
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**BIODEGRADAÇÃO E AVALIAÇÃO
FITOTOXICOLÓGICA DO DIESEL E BIODIESEL**

IVO SHODJI TAMADA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Junho - 2013

BIODEGRADAÇÃO E AVALIAÇÃO FITOTOXICOLÓGICA DO DIESEL E BIODIESEL

IVO SHODJI TAMADA

Orientador: Prof Dr. Ederio Dino Bidoia

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada)

Rio Claro – SP
Junho de 2013

576 Tamada, Ivo Shodji
T153b Biodegradação e avaliação fitotoxicológica do diesel e biodiesel / Ivo Shodji Tamada. - Rio Claro, 2013
109 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Ederio Dino Bidoia

1. Microorganismos. 2. Derivados de petróleo e biodiesel. 3. Biorremediação. 4. Toxicologia. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha **Família** e a **Deus**

Ao prof. Dr. Ederio Dino Bidoia pela orientação e horas de conversa e conhecimento.

À CAPES e a Petrobrás pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Recursos Humanos (Prh-05/ANP) pelo apoio e impressão do trabalho.

Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP/ Rio Claro) pela estrutura.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) pelo apoio e confiança.

Ao departamento de Bioquímica e Microbiologia por oferecer estrutura de trabalho e apoio logístico.

A Petrobrás (Replan), a JBS e a Caramuru alimentos por fornecer o material utilizado neste trabalho.

Aos técnicos de departamento José Roberto (Beto), Carmem, Fátima, Luiza (Lú) e Inês por me ajudar inúmeras vezes em momentos de tensão.

Aos amigos de departamento e Laboratório (sem briga, é por ordem de chamada!): Eduardo (Burns), Eduardo (Morales), Érica (Xena), Graziely (Grazy), Jaqueline, Paulo (Chal), Renato (Bill). Pessoas que convivi e aprendi muitas coisas.

Aos amigos de faculdade que morei e tenho muito carinho: Daniel (Jabutí), Eduardo (Dú), Hélio (Lito), Maria (MAB), Nakao, Rafael (Barba), Rafael (Cabeça), Rodrigo (Salsicha), Sayuri e Yuri.

Aos meus amigos de São Paulo, que mesmo distantes tem lugar garantido aqui: Alex, Hideki, Márcio, Paulo, **Kodji**, Rodrigo, Rodrigo, Satiko, Shoiti e Yuh.

A família Neves que sempre me tratou com muito carinho e só tenho a agradecer e, logicamente, a Tatá que teve muita paciência e é uma pessoa que tenho muito carinho!

Aos meus tios e tias que sempre me apoiaram assim como meus primos Dan e Kei.

Pai, Mãe, Shoiti e **Kodji**, *arigatou!*

Resumo

Mudanças climáticas, efeito estufa, degradação do meio ambiente são termos que ultimamente ganharam força devido às catástrofes ambientais mais frequentes. Por isso uma nova consciência sobre formas de energia, produção e consumo marcam esse século. Fontes de energia renovável e/ou menos poluente tem se tornado uma alternativa viável e politicamente correta, como é o caso do biodiesel. O biodiesel puro (B100) é formado, principalmente, pelo processo de transesterificação, no qual a glicerina do óleo vegetal ou gordura animal é removida da molécula. O Conselho Nacional de Políticas Energéticas (CNPE) estabeleceu, de acordo com a Resolução nº 6 de 16 de setembro de 2009, que o diesel comercializado no Brasil deve apresentar 5% de biodiesel em volume, determinação que entrou em vigor no dia 1 de janeiro de 2010. A utilização crescente do biodiesel é evidente em todo o mundo, desta forma este trabalho propõe um estudo de biodegradação do diesel, biodiesel (de origem animal e vegetal) e suas misturas, além de avaliações toxicológicas durante a biodegradação em solo. Para a análise de biodegradação foi utilizado duas técnicas, a de respirometria, utilizando respirômetros de Bartha e método colorimétrico baseada no indicador 2,6-dicloro-indofenol (DCPIP). Para as avaliações toxicológicas foram utilizadas sementes de rúcula (*Eruca sativa*), sementes de alface (*Lactuca sativa*) e sementes de pepino (*Cucumis sativus*), observando a inibição do crescimento de plântulas e o índice de germinação (IG, relação da germinação e crescimento da raiz em comparação ao controle negativo) em 5 tempos de biodegradação em solo, sendo zero, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de biodegradação. A biodegradação pelo método respirométrico mostrou que o biodiesel de origem animal tem maior taxa de degradação e em sistemas que possuem surfactante o favorecimento se dá em misturas com maior porcentagem de diesel. Quanto a colorimetria com DCPIP o biodiesel de origem animal e vegetal se mostraram mais eficientes do que misturas com diesel, quanto maior a porcentagem de diesel nos sistemas mais demorada é a degradação. Os bioensaios de toxicidade utilizando como contaminante o biodiesel de origem animal ou de origem vegetal mostraram aumento na toxicidade em todos os organismos testados de acordo com o tempo de biodegradação em solo. O trabalho demonstrou que apesar do biodiesel ser uma fonte renovável de energia e ter grande apelo ecológico, cuidados devem ser tomados em relação a sua utilização, pois mesmo

apresentando resultados favoráveis quanto a sua biodegradação outros fatores, como sua toxicidade, devem ser levados em consideração para o uso seguro.

Palavras-chave: biodegradação, biorremediação, diesel, biodiesel, toxicologia.

Abstract

Climate change, global warming, environmental degradation are terms that lately gained strength due to environmental disasters more frequent. Therefore a new awareness about energy forms, production and consumption are evident in this century. Source of renewable energy or less polluting has become a viable and politically correct, such the biodiesel. The pure biodiesel (B100) is formed mainly by the transesterification process, which the glycerin of vegetable oil or animal fat is removed from the molecule. The National Energy Policy Council (CNPE) established in accordance with Resolution 6 on September 16, 2009, the diesel sold in Brazil must provide 5% biodiesel by volume, determining which entered into force on January 1, 2010. The increasing use of biodiesel is evident throughout the world, thus this paper proposes to study the biodegradation of diesel and biodiesel (animal and vegetable origins) and mixtures, and toxicology evaluations during biodegradation in soil. For analysis of biodegradation was used two techniques, the respirometry technique using respirometers Bartha & Pramer and colorimetric technique based on indicator 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP). For toxicological evaluations were used seeds of arugula (*Eruca sativa*), lettuce seeds (*Lactuca sativa*) and seeds of cucumber (*Cucumis sativus*), observing the inhibition of seedling growth and germination index (GI, ratio of germination and growth of root compared to the negative control) in 5 days of biodegradation in soil: zero, 30, 60, 90, 120 and 150 days of biodegradation time. Biodegradation by respirometric method showed that biodiesel from animal origin have higher degradation and systems that have surfactant favoritism occur in mixtures with higher diesel. The colorimetry with DCPIP biodiesel of animal fat and biodiesel of vegetable oils are more efficient than mixtures with diesel, the higher the percentage of diesel greater the degradation time. The toxicity bioassays using biodiesel as contaminant of animal or vegetable origin showed an increase in toxicity in all organisms tested according to the time of biodegradation in soil. The study showed that although biodiesel is a renewable energy source and have a great ecological appeal care should be taken in relation to its use, because even with favorable results as its biodegradation other factors such as toxicity, should be taken into consideration for safe use.

Keywords: biodegradation, bioremediation, diesel, biodiesel, toxicology.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1. Petróleo e o panorama internacional.....	13
3.2. Diesel.....	15
3.3. Biodiesel.....	15
3.4. Solo e micro-organismos.....	16
3.5. Biodegradação e biorremediação.....	16
3.6. Ecotoxicologia.....	19
4. METODOLOGIA.....	21
4.1. Substrato base.....	21
4.2. Micro-organismos.....	22
4.3. Contaminantes: diesel e biodiesel.....	22
4.4. Organismos-teste.....	23
4.5. Inóculo.....	23
4.6. Respirimetria.....	24
4.6.1. Reagentes e soluções.....	24
4.6.1.1. Reagentes e soluções utilizados.....	24
4.6.1.2. Preparo dos reagentes e soluções.....	25
4.6.2. Capacidade de campo (CC).....	25
4.6.3. Preparo dos respirômetros.....	26
4.6.4. Acompanhamento da biodegradação.....	28
4.6.5. Modelagem matemática.....	31
4.6.6. Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após respirometria.....	32
4.7. Colorimetria com DCPIP.....	34
4.7.1. Soluções.....	35
4.7.1.1. Soluções utilizadas.....	35
4.7.1.2. Preparo das soluções.....	35
4.7.2. Inóculo aquoso.....	36
4.7.3. Preparo dos sistemas colorimétricos.....	36

4.7.4. Acompanhamento da biodegradação.....	38
4.7.4.1. Medidas quantitativas.....	38
4.7.4.2. Medidas qualitativas.....	39
4.8. Fitotoxicidade.....	40
4.8.1. Descrição dos organismos teste.....	40
4.8.1.1. <i>Eruca sativa</i>	40
4.8.1.2. <i>Lactuca sativa</i>	41
4.8.1.3. <i>Cucumis sativus</i>	41
4.8.2. Soluções.....	42
4.8.2.1. Soluções utilizadas.....	42
4.8.2.2. Preparo das soluções.....	42
4.8.3. Preparo dos bioensaios de toxicidade.....	42
4.8.4. Descrição de dados e análise estatística.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
5.1. Respirometria.....	46
5.1.1. Produção de CO ₂	46
5.1.1.1. Produção semanal de CO ₂	46
5.1.1.2. Produção acumulada de CO ₂	48
5.1.2. Modelagem matemática e análise estatística.....	52
5.2.1.1. Modelagem da produção semanal de CO ₂	52
5.2.2.2 Modelagem da produção acumulada de CO ₂	57
5.2.2.3. Contagem de unidade formadora de colônias (UFC) após respirometria.....	62
5.2. Colorimetria com DCPIP.....	63
5.2.1. Análise quantitativa.....	63
5.2.2. Análise qualitativa.....	69
5.3. Discussão sobre biodegradação.....	79
5.4. Fitotoxicidade.....	80
5.4.1. Bioensaio de fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i>	80
5.4.2. Bioensaio de fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i>	86
5.4.3. Bioensaio de fitotoxicidade com sementes de <i>Cucumis sativus</i> ..	92
5.4.4. Discussão dos bioensaios de fitotoxicidade com sementes.....	98
6. CONCLUSÕES.....	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

Os ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio, oxigênio, entre outros está sendo alterado, principalmente pelo crescimento populacional e o modelo econômico atual (TEIXEIRA e JARDIM, 2004).

De acordo com a Agência Internacional de Energia (IEA, 2011) o gás natural, o petróleo e seus derivados são as maiores fontes de energia utilizadas atualmente e não são renováveis. Graças à escassez desses combustíveis fósseis o biodiesel se torna uma alternativa de fonte de energia (PINTO et al., 2005; GERIS et al., 2007). Ele entra no sistema econômico como um combustível de grande importância devido à alta necessidade energética no país (GERIS et al., 2007).

O Conselho Nacional de Políticas Energéticas (CNPE) estabeleceu através da Resolução nº 6 de 16 de setembro de 2009 que a partir do dia 1 de janeiro de 2010 todo o diesel comercializado no Brasil deve apresentar 5% de biodiesel em sua composição.

Observando uma nova política e consciência em que os recursos renováveis estão mais bem cotados surge um problema, o perigo de contaminação por tais produtos.

No momento em que se pensa que um agente tóxico pode ser qualquer tipo de substância, dependendo das condições de exposição, dose administrada ou adsorvida, frequência, tempo de exposição e via pela qual é administrado, o biodiesel pode ser um agente tóxico (BARROS e DAVINO, 2003).

A toxicologia ambiental estuda os efeitos nocivos de agentes químicos, como o biodiesel, nos seres vivos e, de forma mais integrada com o meio ambiente, levando em consideração os mecanismos ecológicos, tem-se a ecotoxicologia (PASSARELLI, 2003). Segundo Zagatto e Bertoletti (2006), o termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, mas seu conceito somente foi firmado e publicado em 1976 na forma de monografia pelo Comitê Científico sobre Problemas do Meio Ambiente (SCOPE).

Teste de fitotoxicidade é um tipo de teste de toxicidade e, dentro da fitotoxicidade, o teste de germinação e crescimento de sementes é o mais comum. O teste de germinação e crescimento de sementes é realizado em solo ou sistemas hidropônicos, além de poder ser adaptado em outros meios (SUTER, 1993).

Juntamente à ecotoxicologia, estudos que visam remediar a situação causada pelo próprio homem são constantemente realizados, assim como métodos de controle ou mesmo de avaliação de impacto. Uma das metodologias bastante empregada e estudada é a da biorremediação, que consiste no uso de micro-organismos para degradar uma substância poluente, transformando-a em outra com menos toxicidade ou mesmo nenhuma.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste projeto foi avaliar a biodegradação em solo do diesel e do biodiesel em variadas proporções e avaliar a fitotoxicidade desses produtos, de forma separada, mediante sua biodegradação em solo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial do inóculo (consórcio de micro-organismos pré-selecionado do solo) na biodegradação do diesel, biodiesel e suas misturas.

- Avaliar a diferença de biodegradação do biodiesel de origem animal e de origem vegetal de forma separada e em diferentes concentrações no diesel através do método respirométrico (produção de CO₂) e através do método colorimétrico com 2,6- diclorofenol- indofenol (indicador redox).

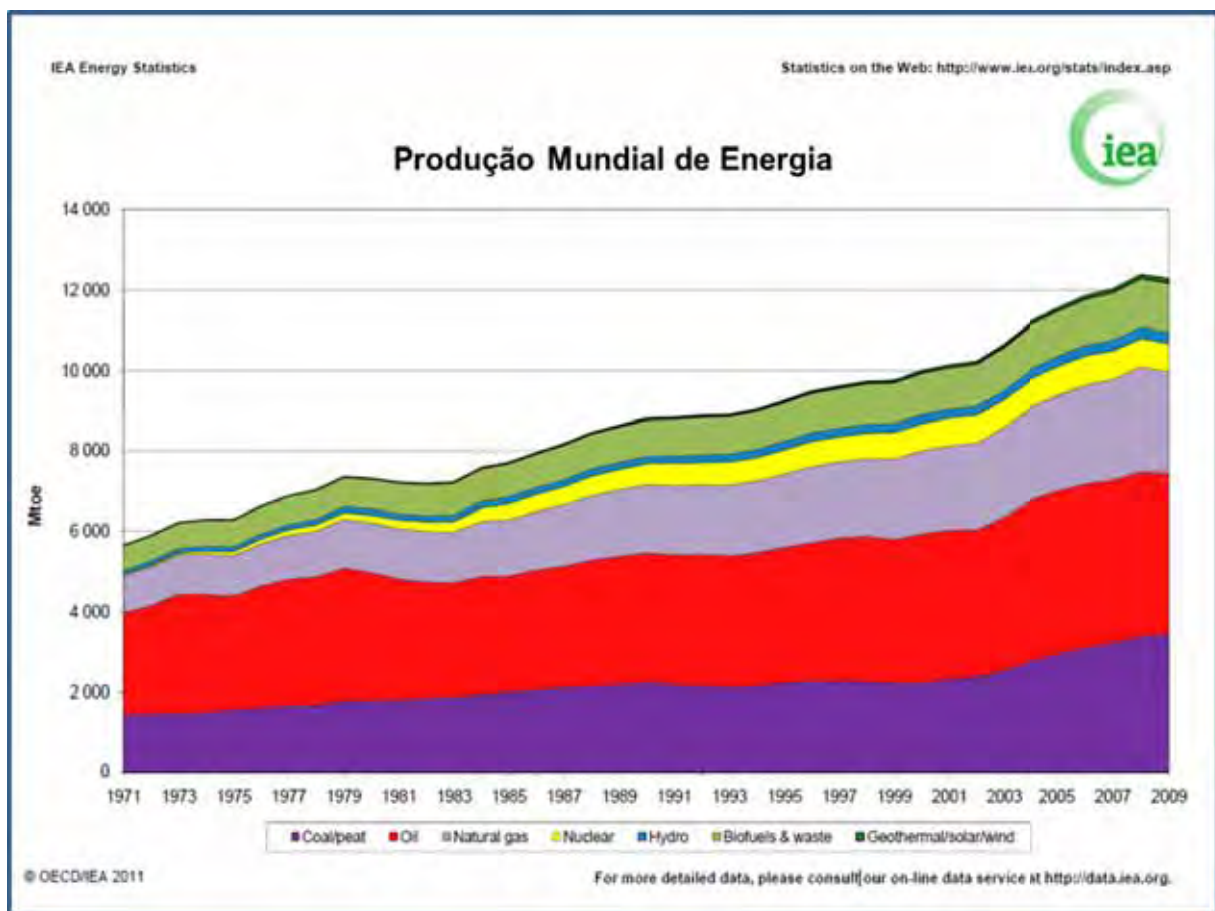
- Monitorar a fitotoxicidade durante a biodegradação do diesel e biodiesel em solo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Petróleo e o panorama internacional

De acordo com a Agência Internacional de Energia, a fonte fóssil de energia (gás natural, petróleo e seus derivados) corresponde a mais de 50% da produção energética atual, de acordo com a Figura 01 (IEA, 2011).

Figura 01 – Produção de energia mundial.



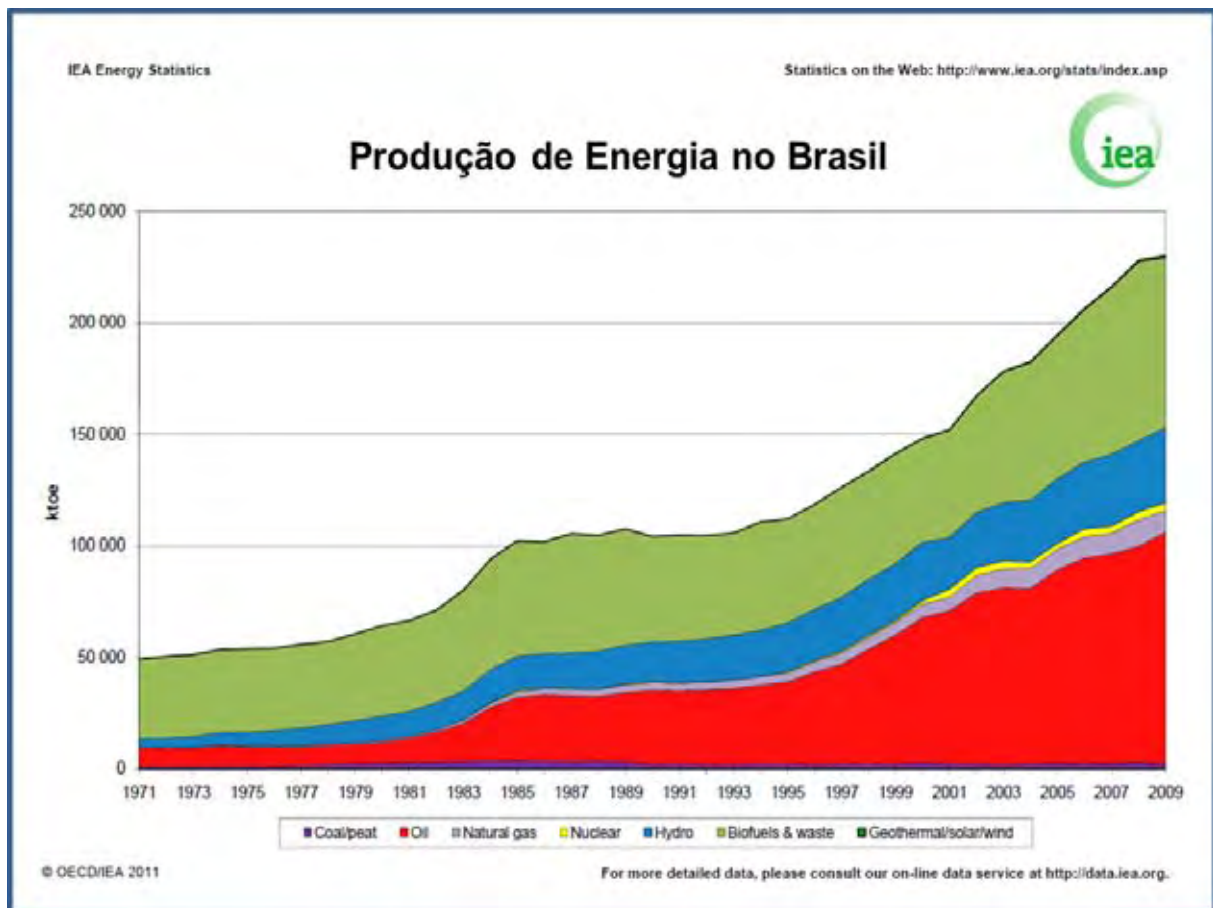
Fonte – www.iea.org. Mtoe: Megatonelada equivalente de petróleo.

