2490, 2009.
- RÖLING, W. F.; MILNER, M. G.; JONES, D. M.; FRATEPIETRO, F.; SWANNELL, R. P.; DANIEL, F. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during

- a field - scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2603-2613, 2004.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v.3, n.4, p.229-237, 2001.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 191-194, 2014.
- ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 9, n. 1, p. 29-33, 1980.
- ROUSK, J.; BROOKES, C.; BÅÅTH, E. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1589-1596, 2009.
- RUFINO, R.D; LUNA, J.M; MARINHO, P.H.C; FARIAS, C.B.B; FERREIRA, S.R.M; SARUBBO, L.A. Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 109, p. 177-122, 2013.
- SAFDARI, M-S.; KARIMINIA, H-R.; RAHMATI, M.; FAZLOLLAHI, F.; POLASKO, A.; MAHENDRA, S.; WILDING, W. V.; FLETCHER, T. H. Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 342, p. 270-278, 2018.
- SALANITRO, J. P.; DORN, P. B.; HUESEMANN, M.H.; MOORE, K. O.; RHODES, I. A.; JACKSON, L. M. R.; VIPOND, T. E.; WESTERN, M. M.; WISNIEWSKI, H. L. Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxicity Assessment. **Environmental Science Technology**, v. 31, p. 1769-1776, 1997.
- SANOMIYA; NAHAS. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 33, n. 5, p. 835-842, 2013.
- SANTOS, D. K. F; RUFINO, R. D; LUNA, J. M; SANTOS, V. A; SALGUEIRO, A. A; SARUBBO, L. A. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v.105, p. 43-50, 2013.
- SASAKI, N.; SUEHARA, H-I.; KOHDA, J.; NAKANO, Y.; YANO, T. Effects of C/N Ratio and pH of Raw Materials on Oil Degradation Efficiency in a Compost Fermentation Process. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 96, n. 1, p. 47-52, 2003.
- SATERBAK, A.; TOY, R. J.; WONG, D. C. L.; MCMAN, B. J.; WILLIAMS, M. P.; DORN, P. B.; BRZUZY, L. P.; CHAI, E. Y.; SALANITRO, J. P. Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 18, p. 1591-1607, 1999.
- SCELZA, R.; RAO, M. A.; GIANFREDA, L. Effects of compost and o bacterial cells on the decontamination and the chemical and biological properties of an agricultural soil artificially contaminated with phenanthrene. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, n. 6, p.1303-1317, 2007.
- SCHLEICHER, T.; WERKMEISTER, R.; RUSS, W.; MEYER-PITTROF, R. Microbiological stability of biodiesel–diesel mixtures. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 724-730, 2008.
- SERRANO, A; GALLEGO, M; GONZÁLEZ, J. L.; TAJADA, M. Natural attenuation of diesel aliphatic hydrocarbons in contaminated agricultural soil. **Environmental**

- Pollution**, v. 151, n. 3, p. 494-502, 2008.
- SEVERINO, L. S.; COSTA, F. X.; BELTRÃO, N. E. M.; LUCENA, M. A.; GUIMARÃES, M. M. B. Mineralização da torta de mamona, esterco bovino e bagaço de cana estimada pela respiração basal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2004.
- SHAHSAVARI, E.; ADETUTU, E. M.; ANDERSON, P. A.; BALL, A. S. Plant residues – A low cost, effective bioremediation treatment for petrogenic hydrocarbon-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 766-774, 2013a.
- SHAHSAVARI, E.; ADETUTU, E. M.; ANDERSON, P. A.; BALL, A. S. Tolerance of selected plant species to petrogenic hydrocarbons and effect of plant rhizosphere on the microbial removal of hydrocarbons in contaminated soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, n. 1495, p. 1-14, 2013b.
- SHAW, L.J.; BURNS, R. Enzyme activity profiles and soil quality. In: BLOEM, J.; HOPKINS, D. W.; BENEDETTI, A. **Microbiological Methods for Assessing Soil Quality**. CABI Publishing: Cambridge, MA, 2006. cap. 17, p. 158-182.
- SHEN, W.; ZHU, N.; CUI, J.; WANG, H.; DANG, Z.; WU, P.; LUO, Y.; SHI, C. Ecotoxicity monitoring and bioindicator screening of oil-contaminated soil during bioremediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 120-128, 2016.
- SHENG, Y.; WANG, G.; HAO, C.; XIE, Q.; ZHANG, Q. Microbial community structures in petroleum contaminated soils at an oil field, Hebei, China. **CLEAN – Soil, Air, Water**, v. 44, p. 829-839, 2016.
- SHUHONG, Y.; LEICHANG, H.; LI, Y. O.; MING, D.; YINGYING, H.; DEWEEN, D. Investigation on bioremediation of oil-polluted wetland at Liaodong Bay in northeast China. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n.4, p. 543-548, 2006
- SIERRA-GARCIA, I. N.; DE OLIVEIRA, V. M. Microbial Hydrocarbon Degradation: Efforts to understand Biodegradation in Petroleum Reservoirs. In: CHAMY, R.; ROSENKRANZ, F. **Biodegradation - Engineering and Technology**. 1. ed. InTech: Rijeka, Croatia, 2013. cap. 3, p. 47-72.
- SILVA, R. L. B.; BARRA, C. M.; MONTEIRO, T. C. N.; BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 1599-1607, 2002.
- SILVA, L. S.; CAMARGO, F. A. O.; CERETTA, C. A. Composição da Fase Sólida Orgânica do Solo. In: MEURER, E. J. **Fundamentos de Química do Solo**. 3. ed. EVANGRAF: Porto Alegre, 2006. cap.3, p. 63-90.
- SILVA, E. E.; AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. **Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO₂)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007.
- SILVA, C. A.; RIBEIRO, C. A. O.; KATSUMITI, A.; ARAÚJO, M. L. P.; ZANDONÁ, E. M.; SILVA, G. P. C.; MASCHIO, J.; ROCHE, H.; ASSIS, H. C. S. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 400-409, 2009.
- SILVA, A. S.; FILHO, A. C.; NAKATANI, A. S.; ALVES, S. J.; ANDRADE, D. S.; GUIMARÃES, M. F. Microbial characteristics of soils under an integrated crop-livestock system. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n.1, p. 40-48, 2015.
- SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review.

- Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 200-216, 2010.
- SOARES, M. K. **Procedimentos da FEPAM no licenciamento de áreas com potencial de contaminação no Estado do Rio Grande do Sul**. In: III Seminário Sul Brasileiro de Gerenciamento de Áreas Contaminadas. Porto Alegre, 2015.
- SOFO, A.; CIARFAGLIA, A.; SCOPA, A.; CAMELE, I.; CURCI, M.; CRECCHIO, C.; XILOYANNIS, C.; PALESE, A. M. Soil microbial diversity and activity in a Mediterranean olive orchard using sustainable agricultural practices. **Soil Use and Management**, v. 30, p. 160-167, 2014.
- SONG, H-G; BARTHA, R. Effects of Jet Fuel Spills on the Microbial Community of Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 646-651, 1990.
- SOUSA, D. Z.; ALVES, J. I.; ALVES, M. M.; SMIDT, H.; STAMS, A. J. M. Effect of sulfate on methanogenic communities that degrade unsaturated and saturated long - chain fatty acids (LCFA). **Environmental Microbiology**, v. 11, 68-80, 2009.
- SOUZA, R. B.; MAZIVIERO, T. G.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PINHEIRO, T. G.; FONTANETTI, C. S. Soil contamination with heavy metals and petroleum derivatives: impact on edaphic fauna and remediation strategies. In: SORIANO, M. C. H. (Ed). **Soil processes and current trends in quality assessment**. 1. ed. InTech Publisher, 2013, cap. 6, pp. 175–203.
- SOUZA, M. M.; COLLA, T. S.; BÜCKER, F.; FERRÃO, M. F.; HUANG, C. T.; ANDREAZZA R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Biodegradation potential of *Serratia marcescens* for diesel/biodiesel blends. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 110, p. 141-146, 2016.
- SPARLING, G. P.; WEST, A. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C labeled cells. **Soil Biology Biochemistry**, v. 20, p. 337-343, 1988.
- STOTZKY, G. Microbial respiration. In: BLACK, C. A.; EVANS, D. D.; WHITE, J. L. **Methods of soil analysis**, v. 2. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p. 1551-1572.
- STROUD, J. L.; PATON, G. I.; SEMPLE, K. T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p. 1239-1253, 2007.
- SUPRIYONO,; SULISTYO, H.; ALMEIDA, M. F.; DIAS, J. M. Influence of synthetic antioxidants on the oxidation stability of biodiesel produced from acid raw *Jatropha curcas* oil. **Fuel Processing Technology**, v. 132, p. 133-138, 2015.
- TAMADA, I. S., LOPES, P. R. M., MONTAGNOLLI, R. N.; BIDOIA, E. D. Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1576-1581, 2012.
- TANG, J.; WANG, R.; NIU, X.; ZHOU, Q. Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms. **Soil and Tillage Research**, v. 110, p. 87-93, 2010.
- TANG, J.; WANG, M.; WANG, F.; SUN, Q.; ZHOU, Q. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. **Journal of environmental sciences**, v. 23, n. 5, p. 845-851, 2011.
- TAYLOR, L. T.; JONES, D. M. Bioremediation of coal tar PAH in soils using biodiesel. **Chemosphere**, v. 44, n. 5, p. 1131-1136, 2001.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solos, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995.174 p.
- TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P. P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXS e processos utilizados na remediação de sítios contaminados.