Segundo Harayama et al. (1999) a produção de petróleo bruto chega a 3 bilhões de toneladas por ano e cerca de 50% dessa produção é escoada por grandes navios petroleiros, potencializando grandes acidentes marinhos, como o acidente no Alaska do Exxon Valdez no final da década de 80. Mas não somente no transporte que existem riscos de contaminação, acidentes e derramamentos

ocorrem regularmente durante a exploração, produção, refino, transporte e armazenamento de petróleo e produtos petrolíferos, ou seja, durante todo o processo (DAS e CHANDRAN, 2011).

De acordo com a Agência Internacional de Energia o Brasil utiliza muito suas fontes naturais e renováveis de recursos (Figura 02), diferentemente da média mundial (Figura 01) e, de acordo com o Ministério de Minas e Energia (MME, 2011), o Brasil possui emissões de CO₂ bem menores do que a média mundial, isso se deve ao uso de energias renováveis, como o uso de hidrelétricas e biomassa (lenhas, cana e outras).

Figura 02 – Produção de energia do Brasil.



Fonte – www.iea.org. ktce: Quilotonelada equivalente de petróleo.

Os maiores emissores de CO₂ são a China e os Estados Unidos, juntos respondem por 41% das emissões (dados de 2009) do total de 29.380 milhões de toneladas de CO₂, ou seja, cerca de 12.140 milhões de toneladas de emissões de CO₂ (MME, 2011).

3.2 Diesel

O petróleo se apresenta de forma natural como uma mistura complexa de compostos orgânicos da ordem de milhares de compostos, com a maior parte composta por alcanos e uma pequena parte de hidrocarbonetos aromáticos, além de elementos como o oxigênio, nitrogênio e enxofre (HARAYAMA et al., 1999; FETTER, 1993). A origem do petróleo é consequência da não oxidação completa da matéria orgânica por micro-organismos. As condições termoquímicas apropriadas e juntamente com ações microbiológicas dão condições para o processo de formação do petróleo na crosta terrestre (OLLIVIER e MAGOT, 2005).

O diesel tem de 9 a 28 átomos de carbono e por ser derivado do petróleo também apresenta tais elementos, porém em baixas quantidades (DAL FORNO, 2006) e, segundo Penet et al. (2004), o diesel apresenta a maior parte formada por componentes saturados (cerca de 64%), incluídos alcanos ramificados e cíclicos.

3.3 Biodiesel

Com a escassez dos combustíveis fósseis uma solução encontrada foi recorrer a recursos renováveis, como o biodiesel. Com isso o Conselho Nacional de Políticas Energéticas (CNPE) aos poucos introduz cada vez mais biodiesel no diesel comercializado no Brasil. Em 2008 a Resolução nº 2 elevou a porcentagem de 2% para 3%, em 2009 a Resolução nº 6 estabeleceu que a partir do dia 1 de janeiro de 2010 a porcentagem passaria a ser 5%, valor este também utilizado na Europa (PINTO et al., 2005).

Existem várias formas de obtenção do biodiesel, mas a transesterificação é a mais apropriada, pois as características do diesel são mais semelhantes fisicamente dos ácidos graxos e ésteres (MA e HANNA, 1999, GERIS et al., 2007).

O biodiesel ainda está sujeito à degradação por foto-oxidação, o que envolve adição de oxigênio aos ácidos graxos insaturados. O oxigênio adicionado reage com as duplas ligações no óleo, produzindo hidroperóxidos conjugados e não conjugados. A oxidação desse biocombustível pelo contato com o ar se tornou uma preocupação recente, pois com o tempo o biodiesel perde sua qualidade. Tentativas estão sendo realizadas para aumentar a resistência do biodiesel às oxidações. Sabe-se que atualmente alguns fatores afetam a autooxidação de derivados de

gordura, tais como a presença de ar, variações de temperatura e luz, presença de antioxidantes, pró-oxidantes e metais catalíticos (FERRARI e SOUZA, 2009).

3.4 Solo e micro-organismos

Todos os tipos de solo se originam a partir da decomposição das rochas pela ação do intemperismo. Sua formação e composição dependem de uma série de fatores ligados ao tempo e processos físico-químicos e biológicos de decomposição e fragmentação, como: expansão e contração térmica, alteração química, transporte e sedimentação (gravidade, chuvas etc.), transporte eólico, formação do solo orgânico e evolução pedogênica (VARGAS, 1977). Os micro-organismos estão intimamente ligados a formação e decomposição de rochas, acrescentando matéria orgânica e contribuindo na formação pedogênica.

O solo, de modo geral, é composto por 3 partes: sólida, líquida e gasosa (SMILES, 1988). A sólida é formada por uma parte inorgânica (areia, silte e argila) e outra orgânica (ligninas, hemiceluloses, amido, pectina etc.), a líquida é formada por soluções no solo e a parte gasosa pelo ar que circundam a parte líquida e sólida (ZILLI et al., 2003).

Os micro-organismos no solo assumem papel muito importante no processo ecológico. Sendo os decompositores de matéria orgânica os mais comumente conhecidos e citados. Eles transformam substâncias orgânicas em seus componentes básicos: água, gás carbônicos e minerais, além da energia, que volta na forma de calor (PRIMAVESI, 1987).

Os micro-organismos apresentam-se em grande quantidade no solo. Em uma única colher de terra pode se encontrar entre 100 e 200 milhões de micro-organismos, representando somente 0,05% do peso total (PRIMAVESI, 1987).

3.5 Biodegradação e biorremediação

O conceito de degradação está muito ligado a biodegradação, pode-se dizer que a biodegradação é parte do conceito de degradação. Quando uma substância química complexa é convertida em moléculas mais simples temos a degradação. A degradação engloba dois conceitos, a degradação abiótica e biótica ou biodegradação (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

A degradação abiótica pode ocorrer pela fotólise, oxido/redução, hidrólise e reações de troca iônica, por outro lado a biodegradação ocorre pela metabolização das substâncias químicas por parte de micro-organismos presentes no meio ambiente (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). De acordo com Landis e Yu (1998) e Teixeira e Jardim (2004) a biodegradação aeróbia, no momento em que converte um xenobiótico em substâncias mais simples gera água e CO_2 , que é liberado no ambiente. Processos anaeróbios também podem estar presentes na degradação de compostos orgânicos, levando a formação de CO_2 e CH_4 (TEIXEIRA e JARDIM 2004; WIDDEL E RABUS, 2001)

Os micro-organismos transformam milhões de compostos orgânicos e essa transformação de compostos, chamado de biodegradação é a principal guia do ciclo de degradação do carbono. Os compostos derivados do petróleo e óleos vegetais são fontes de carbonos e, por isso, sujeito a biodegradação. Para tanto, micro-organismos especializados ou mesmo selecionados devem agir de forma conjunta a fim de biodegradar tal material, essa “sociedade” de micro-organismos se chama consórcio. Para que ocorra um processo de biodegradação são necessárias as seguintes condições: a disponibilidade do composto alvo aos micro-organismos, proximidade dos compostos aos micro-organismos e a inclusão nos processos metabólicos dos micro-organismos (RÉGIS, 2000, SILVA et al., 2002, INAZAKI, 2003).

A capacidade de micro-organismos utilizarem hidrocarbonetos como fonte de carbono foi apresentado por Zobell em 1946. Além de constatar isso, Zobell verificou que os micro-organismos são amplamente distribuídos na natureza e a utilização de hidrocarbonetos era altamente dependente da natureza química dos compostos formadores da mistura do petróleo e das condições ambientais (ROSATO, 1997).

Como o petróleo se apresenta sempre como uma mistura é de consenso que a sua biodegradação varie conforme sua composição, atividade microbiana, condições ambientais (temperatura, pH e salinidade, por exemplo), quantidade de oxigênio, nutrientes e tempo. Alguns compostos são facilmente evaporados ou biodegradados, enquanto outros persistem na natureza (CHAÎNEAU et al., 2003; LANDIS e YU, 1998; ROSATO, 1997). Segundo Vasudevan e Rajaram (2001), outros fatores também contribuem na biodegradação e posterior biorremediação de locais afetados por petróleo, como nutrientes inorgânicos ou adubos e espécie de micro-organismos utilizados.

A biodegradação de hidrocarbonetos e conversão para CO₂ envolve uma reação de oxidação, por isso a maioria dos micro-organismos são aeróbios, apesar de aparentemente também ocorrer processos anaeróbicos em menor escala na biodegradação de outros compostos (ROSATO, 1997).

Acidentes com petróleo e seus derivados são mais comuns do que se pode imaginar. Os derrames acontecem comumente próximos a plataformas continentais, trazendo riscos a fauna, flora e comunidades antrópicas local.

Os acidentes ambientais com petróleo e seus derivados trazem grandes problemas ambientais, por isso existe a necessidade de combater tais problemas. Tratamentos físicos como o isolamento de áreas contaminadas podem apresentar altos custos e limitações, neste momento surge a biorremediação, um conceito que une a utilização de micro-organismos na metabolização desses contaminantes modificando ou decompondo poluentes, destruindo-o ou tornando o contaminante inofensivo. A biorremediação representa uma tecnologia limpa, simples e de baixo custo em comparação com outras (CUNHA, 1996; ALEXANDER, 1994; VIDALI, 2001). Segundo Das e Chandran (2011) além dos métodos físicos e biológicos existem também os métodos químicos de remoção de hidrocarbonetos em locais contaminados, mas, assim como o método físico, este método é pouco efetivo e pode apresentar alto custo.

Segundo Kostka et al. (2011) a presença de hidrocarbonetos não só provoca seleção de micro-organismos, mas uma sucessão de micro-organismos autóctones que possuem capacidade de biodegradar compostos secundários oriundos do processo de biodegradação. Este fato foi relatado por Mariano et al. (2009), em acidente com diesel provocou uma adaptação dos micro-organismos ao diesel e seus compostos derivados.

O petróleo e seus derivados são formados, em sua maior parte, por compostos apolares, este fato dificulta a interação com micro-organismos, água e solo. As interações podem aumentar com o uso de tensoativos ou surfactantes e assim promover a biodegradação e bioremediação. Os surfactantes produzidos por micro-organismos são chamados biossurfactante que, como os surfactantes, emulsificam compostos insolúveis aumentando sua mobilidade, a biodisponibilidade e subsequente biodegradação (VOLKERING et al., 1998; RAHMAN et al., 2002; RAHMAN et al., 2003).

Atualmente, a biorremediação *in situ*, ou seja, a biorremediação no próprio local desejado é considerada uma alternativa promissora ao utilizar microorganismos na limpeza de compostos tóxicos pela sua diminuição da concentração de determinados poluentes. A compreensão desse processo é importante em casos de derrames de produtos como o petróleo, seus derivados em mares ou rios, além de fornecer alternativas no descarte de produtos potencialmente poluentes (ROSA e TRIGUIS, 2007).

3.6 Ecotoxicologia

A Toxicologia é a ciência que estuda efeitos nocivos de substâncias químicas no organismo decorrente de uma interação (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006; OGA e SIQUEIRA, 2003) variando conforme o tipo de exposição.

Essa ciência é muito antiga e acompanha o desenrolar da história da civilização desde épocas muito remotas, através dos conhecimentos dos efeitos de venenos animais e variedades de plantas tóxicas. Documentos antigos mostram a utilização de substâncias tóxicas a cerca de 1500 a.C., como no Papiro de Ebers, apresentando uma lista com cerca de 800 ingredientes ativos, incluindo metais, venenos de animais e diversos vegetais tóxicos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006; OGA e SIQUEIRA, 2003).

A toxicologia abrange uma área de estudo grande e, importante, envolvendo saúde pública, segurança, estudos de fármacos e agentes tóxicos, estudo forense, entre outros. Pode variar conforme o campo de trabalho: Toxicologia Analítica, Toxicologia Clínica e Toxicologia Experimental (OGA e SIQUEIRA, 2003).

As várias formas de atuação da toxicologia mostra sua grande importância no que diz respeito a análises e estudos de ambientes naturais e artificiais (ambiente de trabalho).

As formas de estudo estão ligadas às áreas de atuação, ou seja, de acordo com a natureza do agente ou como afeta o sistema biológico. As mais importantes áreas e atuação são a toxicologia ambiental, ocupacional, alimentícia, de medicamentos e cosméticos e social (OGA e SIQUEIRA, 2003).

Dentro da Toxicologia, além de estudos de fármacos, existem dois ramos bastante semelhantes de estudo, a Toxicologia Ambiental, que estuda o efeito tóxico de um agente em alguma espécie de ser vivo e a Ecotoxicologia que estuda o

agente tóxico de forma mais integrada ao meio ambiente, tendo em vista os sistemas ecológicos (PASSARELLI, 2003). De acordo com Zagatto e Bertoletti (2006), o conceito sobre ecotoxicologia foi muito discutido no final de década de 70 e atualmente tem-se o conceito como a interação de substâncias natural ou sintética sobre organismos vivos, populações, comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, fazendo parte do conceito a interação com o meio de forma conjunta.

Segundo Zagatto e Bertoletti (2006) o Brasil começou a desenvolver a área de ecotoxicologia através de um programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda em peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas TC147 da International Organization for Standardization (ISO) que acabou por desenvolver e adaptar técnicas de avaliação aguda e crônicas de curta duração utilizando vários organismos-teste. Os organismos-teste podem variar de acordo com o que se está estudando e o que quer obter como resposta, entre outros os organismos teste pode-se citar peixes, crustáceos (daphnia), ratos, pássaros e sementes (STINE e BROWN, 1996; LANDIS e YU 1998; MARIANO et al., 2007; TAMADA et al., 2012a; TAMADA et al., 2012b).

4 METODOLOGIA

O trabalho proposto teve como foco o estudo de biodegradação e avaliação de toxicidade descrita nesta seção.

Os procedimentos experimentais de biodegradação se dividem em duas formas: o método respirométrico (respirometria de Bartha) e o método colorimétrico. Também foi realizada a avaliação de toxicidade ou fitotoxicidade analisando a inibição no crescimento de plântulas de rúcula (*Eruca sativa*), alface (*Lactuca sativa*) e pepino (*Cucumis sativus*).

4.1. Substrato base

A amostra de solo base utilizada nos experimentos de biodegradação foi coletada no jardim experimental na Universidade Estadual Paulista (Unesp), campus de Rio Claro (22°24'39"s, 47°33'39"o). Para as análises de toxicidade foi utilizada areia média de construção peneirada (peneira ABNT de 1,0 mm de abertura).

Tanto a amostra de solo base quanto a areia foram analisadas pelo Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo (ICASA) e suas características estão apresentadas na Tabela 1 abaixo.

Tabela 01 - Características da amostra de solo (solo coletado) e areia

Amostra	Solo	pH CaCl ₂	g/dm ³ MO	mg/dm ³ P res	Classe	Subclasse			
82597 AM	solo coletado	4.4	3	1	Limo areno barrentos	Areno barrento			
82598 AM	areia	6.2	1	5	Limo arenoso	Fino arenoso			

Amostra	Solo	K	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC
82597 AM	solo coletado	0.1	1	1	9	1	2.1	11.2
82598 AM	areia	1	18	1	7	-	20.7	27.8

Amostra	Solo	% V%	Relações Ca/Mg	Mg/K	dS/m Cond. Elétrica
82597 AM	solo coletado	19	1	10	x
82598 AM	areia	74.4	18	1	x

Amostra	Solo	Composição Granulométrica (%)				Densidades		
Amostra	Solo	Areia Grossa	Areia Fina	Argila	Limo	Cascalho	Aparente	Real
82597 AM	solo coletado	53	30	14.1	2.9	x	x	x
82598 AM	areia	31	57	8.3	3.7	x	x	x

Amostra	Solo	mg/dm ³			Micronutrientes (mg/dm ³)			
Amostra	Solo	S	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	B
82597 AM	solo coletado	12	1	1	1.5	0.1	0.5	0.15
82598 AM	areia	14	17	15	6.4	0.3	1.4	0.17

Observações

K, P, Ca, Mg Resina trocada aniônica + catiônica

Fe, Mn, Cu e Zn extrator DIPA-TEA

B Extrator Cloreto de Bário 0,125%

x Análise não solicitada

- Resultado abaixo do limite de detecção

Fonte – Elaborada pelo autor.

4.2 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados em todas as análises são autóctones do solo, obtidos no jardim experimental do Instituto de Biociências na Universidade Estadual Paulista (Unesp), campus Rio Claro, São Paulo, Brasil. Os micro-organismos foram pré-selecionados para a biodegradação dos contaminantes através da realização do inóculo base.

4.3 Contaminantes: diesel e biodiesel

Todos os tratamentos realizados, tanto o de biodegradação quanto de fitotoxicidade respeitam a nomenclatura dada na Tabela 02.

O biodiesel de origem animal e de origem vegetal utilizados neste trabalho foi cedido, respectivamente, pelas empresas JBS e CARAMURU ALIMENTOS S.A.. O diesel utilizado neste trabalho foi cedido pela Replan/Petrobrás.

Somente há uma ressalva no que diz respeito ao biodiesel de origem animal, na realidade ele possui, em sua formação original, cerca de 33% de biodiesel de origem vegetal (óleo de soja) e 67% de biodiesel de origem animal (sebo bovino). Porém, para efeito de estudo, ele foi denominado neste trabalho como BA100 (biodiesel de origem animal).

Tabela 02 - Nomenclatura e caracterização dos contaminantes a serem utilizados nos sistemas

Contaminantes	Caracterização
D	Diesel puro
BA5	95% Diesel + 5% de biodiesel de origem animal
BA10	90% Diesel + 10% de biodiesel de origem animal
BA50	50% Diesel + 50% de biodiesel de origem animal
BA100	Biodiesel de origem animal (2/3 de sebo bovino e 1/3 de óleo de soja)
BV5	95% Diesel + 5% de biodiesel de origem vegetal
BV10	90% Diesel + 10% de biodiesel de origem vegetal
BV50	50% Diesel + 50% de biodiesel de origem vegetal
BV100	Biodiesel de origem vegetal puro

Fonte – Elaborada pelo autor.

4.4 Organismos-teste

Nas avaliações de toxicidade foram utilizados 3 diferentes organismos teste: sementes de *Eruca sativa* (rúcula), *Lactuca sativa* (alface) e *Cucumis sativus* (pepino).

4.5 Inóculo

Para o preparo do método respirométrico foi necessário realizar uma pré-seleção de micro-organismos capazes de biodegradar os contaminantes desejados. Para tanto, foi feito um inóculo base da seguinte forma: em um saco plástico foi colocado 3 kg de areia previamente peneirado (peneira ABNT com malha de 1,0 mm) pesada em balança semi-analítica (Shimadzu BL3200H), 50 mL de uma mistura de diesel e biodiesel de origem animal e vegetal e 100 mL de água destilada, o saco foi fechado e homogeneizado. Após esta etapa o saco plástico foi perfurado com

pequenos furos de aproximadamente 1 mm e espaçamento de cerca de 1 cm cada e enterrado a 15 cm de profundidade durante 30 dias como mostra a Figura 03 (LOPES et al., 2010; LOPES e BIDOIA, 2009; CETESB, 1990).

Figura 03 - Preparação do inóculo base.



Fonte – Elaborada pelo autor.

4.6 Respirometria

Neste trabalho foi utilizado o método respirométrico de Bartha e Pramer (1965) com adaptações. Esta metodologia analisa a biodegradação de diferentes materiais através da produção de CO_2 e, segundo Balba et al. (1998) estudos que envolvem produção de CO_2 geram informações importantes no que diz respeito ao potencial de biodegradabilidade de hidrocarbonetos.

4.6.1 Reagentes e soluções

4.6.1.1 Reagentes e soluções utilizados

Para a realização do método respirométrico utilizou-se os seguintes reagentes, de acordo com a norma L6.350 (CETESB, 1990): KOH 0,2 M; HCl 0,1 M; BaCl_2 0,05 M; $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ 0,2 M (utilizado na padronização do KOH); Na_2CO_3 0,1 M

(utilizado na padronização do HCl); H₂O destilada isenta de CO₂; solução indicadora alaranjado de metila e solução indicadora fenolftaleína.

4.6.1.2 Preparo dos reagentes e soluções

Para o preparo de KOH 0,2 M utilizaram-se 11,2200 g de KOH PA (Synth) pesando em balança analítica da Adam (modelo ADA 210/L) e dissolveu em 1 L de água destilada isenta de CO₂, para a obtenção de água isenta de CO₂ a água foi fervida durante 30 minutos. Para padronização do hidróxido de potássio foi utilizado biftalato ácido de potássio (Impex) previamente seco em estufa a 105°C durante 4 h.

O preparo de HCl 0,1 M foi feito a partir de ácido concentrado (Merck). Diluiu 16,57 mL de ácido concentrado em 2 L de água destilada e para sua padronização utilizou-se carbonato de sódio (Reagen).

No preparo de cloreto de bário 0,5 M pesou-se 6,1000 g de BaCl₂ (Synth) em balança analítica da Adam ADA 210/L e foi diluído em 500 mL de água destilada isenta de CO₂.

No preparo da solução de fenolftaleína foi utilizado 0,2000 g de fenolftaleína e diluído em 60 mL de etanol, após homogeneização completou seu volume de 100 mL com água destilada.

4.6.2 Capacidade de campo (CC)

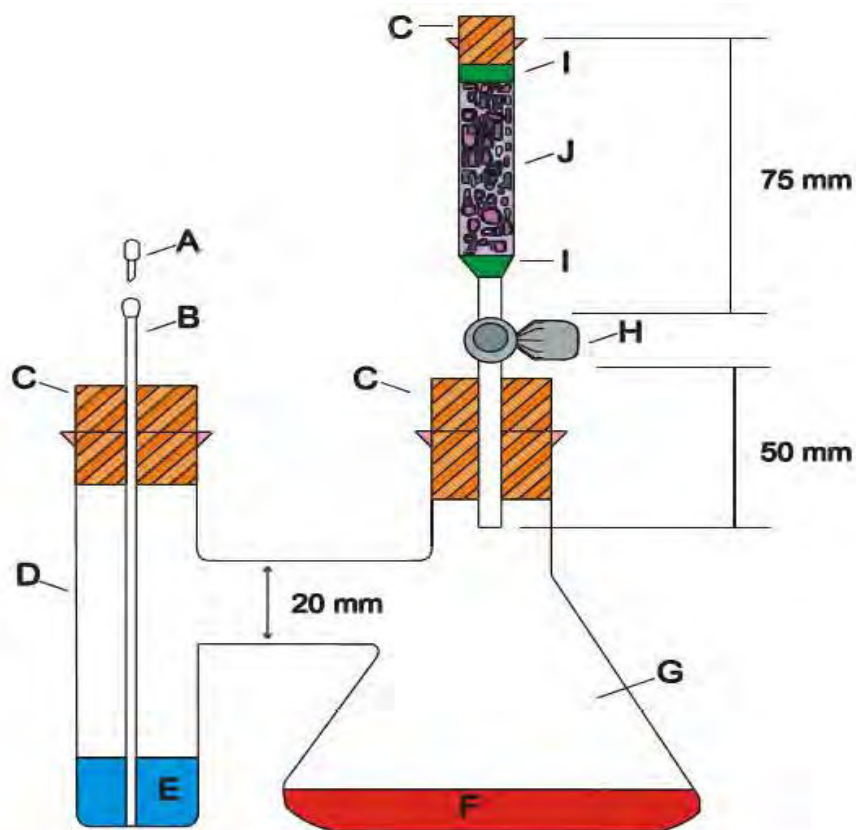
Capacidade de campo é a quantidade máxima que o solo pode reter de água, no caso dos sistemas respirométricos deve se utilizar de 50% a 70% da capacidade de campo. A capacidade de campo é calculada pela diferença de peso de um solo encharcado (100% da capacidade de campo) e o peso seco, ou seja, o peso sem umidade. Para que se perca a umidade deve-se colocar em estufa a 105°C até peso constante. Para análise da capacidade de campo foi realiza em triplicada e tirada a média, o resultado foi estimado para 100 g de solo (CETESB, 1990).

Para alcançar 60% da capacidade de campo deve se conhecer a umidade inicial do substrato a ser utilizado nos respirômetros. Inicialmente foi pesada uma alíquota do substrato e depois submetido a 105°C em estufa até peso constante, a diferença do peso inicial e final em 100 g de substrato é a umidade do substrato.

4.6.3 Preparo dos respirômetros

A metodologia de Bartha é um sistema fechado que apresenta dois compartimentos interligados internamente, em um dos compartimentos possui o material a ser biodegradado e no outro KOH (0,2 M) a ser neutralizado, como mostra a Figura 04.

Figura 04 - Respirômetro de Bartha e Pramer esquematizado (CETESB, 1990).



Fonte – Elaborada pelo autor. A: Tampa da cânula. B: Cânula. C: Rolha de borracha. D: Braço lateral. E: Solução de KOH. F: Meio aquoso com a substância analisada. G: Frasco erlenmeyer (250 mL). H: Válvula. I: Suporte (algodão). J: Filtro de cal sodada.

Inicialmente o substrato (inóculo e amostra de solo) que serviu de base foram misturados com os contaminantes (Tabela 02) antes de serem colocados nos respirômetros (Figuras 05 e 06) e a umidade ajustada para 60% da capacidade de campo. Os respirômetros foram preparados em duplicatas seguindo a Tabela 03, totalizando 22 sistemas.

Figura 05 - Preparo das misturas do substrato com os contaminantes. A: contaminantes (Diesel, BA e BV), B: preparo das misturas a serem utilizadas nos respirômetros.



Fonte – Elaborada pelo autor.

Figura 06 - Preparo concluído e sistemas pronto para incubação. A: vidraria limpa e pronta para uso, B: respirômetros prontos para incubação.



Fonte – Elaborada pelo autor.

Tabela 03 - Composição dos respirômetros de Bartha, onde “solo” significa amostra de solo

Sistemas Respirométricos	Composição
Sistema 01	Branco
Sistema 02	25 g de solo + 25 g de areia + água
Sistema 03	25 g de solo + 25 g de Inóculo + água
Sistema 04	25 g de solo + 25 g de Inóculo + água + Surfactante Tween80
Sistema 05	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL Diesel + água
Sistema 06	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BA5 + água
Sistema 07	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BA10 + água
Sistema 08	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BA50 + água
Sistema 09	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BA100 + água
Sistema 10	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BV5 + água
Sistema 11	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BV10 + água
Sistema 12	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BV50 + água
Sistema 13	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BV100 + água
Sistema 14	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL Diesel + água + Surfactante Tween80
Sistema 15	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BA5 + água + Surfactante Tween80
Sistema 16	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BA10 + água + Surfactante Tween80
Sistema 17	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BA50 + água + Surfactante Tween80
Sistema 18	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BA100 + água + Surfactante Tween80
Sistema 19	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BV5 + água + Surfactante Tween80
Sistema 20	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BV10 + água + Surfactante Tween80
Sistema 21	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BV50 + água + Surfactante Tween80
Sistema 22	25 g de solo + 25 g de Inóculo + 5 mL BV100 + água + Surfactante Tween80

Fonte – Elaborada pelo autor.

4.6.4 Acompanhamento da biodegradação

Os sistemas respirométricos foram incubados em câmara de germinação ao abrigo de luz a 28°C. A biodegradação foi acompanhada através de titulações semanais esquematizada na Figura 07 durante 189 dias.

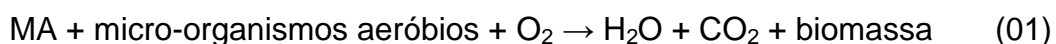
Na medida em que ocorria a biodegradação dos contaminantes os micro-organismos liberaram CO₂ que era “capturado” pelo KOH (10 mL a 0,2 M) localizado no braço lateral dos respirômetros. Após uma semana o KOH residual era titulado com HCl 0,1 M em erlenmeyer de 125 mL. Na titulação era utilizado cloreto de bário (BaCl₂) 0,5 M e 2 gotas de fenolftaleína.

Enquanto ocorria a titulação o ar do respirômetro era renovado, através da utilização de um compressor de ar e um filtro de cal sodada (Vetec PA) localizada na parte superior dos respirômetros.

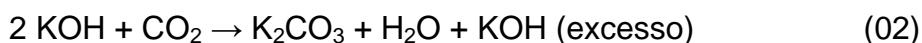
Após a titulação em duplicata de cada sistema e a aeração dos respirômetros a este era colocado novamente 10 mL de KOH 0,2 M no braço lateral para nova leitura na semana seguinte.

Durante o tempo de incubação dos respirômetros e titulação ocorreram as seguintes reações dadas pelas equações de 01 a 05:

Durante período de incubação a matéria orgânica (MA) se oxida (biodegrada):



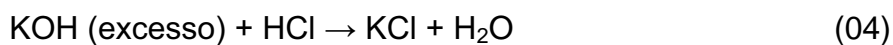
Durante período de incubação ocorre a absorção do CO₂ gerado:



Durante a titulação o cloreto de bário reage com o carbonato de potássio:



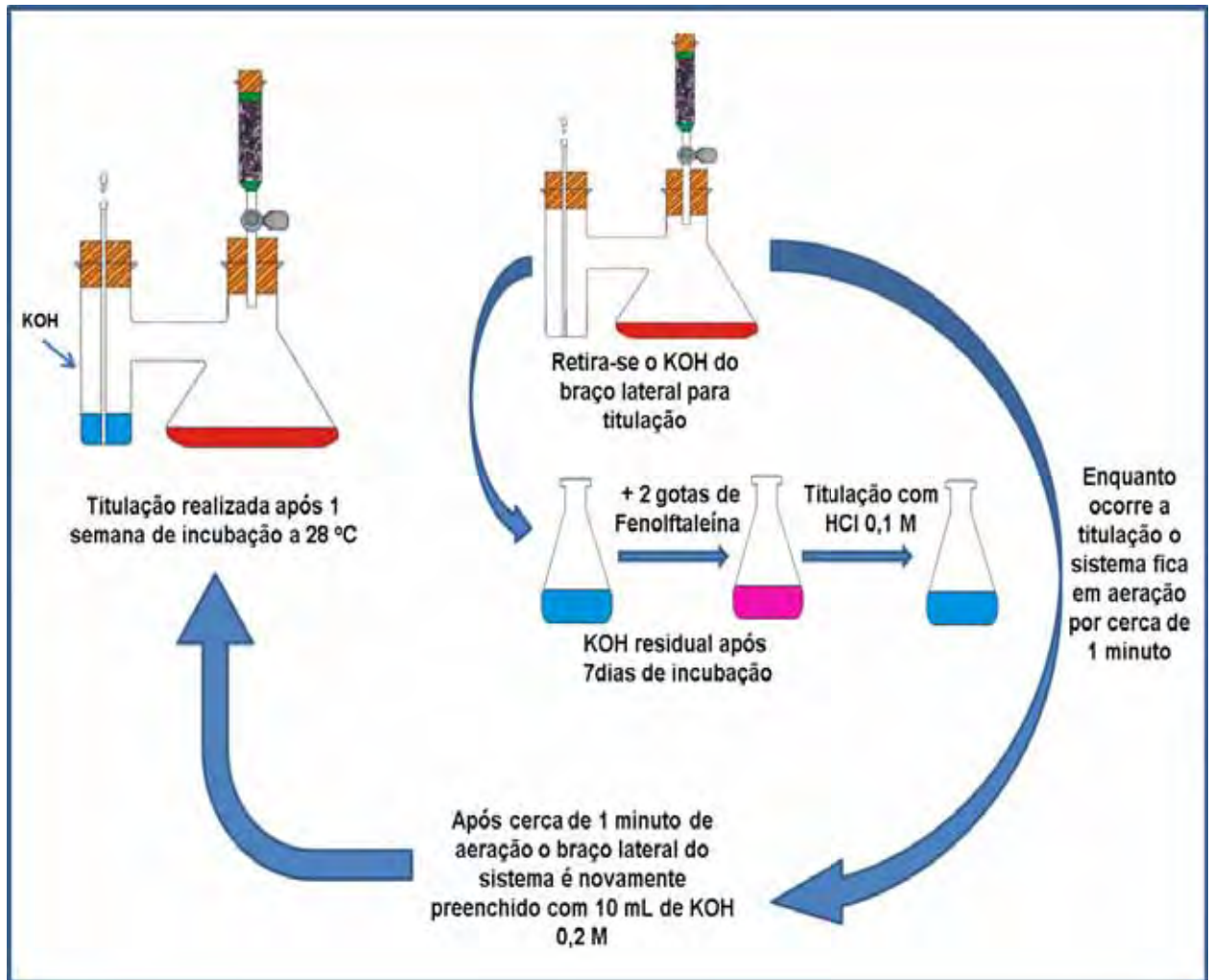
Durante a titulação ocorre a neutralização do excesso de KOH com HCl:



Durante a titulação resultam as substâncias:



Figura 07 - Diagrama de titulação semanal de CO₂.



Fonte – Elaborada pelo autor.

Os dados gerados foram em função do gasto de HCl em mL. Para transformação de mL de HCl para mg de CO₂ deve-se seguir a Equação 06.

$$GCO_2 = (A - B) * 50 * \theta_{HCl} * 0,044 \quad (06)$$

Onde:

GCO₂ = geração de gás carbônico;

A = volume de HCl 0,1 N gasto, em mL, na titulação do branco;

B = volume de HCl 0,1 N gasto, em mL, na titulação da amostra; 50 = fator para transformar equivalente em μmol de CO₂;

f(HCl) = fator do HCl 0,1 N;

0,044 = fator para transformar μmol em mg de CO₂.

4.6.5 Modelagem matemática

Segundo Pala et al. (2006) a modelagem matemática é uma maneira eficiente de mostrar a biodegradação de petróleo em solo e, segundo Kernanshani et al. (2006), a modelagem permite o conhecimento cinético da biodegradação, otimizando e prevendo processos. No presente trabalho uma gama de contaminantes foi utilizada a fim de observar a taxa de biodegradação através da produção de CO₂.

A respirometria foi analisada através de dois parâmetros, a produção semanal de CO₂ dado em mg e a produção acumulada de CO₂ também dados em mg.

Os dados gerados da respirometria foram analisados por ferramentas estatísticas do Systat Sigmastat 10 e os diagramas foram confeccionados pelos Microcal Origin 6.0 e Systat Sigmaplot 10. A plataforma Wolfram Mathematica 6 e o Systat Sigmaplot 10 foram utilizados para ajustes e modelagem de equações.

Schmidt e colaboradores utilizaram uma equação para descrever crescimentos de micro-organismos em meio de cultura, desenvolvida com adaptações segundo Montagnolli (2011) e Montagnolli et al. (2009). A equação 07 foi utilizada para a previsão máxima da produção de CO₂ utilizando como dados a somatória da produção de CO₂ dos respirômetros da Bartha e Pramer.

$$B = B_{\max} / \left(1 + [B_{\max} - B_0 / B_0] e^{-rt} \right) \quad (07)$$

Onde:

B = CO₂ Produzido;

Bmax = Produção máxima de CO₂;

Bo = Produção inicial de CO₂;

r = Taxa máxima de produção específica para determinado óleo;

t = Tempo.

O modelo desenvolvido por Membré e colaboradores foi utilizado para o crescimento de comunidades microbianas, com adaptações feitas por Montagnolli

(2011) e Montagnolli et al. (2009) o modelo foi ajustado afim de analisar as curvas de produção semanal de CO₂ (Equação 08).

$$BR = \left[\left(\frac{1}{K_1} \right) e^{-m_1 t} + \left(\frac{1}{K_2} \right) e^{m_2 t} \right]^{-1} \quad (08)$$

Onde:

B = CO₂ Produzido;

K₁ = Constante de aumento de produção;

K₂ = Constante de diminuição de produção;

m₁ = Taxa de aumento na produção de CO₂;

m₂ = Taxa de diminuição na produção de CO₂;

t = Tempo.

4.6.6 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após respirometria

Após a realização do processo de biodegradação nos respirômetros de Bartha o substrato residual dos sistemas foi submetido a contagem de unidade formadoras de colônia (UFC) para três grupos microbianos (bactérias, fungos e leveduras). Os sistemas respirométricos analisados foram: 02 (Controle), 03 (Inóculo), 04 (Inóculo + surfactante), 05 (Diesel), 08 (BA50), 09 (BA100), 12 (BV50), 13 (BV100), 14, (Diesel + surfactante), 17 (BA50 + surfactante), 18 (BA100 + surfactante), 21 (BV50 + surfactante) e 22 (BV100 + surfactante).

O meio *Count Plate Agar* (PCA) foi utilizado na contagem de UFC de bactérias. Para o preparo, foram pesados em balança analítica da Adam ADA 210/L 23,5000 g de PCA (Scharlau microbiology®) e dissolvido em 1,0 L de água destilada (Figura 08).

O meio Saboraud foi utilizado para contagem de UFC de leveduras. Para o preparo, foram pesados em balança analítica da Adam ADA 210/L 10,0000 g de peptona (Micromed®), 40,0000 g de dextrose (Merck®) e 15,0000 g de agar (Acumedia®) e dissolvidos em 1,0 L de água destilada juntamente com 0,4000 g de cloranfenicol levogiro da INLAB® (Figura 08).

O meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) foi utilizado para contagem de UFC de fungos. Para o preparo, foi pesado em balança analítica da Adam ADA210/L 39,00 g de Difco™ *Potato Dextrose Agar* (BD®) e dissolvido em 1,0 L de água destilada juntamente com 0,4000 g de cloranfenicol levogiro da INLAB® (Figura 08).