- Química Nova**, v. 27, n.3, p. 441-446, 2004.
- THOMAS, A. O.; LEAHY, M. C.; SMITH, J. W. N.; SPENCE, M. J. Natural attenuation of fatty acid methyl esters (FAME) in soil and groundwater. **Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology**, v. 50, n. 3, p. 1-17, 2017.
- TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v.14, n.4, p. 1025- 1035, 2010.
- TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. **Tópicos Especiais em Ciências do Solo**, v. 2, n. 1, p. 196-275, 2002.
- TSUCHIYA, T; SHIOTANI, H; GOTO, S; SUGIYAMA, G; MAEDA, A. Japanese standards for diesel fuel containing 5% FAME: investigation of acid generation in FAME blended diesel fuels and its impact on corrosion. **SAE Technical Paper**, v. 2015, p. 6-22, 2006.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Nonpoint Source Guidance**, Office of Water and Office of Water Regulations and Standards, Washington, DC, 1987.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Ecological Effects Test Guidelines: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test.**, 1996.
- VAN BEILEN, J. B.; FUNHOFF, E. G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. **Applied Microbiol Biotechnology**, 74(1), p. 13-21, 2007.
- VAN DER ZAAN, B.M., SAIA, F.T., STAMS, A.J.M., PLUGGE, C.M., DE VOS, W.M., SMIDT, H.; LANGENHOFF, A. A.; GERRITSE, J. Anaerobic benzene degradation under denitrifying conditions: Peptococcaceae as dominant benzene degraders and evidence for a syntrophic process. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 1171-1181, 2012.
- VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p. 703-707, 1987.
- VARJANI, S. J., RANA, D. P., JAIN, A. K., BATEJA, S., UPASANI, V. N. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 103, p. 116-124, 2015.
- VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.
- VASILEVA-TONKOVA, E.; GESHEVA V. Potential for biodegradation of hydrocarbons by microorganisms isolated from Antarctic soils. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, p. 140-145, 2004.
- VIEIRA, T. M.; SILVA, E. P.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; VIEIRA, J. D. G. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2006, Brasília. Anais, p. 218-223, 2006.
- VIEIRA, P. A.; VEIRA, R. B.; DE FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. **Journal Hazardous Material**, v. 140, p. 52-59. 2007.
- VILLALOBOS, M.; AVILA-FORCADA, A. P.; GUTIERREZ-RUIZ, M. E. An Improved

- Gravimetric Method to Determine Total Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 194, n. 1-4, p. 151-161, 2008.
- WEELINK, S. A. B, van EEKERT, M. H. A, STAMS A. J. M. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 9, p. 359-385, 2010.
- WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 259-276, 2011.
- WILKES, H.; KÜHNER, S.; BOLM, C.; FISCHER, T.; CLASSEN, A.; WIDDEL, F.; RABUS, R. Formation of n-alkane and cycloalkane-derived organic acids during anaerobic growth of a denitrifying bacterium with crude oil. **Organic Geochemistry**, v. 34, n. 9, p. 1313-1323, 2003.
- WITT, C.; GAUNT, J. L.; GALICIA, C. C.; OTTOW, J. C. G.; NEUE, H. U. A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p. 510-519, 2000.
- WOLIŃSKA, A.; STEPNIEWSKA, Z. Dehydrogenase activity in the soil environment. In: CANUTO R.A. **Dehydrogenases**. 1. ed. Intech: Rijeka, 2012. cap. 8, p. 183-210.
- XU, J. G.; JOHNSON, R. L. Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. **Plant Soil**, v. 173, p. 3-10, 1995.
- YANG, L.; LI, T.; LI, F.; LEMCOFF, J. H.; COHEN, S. Fertilization regulates soil enzymatic activity and fertility dynamics in a cucumber field. **Scientia Horticulturae**, v. 116, n. 1, p. 21-26, 2008.
- YU, S.H.; KE, L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Environment International**, v 31, p. 149-154, 2005.
- ZHANG, Y.; MILLER, R.M. Effects of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. **Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2247–2251, 1995.
- ZHANG, X.; PETERSON, C.L.; REECE, D.; HAWS, R; MÖLLER, G. Biodegradability of Biodiesel in the Aquatic Environment. **American Society of Agricultural Engineers**, v. 41, n. 5, p. 1423-1430, 1998.
- ZHANG, W.; ZHANG, H.; XIAO, J.; ZHAO, Z.; YU, M.; LI, Z. Carbon nanotube catalysts for oxidative desulfurization of a model diesel fuel using molecular oxygen. **Green Chemistry**, v. 16, p. 211-220, 2014.
- ZIBA.; S.; ALIREZA, R. B.; SAYED-MAHMOOD, G. Biomonitoring of N-alkanes in the Eggs of Four Tern Species Residue in Banifaror Island, Persian Gulf. **Oceanography**, v. 7, n. 25, p. 1-5, 2016.
- ZUCCONI, F., MONACE, A., FORTE, M. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In: GASSER, J. K. R. **Composting of Agricultural and Other Wastes**. Elsevier App. Sci. Publisher, London, England, 1985. p. 73-86.
- ZULETA, E. C.; BAENA, L.; RIOS, L. A.; CALDERÓN, J. A. The Oxidative Stability of Biodiesel and its Impact on the Deterioration of Metallic and Polymeric Materials: a Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 12, p. 2159-2175, 2012.