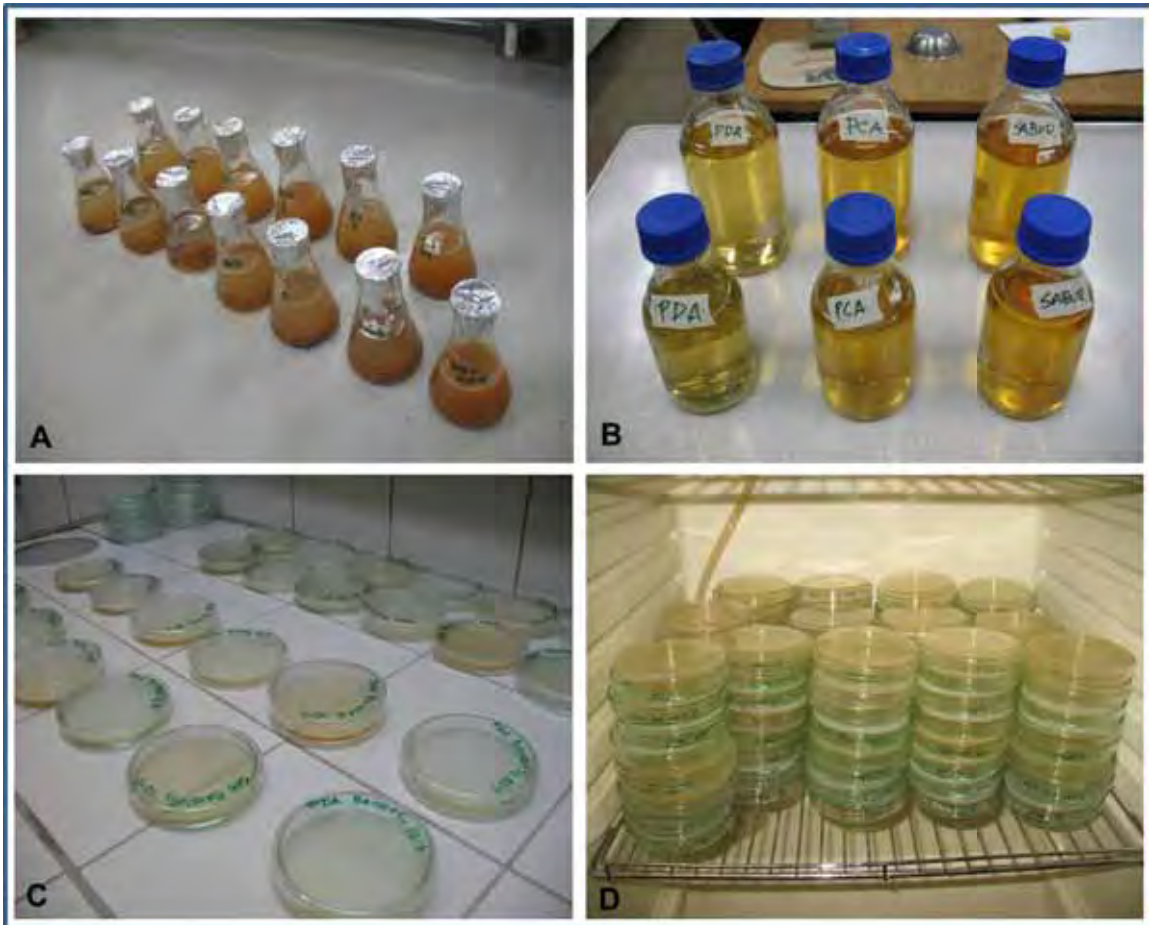
O cloranfenicol foi utilizado com função antibiótica para bactérias no preparo de meios de cultura para contagem de UFC para leveduras e fungos.

Antes do plaqueamento foi necessário preparar as soluções e diluições que foram utilizados. Inicialmente preparou-se uma solução salina de cloreto de sódio 0,85%, para o preparo pesou 0,8500 g de NaCl (Synth®) em balança analítica da Adam ADA 210/L e foi solubilizado em 100 mL de água destilada.

Após o preparo da solução salina 0,85% todos os materiais e solução salina foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C, com exceção dos substratos a serem analisados. Assim, 10 g de amostra do substrato foram colocados em erlenmeyers de 125 mL juntamente com 90 mL de solução salina (Figura 08). Os frascos foram mantido durante 1 h a 180 rpm e, em seguida o líquido foi filtrado com funil e algodão estéril, o lixiviado foi considerado com uma diluição 10^{-1} .

O plaqueamento foi realizado pelo método de *Pour Plate* em duplicata como mostra a Figura 08. Foi inoculado de 1,0 mL de diluições feitas a partir do lixiviado em placas de Petri e, posteriormente, foram adicionadas os meios de cultura (PCA, saboraud ou PDA). As placas com meio PCA foi incubado durante 48 h a 35°C e as placas com os meios saboraud e PDA foram incubadas a 28°C durante 120 h.

Figura 08 – Preparo do plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). A: Substrato em solução salina, B: meios de cultura, C: Plaqueamento em duplicata, D: Incubação das placas.



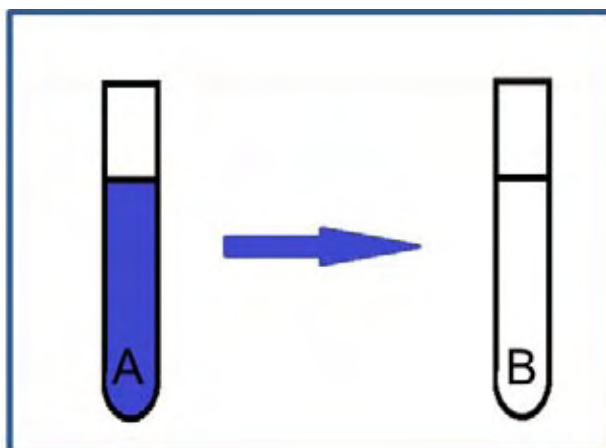
Fonte – Elaborada pelo autor.

4.7 Colorimetria utilizando DCPIP

Este método utiliza um indicador de biodegradação, o 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), que em estado oxidado é azul e após sofrer redução passa a ser incolor (Figura 09). A colorimetria foi utilizado por Hanson et al. (1993) no monitoramentos da biodegradação do petróleo.

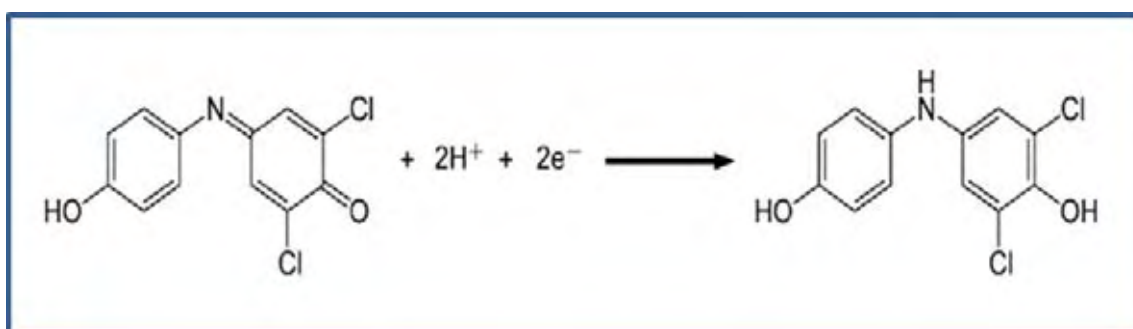
O nitrogênio presente na molécula de DCPIP abaixo (Figura 10) funciona como um aceptor de elétrons mudando a coloração após sofrer redução. A mudança de cor indica troca de elétrons, que é consequência de uma série de reações como a biodegradação dos compostos ou contaminantes (MONTAGNOLLI, 2011).

Figura 09 - Estado oxidado (A) e reduzido (B) do 2,6- diclorofenol-indofenol.



Fonte – Elaborada pelo autor.

Figura 10 -: Reação do 2,6- diclorofenol-indofenol durante sua redução segundo Montagnolli (2011).



Fonte – Montagnolli (2011).

4.7.1 Soluções

4.7.1.1 Soluções utilizadas

Na colorimetria foi utilizado somente duas soluções, o meio Bushnell Hass (meio isento de fontes de carbono) e solução de corante DCPIP (Vetec PA) cuja concentração é de 1000,0 mg/L.

4.7.1.2. Preparo das soluções

Na colorimetria os diferentes contaminantes eram as únicas fontes de carbono para os micro-organismos, por isso foi necessário produzir um meio líquido sem fontes de carbono. O meio utilizado foi o Bushnell Haas (DIFCO, 1984), que era

uma solução composta da seguinte forma: 0,2 g.L⁻¹ de MgSO₄, 0,02 g.L⁻¹ de CaCl₂, 1,0 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 1,0 g.L⁻¹ de NH₄NO₃ e 0,05 g.L⁻¹ de FeCl₃.

Para a solução de DCPIP foi pesado 100,0 mg de 2,6-diclorofenol-indofenol em balança analítica da Adam ADA 210/L e diluído em balão volumétrico de 100 mL.

No preparo do Meio Bushnell Haas e da solução de DCPIP os reagentes foram pesados em balança analítica da Adam ADA 210/L.

4.7.2 Inóculo aquoso

Para preparar os sistemas colorimétricos foi necessário preparar inicialmente um inóculo aquoso. O inóculo aquoso provém da lavagem do inóculo, utilizado nos respirômetros de Bartha.

Foi preparado utilizando 50,00 g de inóculo, pesado em balança semi-analítica da Shimadzu BL3200H, e 50,0 mL de água (previamente esterilizada) permanecendo durante 24 h sob agitação a 180 rpm em uma incubadora shaker de bancada da SOLAB.

Posteriormente, o lixiviado foi filtrado através de um papel filtro e a solução acondicionada em frasco estéril.

4.7.3 Preparo dos sistemas colorimétricos

A Tabela 04 ilustra os sistemas que foram preparados, onde o meio BH (Bushnell Haas) é um meio sem fontes de carbono (DIFCO, 1984).

Tabela 04 -: Composição dos sistemas colorimétricos

Sistemas Colorimétricos	Composição
Br	BH
C	BH+ DCPIP
Ci	BH+ DCPIP + Inóculo aq.
Cis	BH+ DCPIP + Inóculo aq. + Surfactante
S01	BH+ DCPIP + D
Si01	BH + DCPIP + D + Inóculo aq.
Sis01	BH + DCPIP + D + Inóculo aq. + Surfactante
S02	BH+ DCPIP + BA5
Si02	BH + DCPIP + BA5 + Inóculo aq.
Sis02	BH + DCPIP + BA5 + Inóculo aq. + Surfactante
S03	BH+ DCPIP + BA10
Si03	BH+ DCPIP + BA10 + Inóculo aq.
Sis03	BH+ DCPIP + BA10 + Inóculo aq. + Surfactante
S04	BH+ DCPIP + BA50
Si04	BH + DCPIP + BA50 + Inóculo aq.
Sis04	BH + DCPIP + BA50 + Inóculo aq. + Surfactante
S05	BH+ DCPIP + BA100
Si05	BH+ DCPIP + BA100 + Inóculo aq.
Sis05	BH+ DCPIP + BA100 + Inóculo aq. + Surfactante
S06	BH+ DCPIP + BV5
Si06	BH + DCPIP + BV5 + Inóculo aq.
Sis06	BH + DCPIP + BV5 + Inóculo aq. + Surfactante
S07	BH+ DCPIP + BV10
Si07	BH+ DCPIP + BV10 + Inóculo aq.
Sis07	BH+ DCPIP + BV10 + Inóculo aq. + Surfactante
S08	BH+ DCPIP + BV50
Si08	BH + DCPIP + BV50 + Inóculo aq.
Sis08	BH + DCPIP + BV50 + Inóculo aq. + Surfactante
S09	BH+ DCPIP + BV100
Si09	BH + DCPIP + BV100 + Inóculo aq.
Sis09	BH + DCPIP + BV100 + Inóculo aq. + Surfactante

Fonte – Elaborada pelo autor. BH: meio Bushnell Haas. Surfactante: surfactante Tween® 80.

Os ensaios colorimétricos foram preparados da seguinte forma ilustrada pela Tabela 05.

Tabela 05 -: Preparo dos sistemas seguem composição descrita na Tabela 4, onde o “contam.” significa contaminante utilizado

Sistemas Colorimétricos	Volumes					
	Meio BH /μL	DCPIP /μL	Contam. /μL	Inóculo μL	Surfactante (Tween® 80) /μL	Água /μL
Br	7500	-	-	-	-	850
C	7500	400	-	-	-	450
Ci	7500	400	-	200	-	250
Cis	7500	400	-	200	200	50
S01 a S09	7500	400	50	-	-	400
Si01 a Si09	7500	400	50	200	-	200
Sis01 a Sis09	7500	400	50	200	200	-

Fonte – Elaborada pelo autor.

Os tubos foram montados em triplicatas totalizando 91 tubos, sendo 81 tratamentos, 9 controles e 1 branco (Figura 11). Após a preparação dos tubos, cada tubo foi agitado e mantido em incubadora de bancada shaker da Solab a 35°C a 180 rpm.

4.7.4 Acompanhamento da biodegradação

4.7.4.1 Medidas quantitativas

As leituras dos tubos foram realizadas de oito em oito horas com espectrofotômetro da Hach Odyssey DR2500 (Figura 11) no comprimento de 600 nm durante 240 h. Algumas leituras apresentaram descoloração completa antes de 240 h de leitura, por isso foi cessada a leitura em menos tempo.

Figura 11 – Montagem do método colorimétrico.



Fonte – Elaborada pelo autor.

A medida quantitativa foi realizado através da leitura de absorbância e convertidos em mg de DCPIP.

4.7.4.2 Medidas qualitativas

A análise qualitativa tem como objetivo observar a variação da cor dos tratamentos em relação ao tempo. A análise se dá de forma visual, tendo como referência os controles (Br, C, Ci e Cis). As fotos foram tiradas com a mesma intensidade luminosa e com os tubos (sistemas) enfileirados sempre da mesma forma: Br, C, Ci, Cis, Sx, Six e Sisx, onde x é a numeração do tratamento que varia de 01 a 09 (Tabela 04).

Quando o tubo apresenta cor azul, indica que o corante (DCPIP) se apresenta oxidado, ou seja, não ocorreu biodegradação dos contaminantes, mas quando o tubo se apresenta translúcido ou azul mais claro indica que os contaminantes estão se biodegradando, sendo o translúcido o estágio final da biodegradação neste método.

4.8 Fitotoxicidade

O objetivo das avaliações de fitotoxicidade foi observar a variação de toxicidade durante a biodegradação de três diferentes contaminantes em solo. Foram utilizadas nesta avaliação diesel, biodiesel de origem animal e biodiesel de origem vegetal de forma separada.

Os bioensaios de toxicidade foram realizados mediante o tempo de biodegradação dos contaminantes em solo. Foram realizados no total seis bioensaios e serão discutidos na seção “5”.

A avaliação de toxicidade foi baseada em metodologias propostas por Lopes et al. (2010), Morales (2004), Tiquia et al. (1996), USEPA (1996), Dutka (1989), Wang (1987), Tamada et al. (2012a) e Tamada et al. (2012b).

4.8.1 Descrição dos organismos-teste

4.8.1.1 *Eruca sativa*

As sementes de *E. sativa* (rúcula) foram compradas em loja de produtos agropecuários de Rio Claro, SP. As sementes da marca Isla (Figura 12) utilizadas neste trabalho não apresentavam defensivos agrícolas e são todas do mesmo lote 30697-S1. O lote utilizado apresentava como características germinação de 98% e pureza de 100%.

Figura 12 - Embalagem de sementes de *Eruca sativa*.



Fonte – Elaborada pelo autor.

4.8.1.2 *Lactuca sativa*

As sementes de *L. sativa* (alface) foram compradas em loja de produtos agropecuários em Rio Claro, SP. A semente utilizada foi da marca TopSeed (Figura 13), porém esta apresentava defensivo agrícola. Para que o defensivo agrícola não influenciasse no bioensaio, as sementes foram lavadas em água corrente em abundância e secadas com papel toalha antes do preparo do bioensaio. Todas as sementes utilizadas nos bioensaios foram do mesmo lote (lote 020020). O lote apresentava como características germinação de 85% e pureza de 99%.

Figura 13 - Embalagem de sementes de *Lactuca sativa*.



Fonte – Elaborada pelo autor.

4.8.1.3 *Cucumis sativus*

As sementes de *C. Sativus* (pepino) foram compradas em loja de produtos agropecuários em Rio Claro, SP. As sementes da marca Isla (Figura 14) utilizadas neste trabalho não apresentavam defensivos agrícolas e são todas do mesmo lote 32102-S2. O lote apresentava como características das sementes germinação de 88% e pureza de 100%.

Figura 14 - Embalagem de sementes de *Cucumis sativus*.



Fonte – Elaborada pelo autor.

4.8.2 Soluções

4.8.2.1 Soluções utilizadas

Somente foi utilizado sulfato de zinco a 0,05 M no preparo do controle positivo, no restante dos tratamentos foi utilizado água desionizada.

4.8.2.2 Preparo das soluções

Para o preparo da solução de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) a 0,05 M foi utilizado sulfato de zinco PA (Grupo Química). Foi preparado 250 mL de solução, para isso pesou-se 3,594 g de $ZnSO_4$ em balança analítica da Adam ADA 210/L que foi dissolvido em água destilada e guardado em frasco de vidro.

4.8.3 Preparo dos bioensaios de toxicidade

Os bioensaios de toxicidade foram realizados a cada 30 dias de biodegradação, ilustradas na Figura 15.

Foram feitas 6 análises de toxicidade de acordo com o tempo de biodegradação em solo: zero (t_0), 30 dias (t_{30}), 60 dias (t_{60}), 90 dias (t_{90}), 120 dias (t_{120}) e 150 dias (t_{150}).

Figura 15 - Montagem da avaliação de toxicidade. A: organismos testes utilizado, B: bioensaios de toxicidade.



Fonte – Elaborada pelo autor.

Para os bioensaios foram montados misturas contendo areia peneirada (ABNT 1,0 mm), contaminante (D, BA ou BV) e água destilada na proporção 100 g:10 mL:5 mL. Esta mistura foi enterrada e alíquotas foram retiradas a cada 30 dias para a realização dos bioensaios (Figura 16).

Figura 16 - Solos sendo enterrados para análise posterior de toxicidade.



Fonte – Elaborada pelo autor.

Para os bioensaios de fitotoxicidade foram utilizadas sementes de *Eruca sativa* (rúcula), *Lactuca sativa* (alface) e *Cucumis sativus* (pepino).

Para cada tratamento foram utilizados 3 copos plásticos de café (copo de 50 mL) contendo 50,00 g da alíquota, pesadas em balança semi-analítica da Shimadzu BL3200H. Cada réplica foi montada com 10 sementes de *E. sativa* ou *L. sativa*, 2 mL de água desionizada cobrindo o solo com um filme de PVC. Os bioensaios foram mantidos por 120 h em câmara de germinação (BOD) da Solab SL224 a 22°C e, posteriormente, observada a germinação (Figura 15). Foi montado também um controle positivo com adição de 2,0 mL de sulfato de zinco 0,05 M e um controle negativo contendo apenas o solo, sem qualquer tipo de contaminante, para testar a viabilidade das sementes utilizadas simultaneamente aos bioensaios da fitotoxicidade.

Para o *Cucumis sativus* foi utilizada a mesma metodologia da *E. sativa* e *L. sativa* com algumas adaptações, ou seja, utilizando copos de 100 mL e 100,00 g de solo pesadas em balança semi-analítica da Shimadzu BL3200H. Estas adaptações permitiram acomodar melhor as sementes do *Cucumis sativus*, pois estas são maiores que as sementes de *E. sativa* e *L. sativa*.

4.8.4 Descrição de dados e análise estatística

Para a análise descritiva dos bioensaios os parâmetros foram a inibição do hipocótilo e raiz em relação ao controle e o Índice de Germinação (IG, relação da germinação e crescimento da raiz em comparação ao controle negativo) como referência de toxicidade, como indicado na Equação 09 (MORALES, 2004; TIQUIA et al., 1996).

Esta avaliação constitui um recurso prático, de baixo custo, e de sensibilidade razoável na indicação qualitativa da presença de substâncias tóxicas ou inibidores biológicos (INAZAKI et al., 2001).

$$IG = \frac{(\%Germinação) \times (\%Crescimen\text{o da Raiz})}{100\%} \quad (9)$$

Onde:

IG= Índice de germinação

%Germinação= razão entre germinação do tratamento e germinação do controle;

%Crescimento da Raiz= razão entre o crescimento da raiz do tratamento e crescimento da raiz do controle.

Para a análise estatístico do crescimento de plântula foi utilizado o teste de análise de variância para dados não paramétricos de Kruskal-Wallis (Ayres et al., 2007). Esta análise foi utilizada porque os dados não apresentaram normalidade e homocedasticidade necessários para a utilização de análise paramétrica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Respirometria

Para o preparo dos sistemas respirométricos inicialmente foi necessário descobrir a capacidade de campo e ajustar a umidade do substrato base dos respirômetros a 60% da capacidade de campo. A capacidade de campo foi de 18,939 g de água /100 g de solo. A umidade do substrato base foi de 1,0395 g de água para 100 g de solo, o que representa 5,49% da capacidade de campo, para completar 60% da capacidade de campo deve se acrescentar nos respirômetros 54,51%, ou seja, 10,32 mL de água em 100 g de substrato.

Os resultados do método respirométrico de Bartha têm sempre como base dois controles, um somente com inóculo e outro com inóculo e Surfactante Tween[®] 80 (surfactante químico). Os resultados estão em forma de Tabelas e Figuras que serão discutidos a seguir.

5.1.1 Produção de CO₂

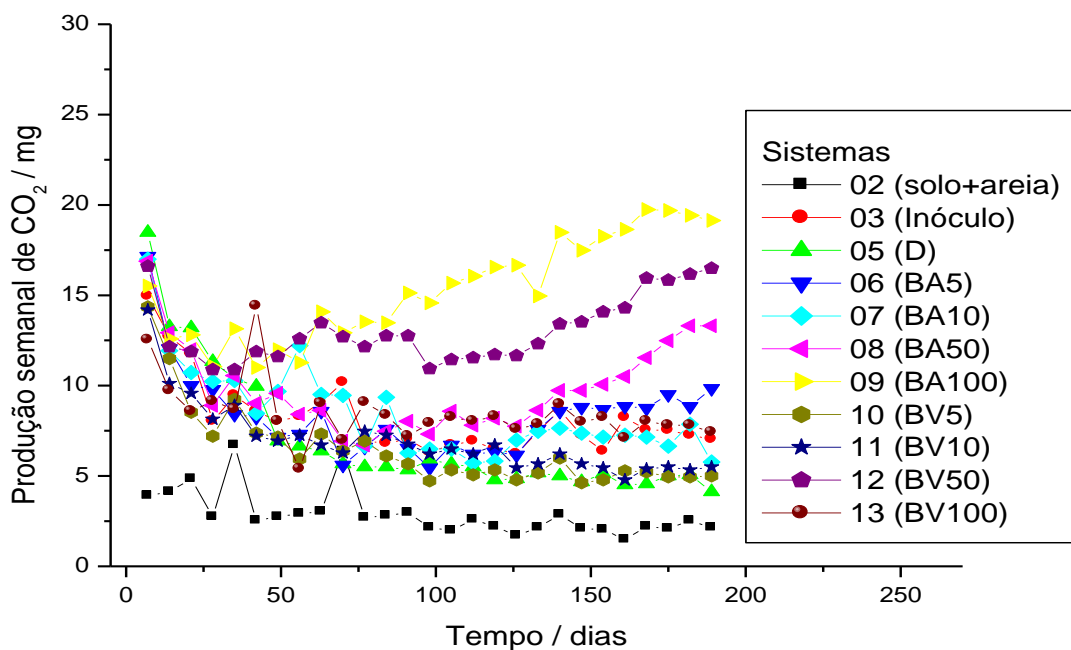
Os dados de produção de CO₂ foram analisados de duas formas, produção semanal e produção acumulada de CO₂.

5.1.1.1 Produção semanal de CO₂

A respirometria mostrou resultados expressivos no que diz respeito à biodegradação dos contaminantes, com destaque para os sistemas 08 (sistema com BA50), 09 (sistema com BA100) e 12 (sistema com BV50), ilustrado na Figura 17.

Todos os sistemas sofreram variações na produção de CO₂ com destaque no tempo inicial, pois todos os sistemas sofreram queda inicial nos valores de produção de CO₂. Com algumas variações, os sistemas 08, 09 e 12 se destacaram por variar de forma significativa de acordo com o tempo, aumentando a produção semanal no período final de avaliação (Figura 17).

Figura 17 - Sistemas respirométricos sem surfactante Tween® 80, produção semanal de CO₂ em mg.

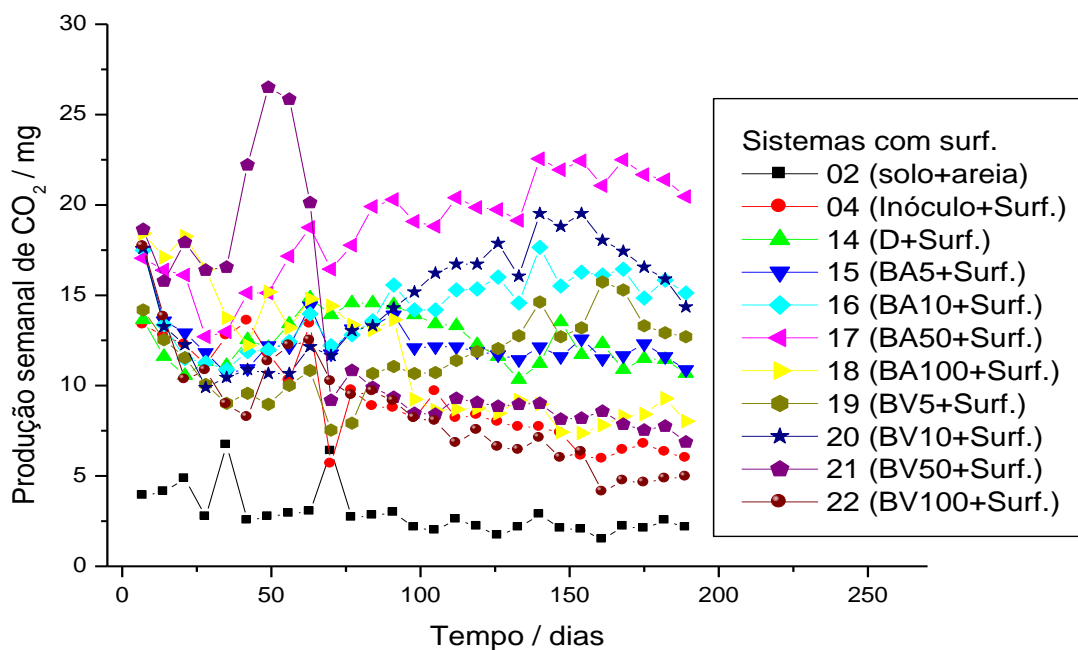


Fonte – Elaborada pelo autor.

Nos sistemas que possuíam surfactante (Figura 18) os valores semanais de produção de CO₂ apresentaram grande flutuação. Pode-se destacar o sistema 17 (BA50+Surf.) que apresentou uma produção semanal de CO₂ superior aos outros sistemas.

Pode-se observar na Figura 18 que os sistemas que possuíam menores quantidades de biodiesel (5% e 10%), além do próprio diesel puro, apresentaram melhor produção de CO₂.

Figura 18 - Sistemas respirométricos com surfactante Tween[®] 80, produção semanal de CO₂ em mg.



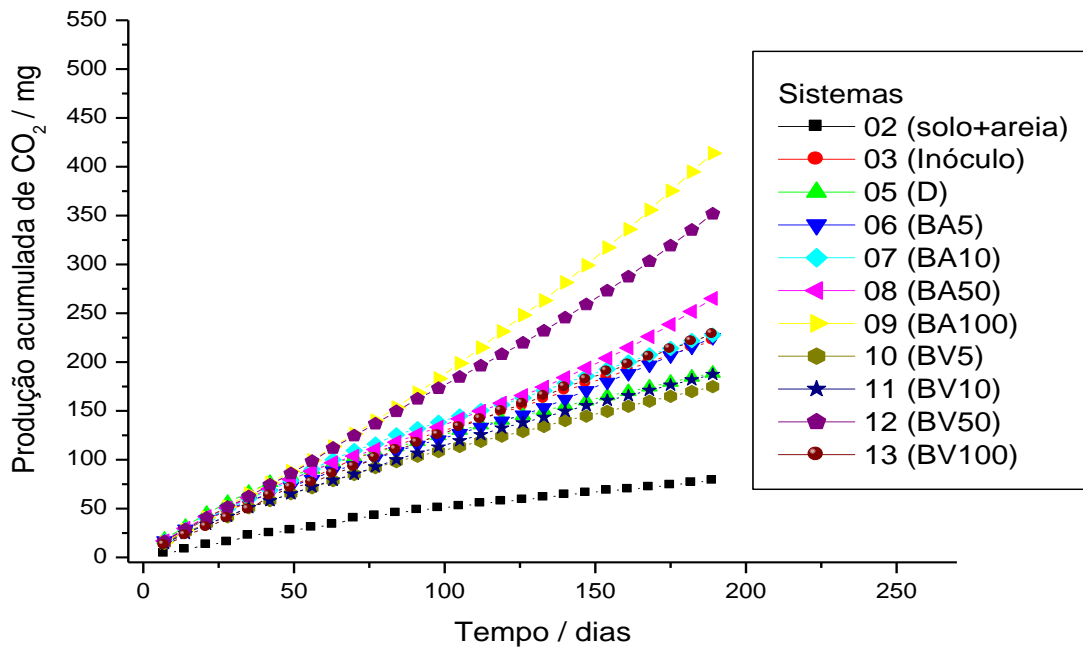
Fonte – Elaborada pelo autor.

5.1.1.2 Produção acumulada de CO₂

A produção de CO₂ foi contabilizada de forma acumulativa, como expressam as Figuras 19 e 20.

Nos sistemas sem a presença de surfactante Tween[®] 80 os sistemas 08, 09, e 12 (BA50, BA100 e BV50) apresentaram maior produção acumulada de CO₂. A maior acumulação foi o sistema 09 seguido pelo 12 e depois o sistema 08. Muitos tratamentos apresentaram pouca produção de CO₂ chegando a ter menor produção que o controle (Inóculo). O fato de ocorrer menor produção de CO₂ pode estar ligado a biodegradação dos contaminantes no solo e formação de compostos secundários tóxicos aos micro-organismos biodegradadores.

Figura 19 - Sistemas respirométricos sem surfactante Tween[®] 80, produção semanal de CO₂ em mg.



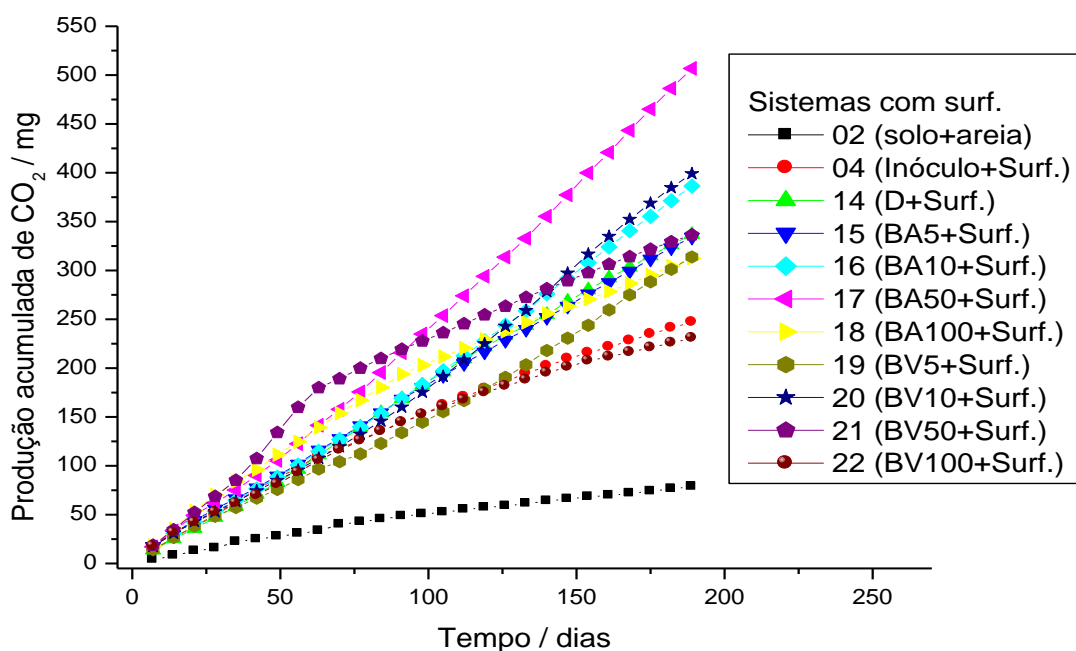
Fonte – Elaborada pelo autor.

Na Figura 20, o sistema 17 (BA50+Surf.) apresentou maior produção de CO₂, após 91 dias de incubação.

O sistema 21 (BV50+Surf.) indicou em 126 dias um grande potencial de biodegradação, apresentando produção acumulada de CO₂, de 263,39 mg, mas após 126 dias de biodegradação apresentou queda na taxa de produção semanal e, conseqüentemente, na produção acumulada.

Observando a Figura 20 pode-se notar que todos os sistemas se beneficiaram com a adição do surfactante, exceto o sistema 22. Apresentando melhora na produção de CO₂ em relação ao controle com inóculo (sistema 04).

Figura 20 - Sistemas respirométricos com surfactante Tween[®] 80, produção acumulada de CO₂ em mg.



Fonte – Elaborada pelo autor.

Pode-se observar que a presença de surfactante no sistema 18 (tratamento com BA100 e Surfactante) diminuiu a produção acumulada de CO₂ (Tabela 6). No sistema 09 (BA100) houve um acumulado de CO₂ de 413,87 mg e no sistema 18 somente 312,45 mg.

A Tabela 6 mostra a produção acumulada do CO₂ em todos os tratamentos, nela pode-se observar grande produção de CO₂ por parte dos tratamentos que possuíam surfactante. Isto mostra que a adição de um tensoativo acelera a biodegradação e, conseqüentemente, pode facilitar a biorremediação do solo contaminado. Para todos os sistemas ocorreu aumento de produção de CO₂, variando a intensidade de acordo com contaminantes utilizados.

Tabela 06 - CO₂ acumulado durante 189 de biodegradação nos respirômetros

Sistemas Respirométricos	CO₂ acumulado (mg)	
Sistema02 (Solo + Areia)	78,595	± 6,3003
Sistema03 (Solo + Inóculo)	221,925	± 1,4779
Sistema04 (solo + Inóculo + Surf.)	247,115	± 20,9233
Sistema05 (D)	188,485	± 6,3003
Sistema06 (BA5)	225,39	± 43,5578
Sistema07 (BA10)	227,645	± 36,0129
Sistema08 (BA50)	265,045	± 9,7227
Sistema09 (BA100)	413,875	± 17,6565
Sistema10 (BV5)	174,9	± 3,4224
Sistema11 (BV10)	187,385	± 0,7000
Sistema12 (BV50)	351,78	± 17,7342
Sistema13 (BV100)	228,47	± 2,0223
Sistema14 (D+surf.)	336,82	± 14,1563
Sistema15 (BA5+surf.)	334,125	± 17,8120
Sistema16 (BA10+surf.)	386,375	± 26,3680
Sistema17 (BA50+surf.)	506,88	± 2,6446
Sistema18 (BA100+surf.)	312,455	± 42,7022
Sistema19 (BV5+surf.)	313,885	± 23,5679
Sistema20 (BV10+surf.)	399,08	± 22,7127
Sistema 21 (BV50+surf.)	336,325	± 33,5239
Sistema22 (BV100+surf.)	230,725	± 37,5686

Fonte – Elaborada pelo autor.

No tratamento sem a presença de surfactante e 50% de biodiesel no diesel a biodegradação se mostrou maior, ou seja, a mistura de 50% de biodiesel no diesel fez a melhor mistura em termos de aumento da biodegradação em 189 dias em relação às outras misturas, com excessão do biodiesel de origem animal puro. Dado semelhante foi constatado por Sendzikiene et al. (2007). Estes observaram que a mistura acima de 35% de biodiesel no diesel aumentava a biodegradabilidade dos contaminantes em relação aos contaminantes puros. A capacidade mais eficaz de biodegradação de misturas de biodiesel (animal e vegetal) também já foi constatada por Sendzikiene et al. (2007).

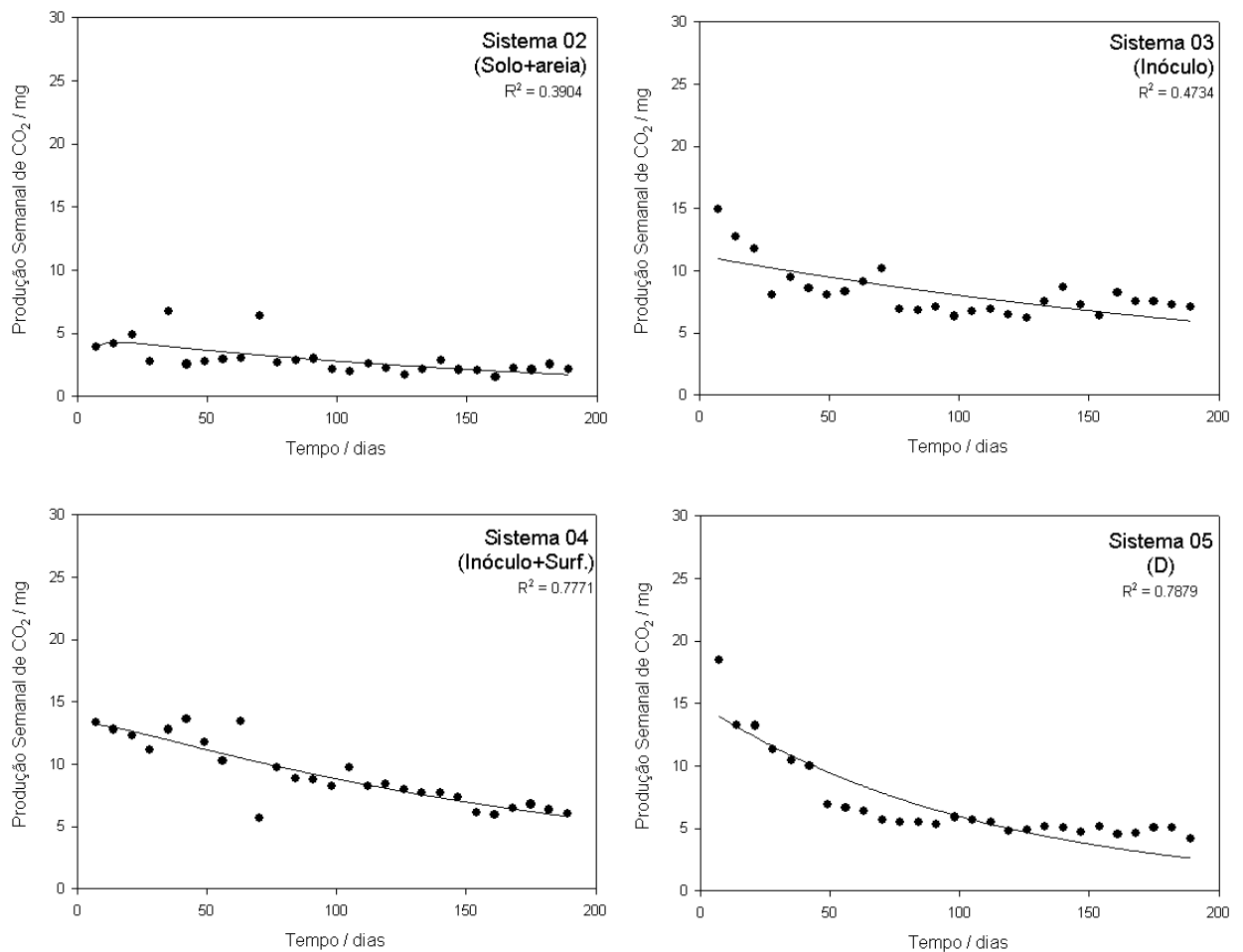
Fato observado por Demirbas (2008) foi que o biodiesel apresentava maior biodegradação em relação ao diesel puro, este fato foi observado neste trabalho somente para o biodiesel sem a presença de surfactante.

5.1.2 Modelagem matemática

5.1.2.1 Modelagem da produção semanal de CO₂

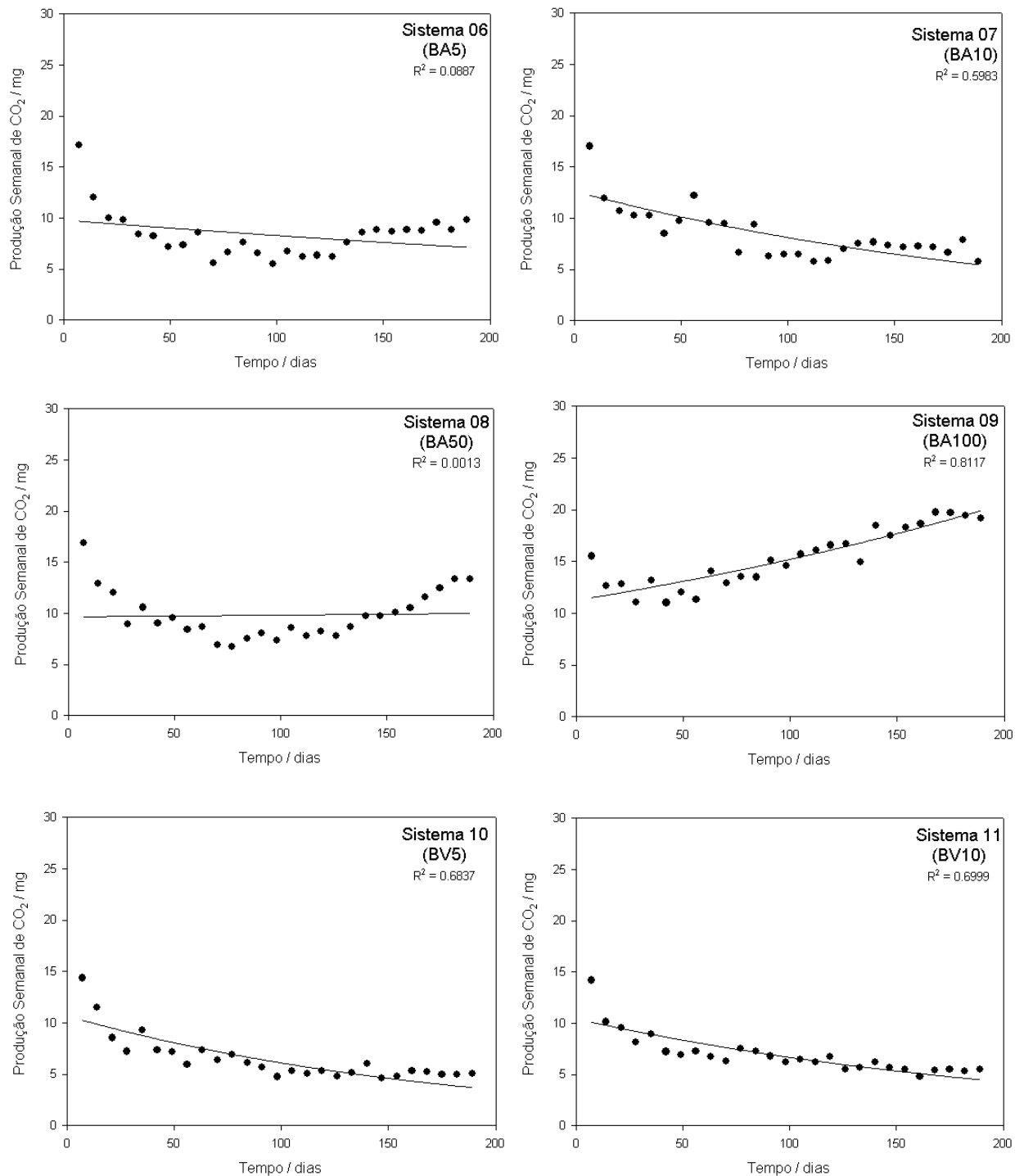
O modelo de Membré e colaboradores adaptada por Montagnolli et al. (2009) e Montagnolli (2011) para previsão da produção semanal de CO₂ não apresentou correlação com os dados gerados ($R^2 < 0,9$, em todos os casos), ou seja, o modelo não se aplica aos dados gerados pela respirometria semanal, como expressa a Figura 21 com os respectivos R^2 .

Figura 21 – Modelagem adaptada por Montagnolli et al. (2009) e Montagnolli (2011) do modelo de Membré e colaboradores para previsão da produção semanal de CO₂.



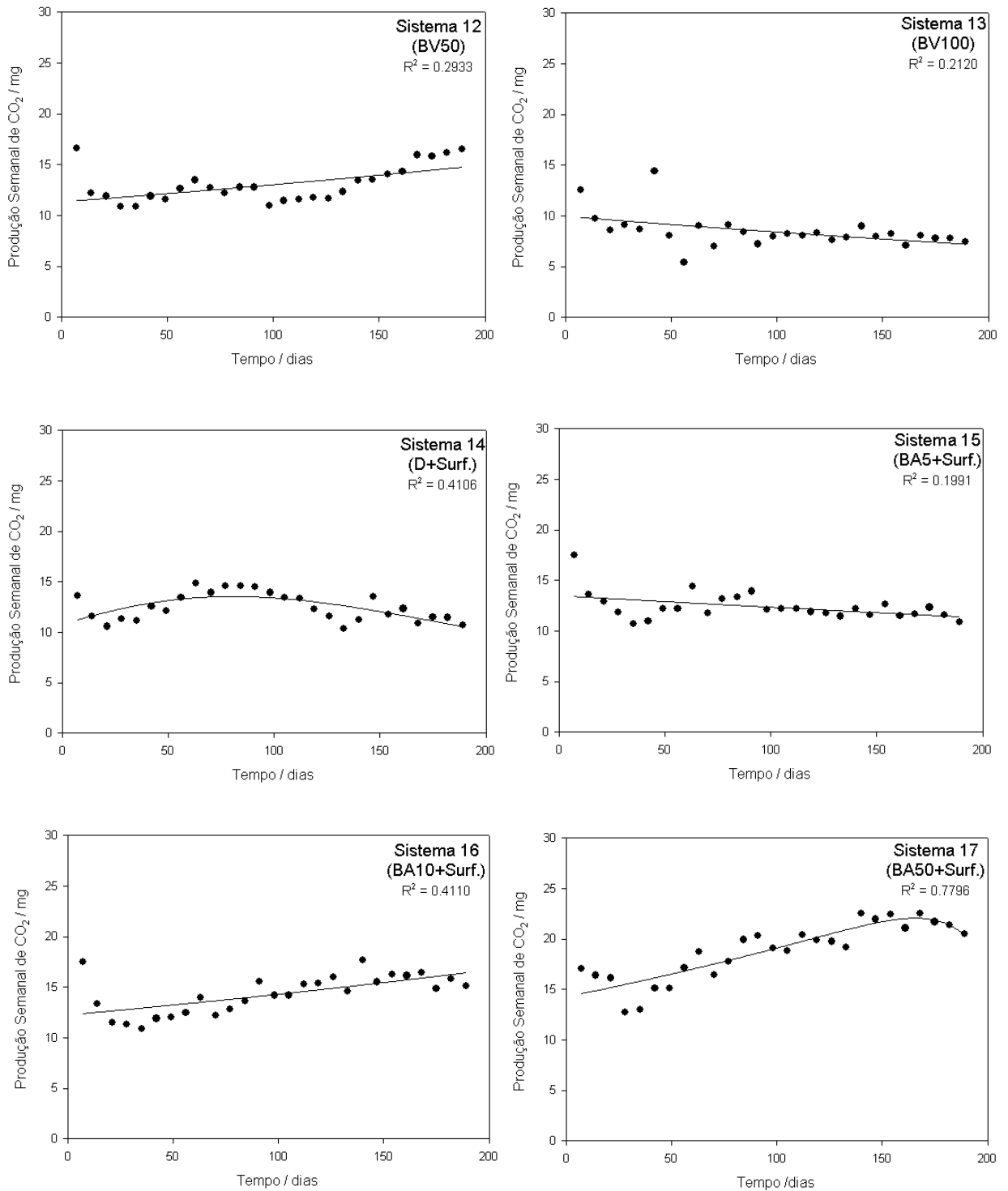
Fonte – Elaborada pelo autor.

Figura 21 (Continuação) – Modelagem adaptada por Montagnolli et al. (2009) e Montagnolli (2011) do modelo de Membré e colaboradores para previsão da produção semanal de CO₂.



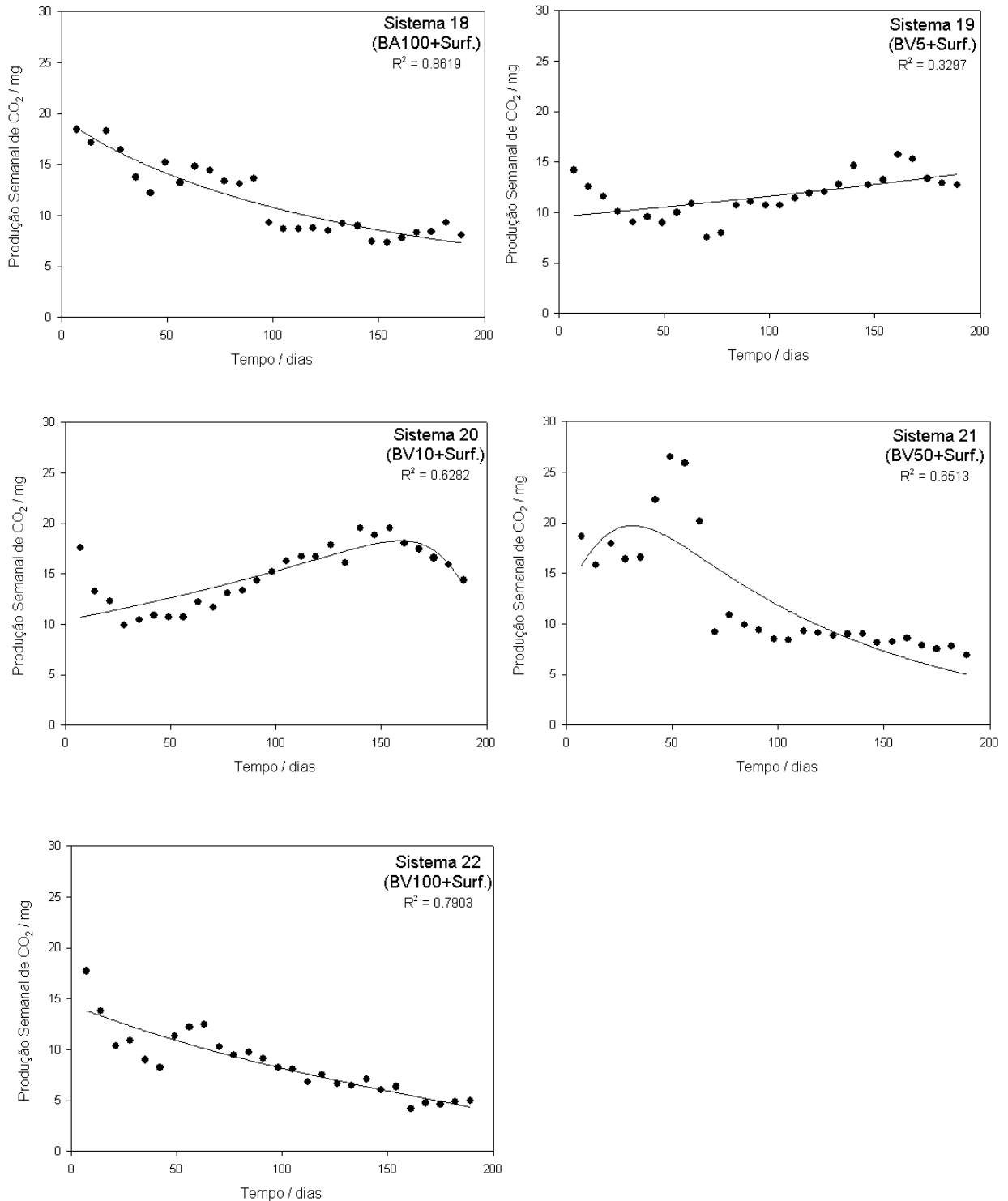
Fonte – Elaborada pelo autor.

Figura 21 (Continuação) – Modelagem adaptada por Montagnolli et al. (2009) e Montagnolli (2011) do modelo de Membré e colaboradores para previsão da produção semanal de CO₂.



Fonte – Própria autoria.

Figura 21 (Continuação) – Modelagem adaptada por Montagnolli et al. (2009) e Montagnolli (2011) do modelo de Membré e colaboradores para previsão da produção semanal de CO₂.



Fonte – Elaborada pelo autor.

Os sistemas que apresentaram aparente queda na produção de CO₂ foram utilizados regressão linear para a fim de fazer um ajuste matemático dos dados

gerados. Foi realizada a regressão linear para os sistemas S02, S03, S04, S05, S07, S10, S11, S13, S15, S18 e S22, isso porque esses sistemas foram os únicos a apresentarem queda na produção semanal, indicando assim diminuição da eficiência de degradação, um possível indicativo de final de biodegradação. Apesar do ajuste matemático, o índice de correlação se apresentou baixo para todos os sistemas de acordo com a Tabela 07.

Tabela 07 – índice de correlação (R^2) entre o modelo adaptado de Membré e colaboradores e regressão linear

Sistemas Respirométricos	R^2 (Modelo de Membré)	R^2 (Regressão linear)
Sistema02 (Solo + Areia)	0,3904	0,60595
Sistema03 (Solo + Inóculo)	0,4734	0,64583
Sistema04 (Solo + Inóculo + Surf.)	0,7771	0,87347
Sistema05 (D)	0,7879	0,79257
Sistema06 (BA5)	0,0887	-
Sistema07 (BA10)	0,5983	0,73133
Sistema08 (BA50)	0,0013	-
Sistema09 (BA100)	0,8117	-
Sistema10 (BV5)	0,6837	0,76979
Sistema11 (BV10)	0,6999	0,79874
Sistema12 (BV50)	0,2933	-
Sistema13 (BV100)	0,2120	44,947
Sistema14 (D+Surf.)	0,4106	-
Sistema15 (BA5+Surf.)	0,1991	0,44318
Sistema16 (BA10+Surf.)	0,4110	-
Sistema17 (BA50+Surf.)	0,7796	-
Sistema18 (BA100+Surf.)	0,8619	0,90438
Sistema19 (BV5+Surf.)	0,3297	-
Sistema20 (BV10+Surf.)	0,6282	-
Sistema 21 (BV50+Surf.)	0,6513	-
Sistema22 (BV100+Surf.)	0,7903	0,88353

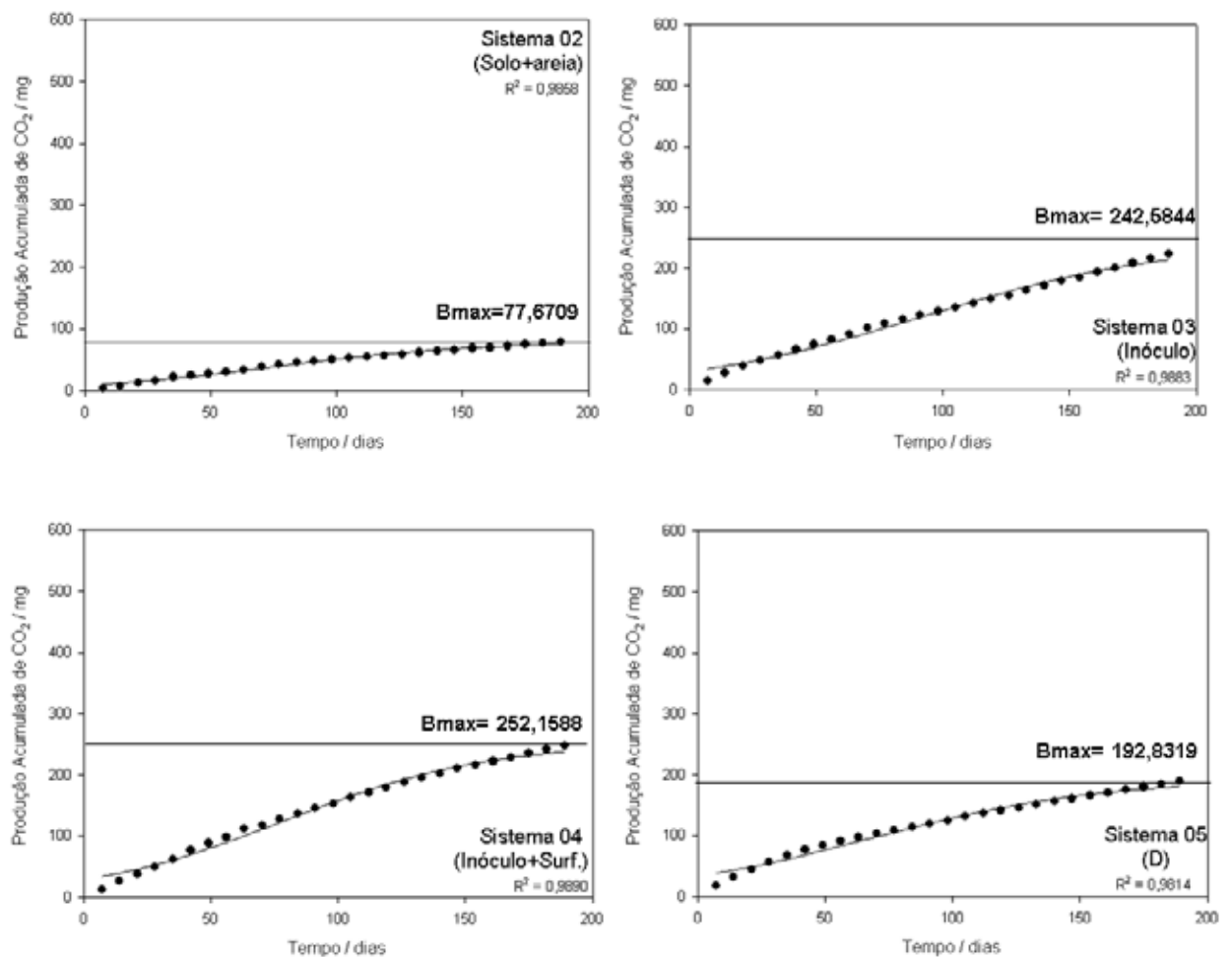
Fonte – Elaborada pelo autor. (-): Indica que os sistemas não apresentavam queda de produção semanal de CO_2 , por isso não foi realizada regressão linear.

Por isso, para análise de produção de CO_2 semanal foi realizado a descrição de dados (seção 5.1.1.1). Para análise geral da respirometria foi discutido somente a produção acumulada de CO_2 (seção 5.1.1.2 e 5.1.2.2).

5.1.2.2 Modelagem da produção acumulada de CO₂

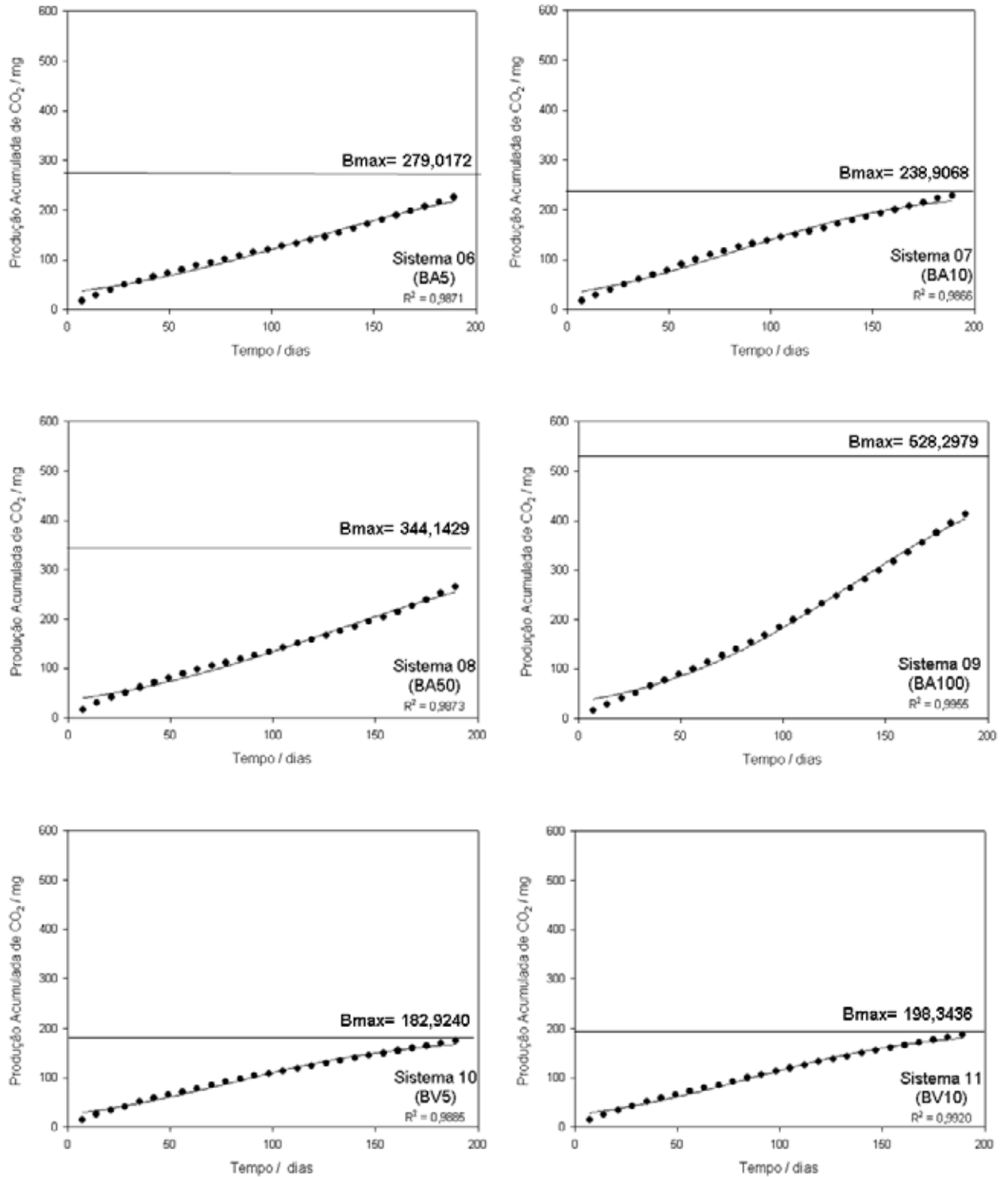
A Figura 22 apresenta o resultado da modelagem baseado em Schmidt e colaboradores adaptado por Montagnolli (2011) e Montagnolli et al. (2009), com a utilização desse modelo pode-se obter valores de R^2 maiores que 0,97 em todos os casos.

Figura 22– Produção acumulada de CO₂ em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Schmidt e colaboradores segundo Montagnolli (2011) e Montagnolli et al. (2009).



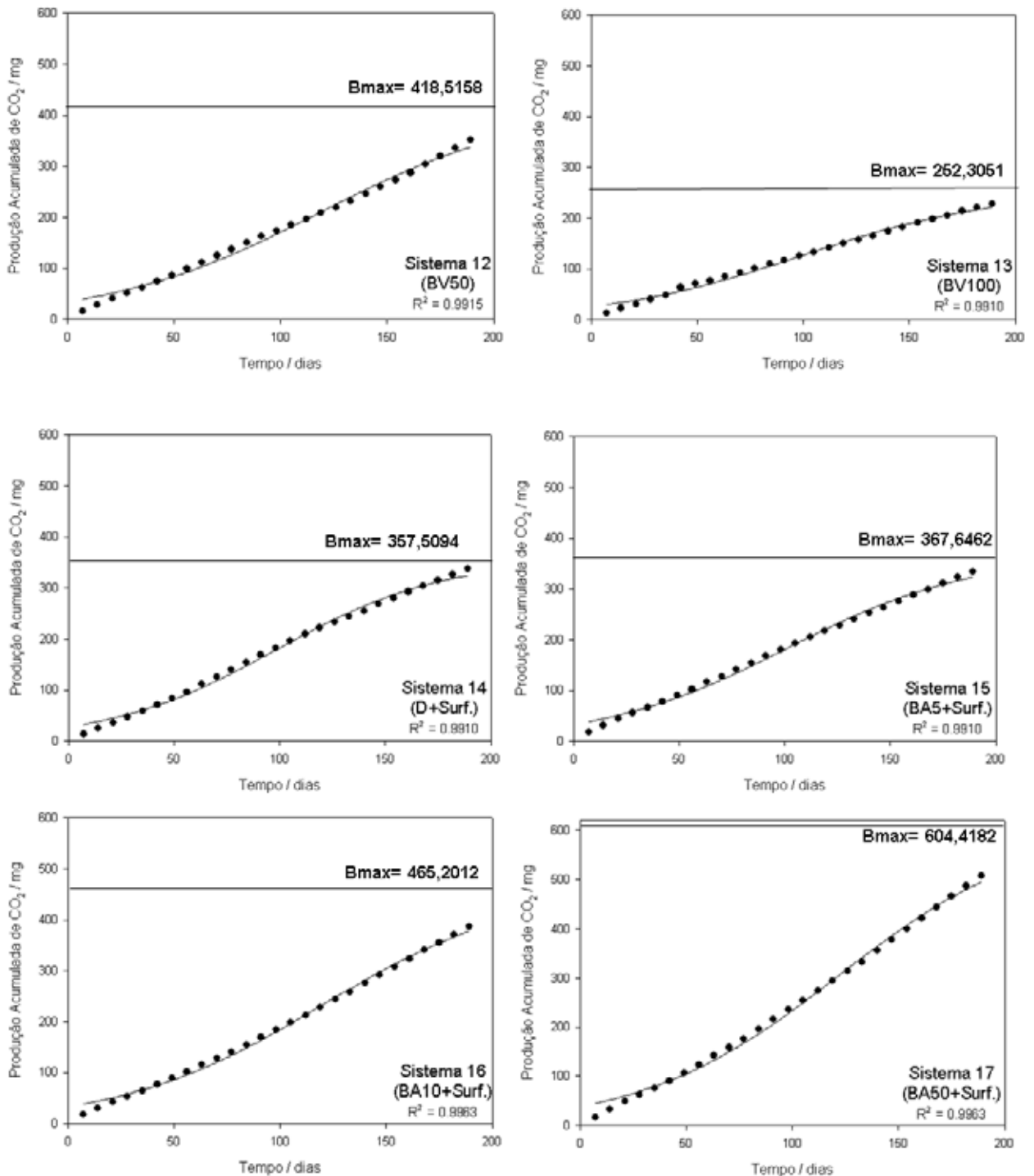
Fonte – Elaborada pelo autor.

Figura 22 (Continuação)– Produção acumulada de CO₂ em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Schmidt e colaboradores segundo Montagnolli (2011) e Montagnolli et al. (2009).



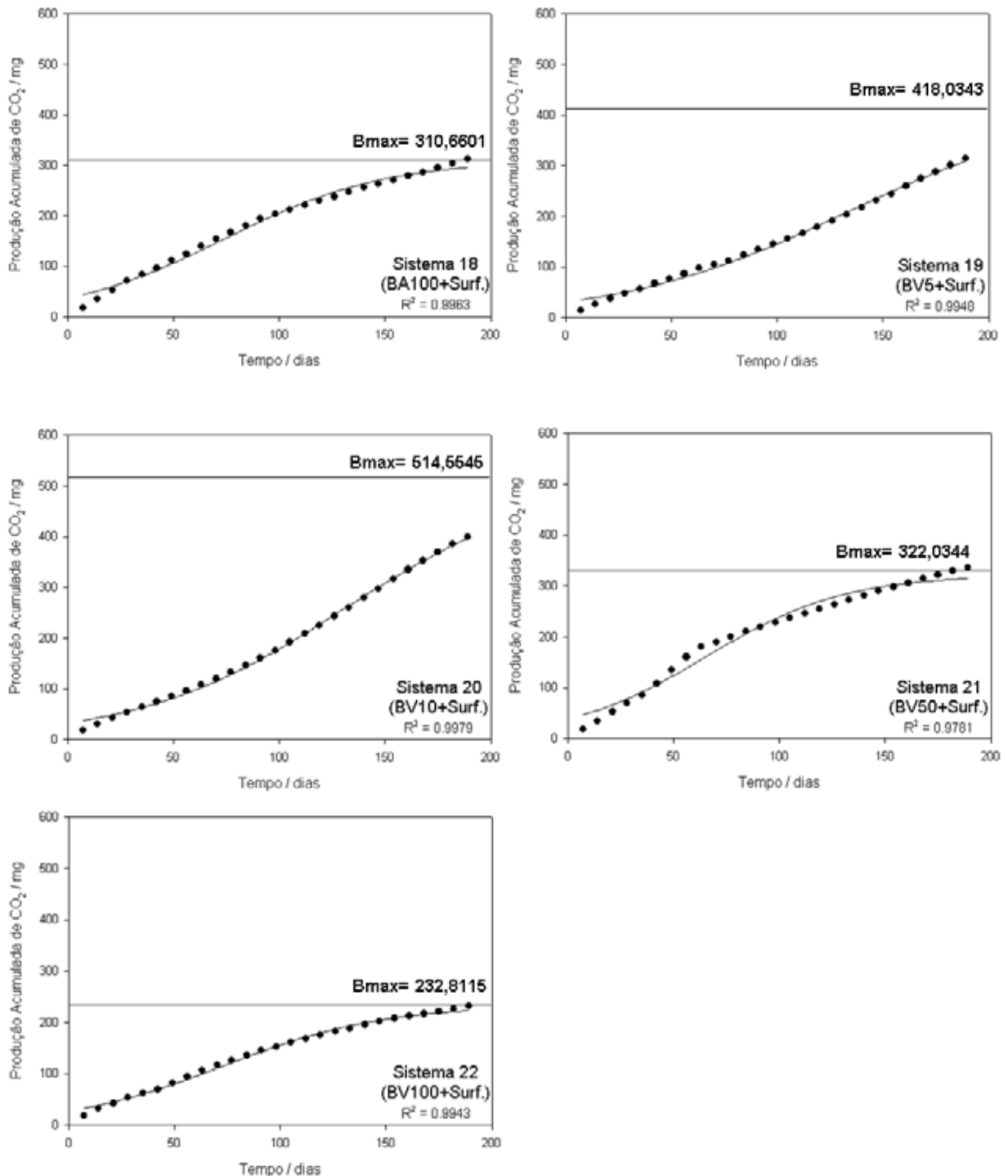
Fonte – Elaborada pelo autor.

Figura 22 (Continuação)– Produção acumulada de CO₂ em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Schmidt e colaboradores segundo Montagnolli (2011) e Montagnolli et al. (2009).



Fonte – Elaborada pelo autor.

Figura 22 (Continuação)– Produção acumulada de CO₂ em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Schmidt e colaboradores segundo Montagnolli (2011) e Montagnolli et al. (2009).



Fonte – Elaborada pelo autor.

Os parâmetros apresentados na Tabela 08 são os valores correspondentes a produção máxima de CO₂ pelos sistemas respirométricos (B_{max}), o tempo necessário para atingir a produção máxima (T_{B_{max}}) e os valores de R²

correspondentes ao modelo matemático de Schmidt e colaboradores adaptado por Montagnolli (2011) e Montagnolli et al. (2009) aplicado na produção acumulada de CO₂.

Segundo Montagnolli (2011) e Montagnolli et al. (2009), para se calcular T_{Bmax} foi utiliza-se B= 0,99 x Bmax, pois o tempo para Bmax tende ao infinito.

Tabela 08 – Dados adquiridos com o uso da modelagem adaptado de Schmidt e colaboradores por Montagnolli et al. (2009) e Montagnolli (2011)

Sistemas Respirométricos	Bmax (mg)	T _{Bmax} (dias)	R ²
Sistema02 (Solo + Areia)	77,6709	247,013	0,9858
Sistema03 (Solo + Inóculo)	242,5844	314,198	0,9883
Sistema04 (Solo + Inóculo + Surf.)	252,1588	260,579	0,9890
Sistema05 (D)	192,8319	275,045	0,9814
Sistema06 (BA5)	279,0172	382,623	0,9871
Sistema07 (BA10)	238,9068	290,783	0,9866
Sistema08 (BA50)	344,1429	400,751	0,9873
Sistema09 (BA100)	528,2979	357,477	0,9955
Sistema10 (BV5)	182,9240	287,846	0,9885
Sistema11 (BV10)	198,3436	289,762	0,9920
Sistema12 (BV50)	418,5158	345,794	0,9915
Sistema13 (BV100)	252,3051	309,924	0,9910
Sistema14 (D+Surf.)	357,5094	281,323	0,9944
Sistema15 (BA5+Surf.)	367,6462	304,886	0,9943
Sistema16 (BA10+Surf.)	465,2012	336,785	0,9963
Sistema17 (BA50+Surf.)	604,4182	329,841	0,9958
Sistema18 (BA100+Surf.)	310,6601	348,883	0,9891
Sistema19 (BV5+Surf.)	418,0343	377,596	0,9948
Sistema20 (BV10+Surf.)	514,5545	352,272	0,9979
Sistema 21 (BV50+Surf.)	322,0344	216,084	0,9781
Sistema22 (BV100+Surf.)	232,8115	244,782	0,9943

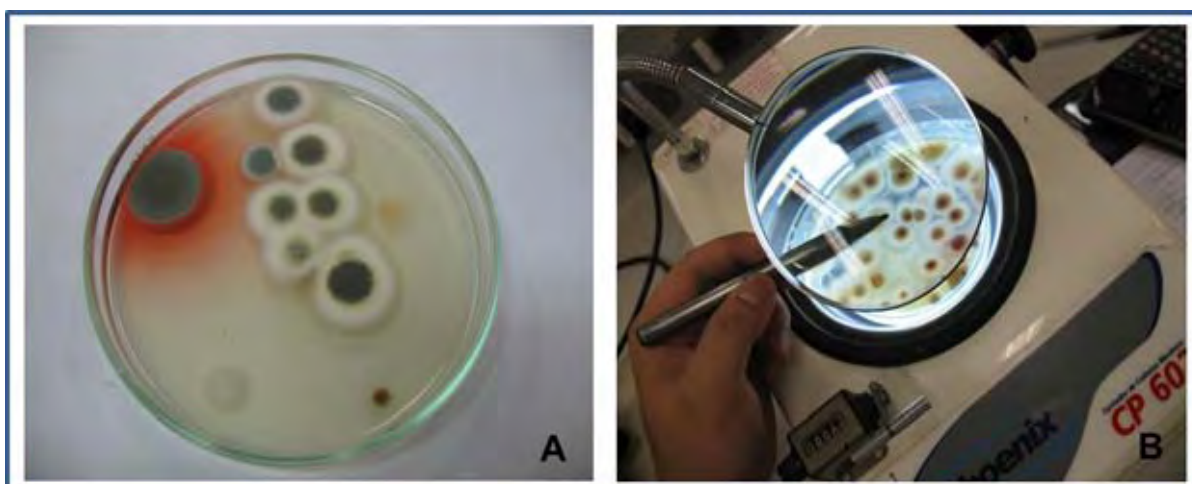
Fonte – Elaborada pelo autor.

Os valores de Bmax apresentados na Tabela 08 mostraram a quantidade máxima produzida em cada sistema respirométrico, o valor foi obtido quando a curva do modelo se mostra paralelo ao eixo do tempo, ou seja, quando a produção de CO₂ se estabiliza.

5.1.2.3 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após respirometria

A Figura 23 expressa a contagem de unidades formadoras de colônia após 189 dias de incubação dos respirômetros de Bartha e a Tabela 09 expressa os resultados da média da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os dados foram divididos por sistemas analisados e tipo de plaqueamento.

Figura 23 – Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).



Fonte – Elaborada pelo autor. A: Placa de *Potato Dextrose Agar* (PDA) após 120 h de incubação. B: contagem de UFC.

Tabela 09 - Número de UFC por amostra de solo e grupo microbiano ($\times 10^3$)/ g de solo

Sistemas Respirométricos	PCA (Bactérias)	PDA (Fungos)	Saboraud (Leveduras)
Sistema02 (Solo + Areia)	2000	5,95	0,2
Sistema03 (Solo + Inóculo)	3450	1,25	11
Sistema04 (Solo + Inóculo + Surf.)	17600	0,80	14,9
Sistema05 (D)	12800	8	3
Sistema08 (BA50)	4100	6,25	7
Sistema09 (BA100)	6000	5,6	7,35
Sistema12 (BV50)	4550	0,5	2,05
Sistema13 (BV100)	3300	3,6	0,7
Sistema14 (D+Surf.)	239000	1,4	2,55
Sistema17 (BA50+Surf.)	21600	0,7	1,45
Sistema18 (BA100+Surf.)	11350	0,25	0,05
Sistema 21 (BV50+Surf.)	1700	0,15	0,1
Sistema22 (BV100+Surf.)	800	0,05	0,05

Fonte – Elaborada pelo autor.

No plaqueamento com PCA podemos observar que a presença do inóculo e surfactante altera a quantidade de bactérias no sistema, aumentando a quantidade de UFC na maioria dos casos. Em relação ao sistema 02 (Solo + Areia), somente não foi verificado aumentou a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) nos sistemas que utilizava biodiesel de origem vegetal (Sistemas 21 e 22).

Assim, podemos observar que a quantidade de bactérias foi muito maior do que leveduras e fungos, isto já foi descrito por Teixeira e Jardim (2004), que destacaram as bactérias como as maiores responsáveis pelo tratamento de resíduos e mineralização de poluentes, promovendo a conversão da matéria orgânica em constituintes inorgânicos inócuos.

Dois fatos podem ser destacados quanto a Esse fato pode ser atribuído ao fato do BA não apresentar nenhum tipo de conservante e o BV apresentar terc-butil-hidroquinona (TBQH) 10 ppm.

5.2.2 Colorimetria com DCPIP

O método colorimétrico com o DCPIP mostrou de forma simples a biodegradação dos contaminantes utilizados através de reações químicas caracterizadas anteriormente por Hanson et al. (1993). No presente trabalho realizou-se duas análises, uma qualitativa e outra quantitativa.

5.2.2.1 Análise quantitativa

Os dados de colorimetria são apresentados pelas Figuras 25 a 29. A medida quantitativa de biodegradação foi realizada através da leitura de absorvância e esta foi convertida em mg de DCPIP pela descoloração do corante, utilizando a reta padrão (Figura 24) de acordo com a Equação 10.

$$[\text{DCPIP}] = (15,171 * \text{Abs}600) - 0,488 \quad (\text{Eq. 10})$$

Onde:

[DCPIP] = concentração de DCPIP

Abs600 = absorvância da amostra no comprimento de onda em 600 nm.

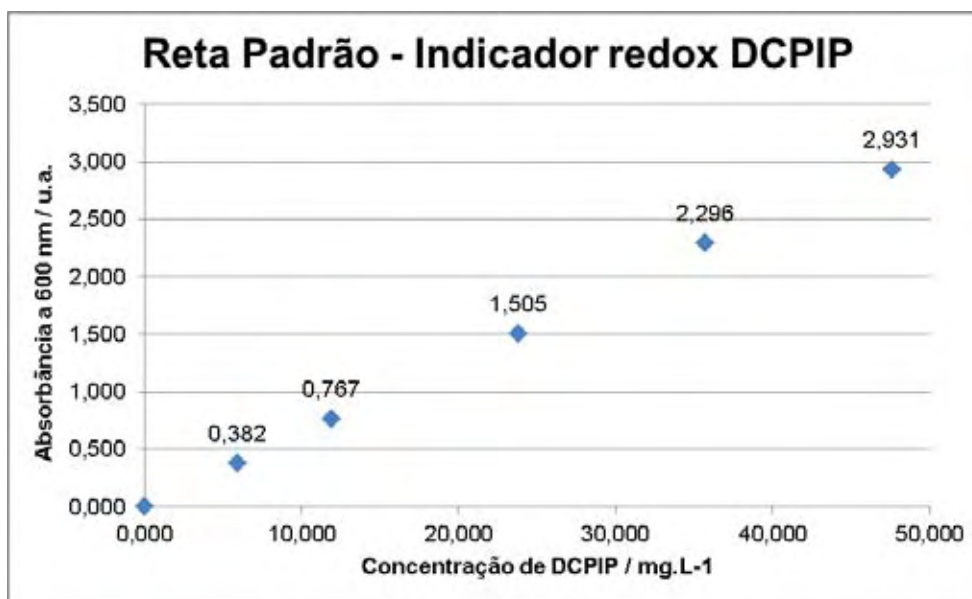
Para a construção da reta padrão foram realizadas leituras em absorbância em 5 diluições de DCPIP apresentadas na Tabela 10 e Figura 24.

Tabela 10 - Diluições de DCPIP e leitura em absorbância 600 nm

Tubos	Volumes /mL			[DCPIP]	Absorbância 600 nm
	Meio BH	DCPIP 1,0 g.L ⁻¹	Água destilada	(mg.L ⁻¹)	u.a.
0	7,500	0,000	0,900	0,000	0,000
1	7,500	0,050	0,850	5,952	0,382
2	7,500	0,100	0,800	11,905	0,767
3	7,500	0,200	0,700	23,809	1,505
4	7,500	0,300	0,600	35,714	2,296
5	7,500	0,400	0,500	47,619	2,931

Fonte – Elaborada pelo autor.

Figura 24 – Dados de absorbância em função da concentração de DCPIP com $r^2 = 0,999$.



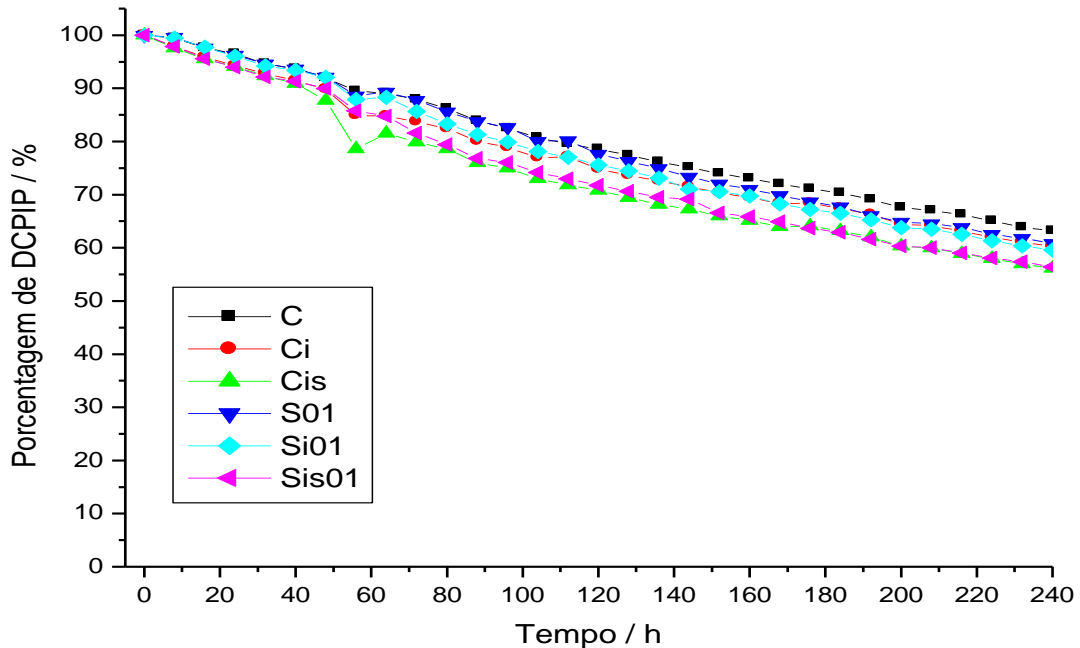
Fonte – Elaborada pelo autor.

Os dados de colorimetria com o DCPIP foram coletados a cada 8 h durante 240 h. Como em alguns sistemas colorimétricos tornaram-se incolores antes do tempo final (240 h), estes sistemas tinham suas leituras encerradas antecipadamente. Para a análise de dados as leituras em mg L⁻¹ de DCPIP foram transformadas em porcentagem.

Na Figura 25 pode-se observar que a diminuição de concentração do corante foi pouco acentuada em relação ao tempo de biodegradação. Os sistemas com diesel (S01, Si01 e Sis01) se mostraram pouco degradáveis, demonstrada pela semelhança com o controle.

Na Figura 25, o controle com o inóculo (Ci) e o sistema com inóculo e diesel (Sis01) apresentaram curvas semelhantes e, também, menor concentração após 240 h de incubação. Neste caso, pode-se observar que a influência do surfactante foi o causador dessa pequena variação.

Figura 25 - Concentração do DCPIP de acordo com o tempo de análise; C, Ci e Cis sendo os controles e S01, Si01 e Sis01 os tratamento com diesel.



Fonte – Elaborada pelo autor.

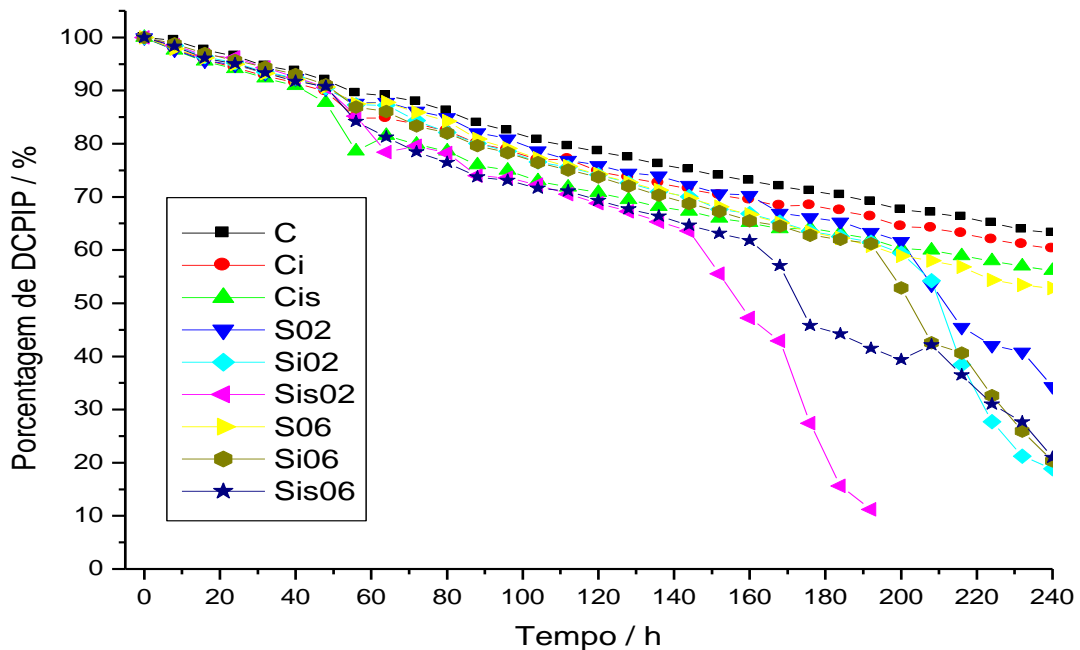
Na Figura 26, pode-se observar a influência do inóculo e do surfactante Tween[®] 80 para a biodegradação e, conseqüentemente, descoloração do corante. Os sistemas com somente o inóculo mostraram-se menos efetivos que os sistemas com inóculo e surfactante.

Nos sistemas Si02 (BA5) e Si06 (BV5) a descoloração se deu de forma mais acentuada somente após 200 h (Figura 26). Para os sistemas Sis02 (BA5) e Sis06

(BV5) foi observada acentuada descoloração após 144 h, mostrando a influência do surfactante no meio, ou seja, favorecendo a biodegradação.

Pode-se destacar que a mistura do biodiesel no diesel, mesmo que em pequena quantidade, influencia de forma positiva na degradação biológica.

Figura 26 - Concentração do DCPIP de acordo com o tempo de análise; C, Ci e Cis sendo os controles, S02, Si02 e Sis02 os tratamentos com BA5 e S06, Si06 e Sis06 os tratamento com BV5.

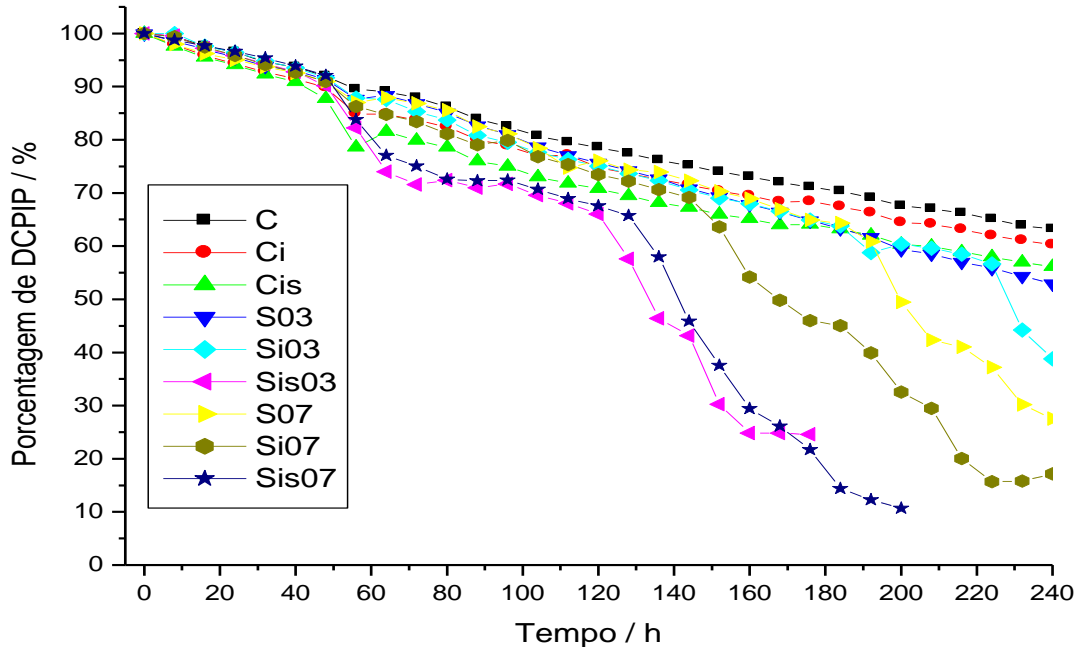


Fonte – Elaborada pelo autor.

Na Figura 27 as características de descoloração se assemelham a Figura 26, porém, com intensidades maiores, ou seja, a descoloração ocorreu em menos tempo. Neste caso, assim como no caso anterior, algumas leituras encerraram antes de 240 h, por apresentar problemas de leitura, tais como descoloração e flutuação da coloração.

Os sistemas com surfactante, Sis03 e Sis07 tiveram uma descoloração em menor tempo (Figura 27), e o sistema Si07 (tratamento com BV10 e inóculo) apresentou a terceira melhor biodegradação.

Figura 27 - Concentração do DCPIP de acordo com o tempo de análise; C, Ci e Cis sendo os controles, S03, Si03 e Sis03 os tratamentos com BA10 e S07, Si07 e Sis07 os tratamentos com BV10.

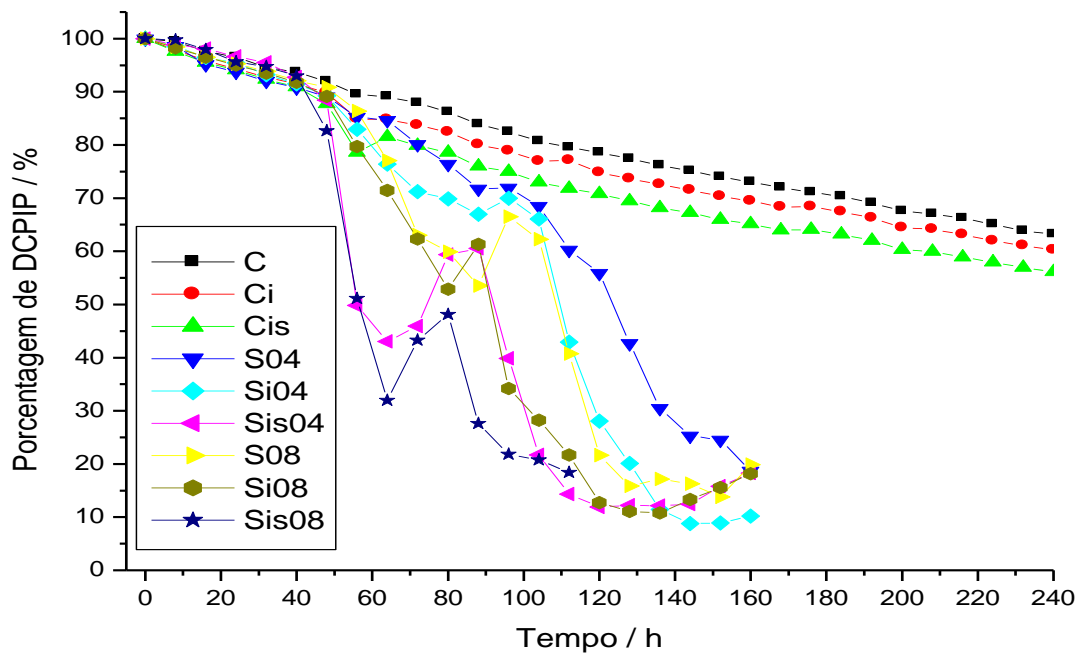


Fonte – Elaborada pelo autor.

Na Figura 28, pode-se observar que todos os sistemas que possuem BA50 e BV50 apresentaram descoloração, mesmo os que não possuíam inóculo e surfactante. Assim, as leituras foram encerradas em 160 h. Isto pode ser explicado pelos contaminantes utilizados não serem esterilizados previamente, podendo apresentar uma microbiota já adaptada ao meio, além de apresentar maior quantidade de biodiesel que em sistemas colorimétricos anteriores (S01, S02, S03, S06, S07 e os respectivos sistemas com inóculo e inóculo e surfactante).

Pode-se destacar que nos sistemas com BA50 e BV50 o surfactante também mostrou um favorecimento na biodegradação.

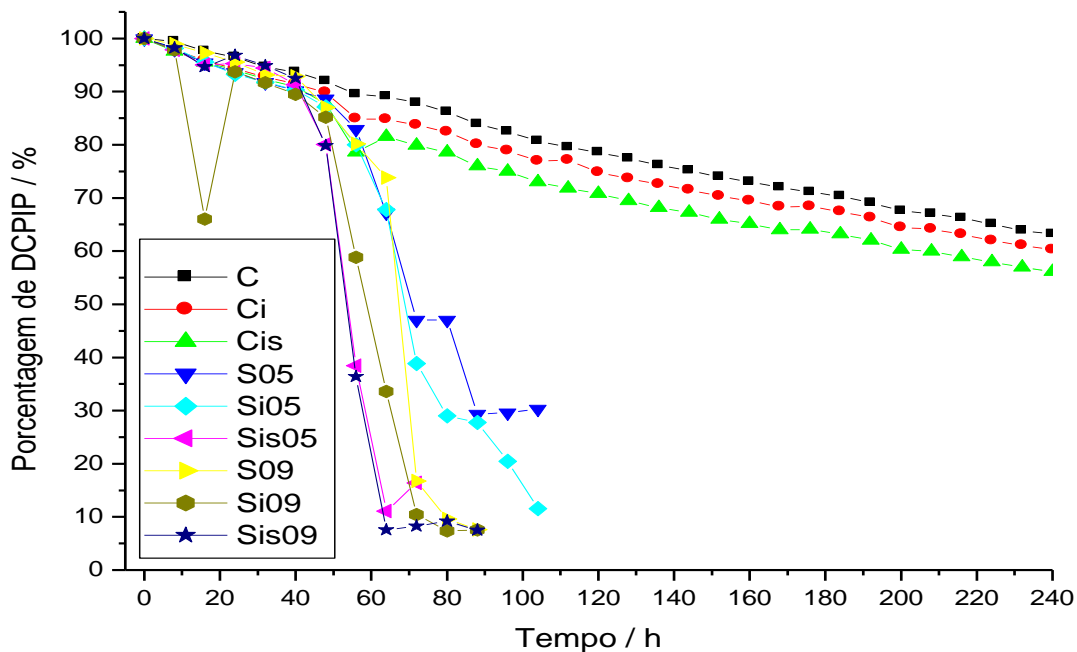
Figura 28 - Concentração do DCPIP de acordo com o tempo de análise; C, Ci e Cis sendo os controles, S04, Si04 e Sis04 os tratamentos com BA50 e S08, Si08 e Sis08 os tratamentos com BV50.



Fonte – Elaborada pelo autor.

Na Figura 29, os sistemas S05, Si05, Sis05, S09, Si09 e Sis09 se mostraram mais eficientes na biodegradação que os demais anteriores, pois a descoloração ocorreu em menor tempo, até 104 h. Os sistemas na Figura 29 não possuem diesel em sua composição e, mostram maior biodegradabilidade do biodiesel em relação ao diesel puro (Figura 25).

Figura 29 - Concentração do DCPIP de acordo com o tempo de análise; C, Ci e Cis sendo os controles, S05, Si05 e Sis05 os tratamentos com BA100 e S09, Si09 e Sis09 os tratamentos com BV100.



Fonte – Elaborada pelo autor.

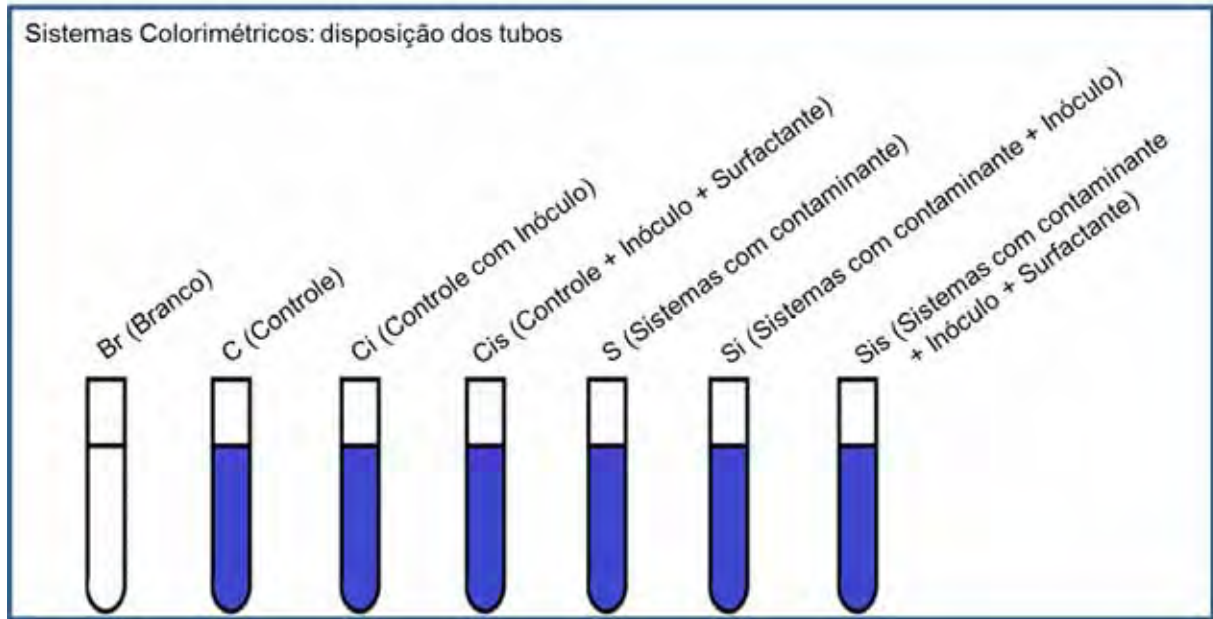
Os resultados da colorimetria com o DCPIP mostraram que, com o aumento da concentração de biodiesel, a sua biodegradação se tornou mais eficiente. Assim, os sistemas mais eficientes eram aqueles que não apresentavam diesel. A adição de surfactante, Tween[®] 80, e um inóculo previamente selecionado podem aumentar a taxa de biodegradação dos contaminantes.

5.2.2.1 Análise qualitativa

A análise qualitativa da colorimetria com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) mostrou visualmente a degradação através de fotografias dos tubos analisados nos tempos de leitura. Como já comentado anteriormente, através das fotos podemos ver que os controles (Br, C, Ci e Cis) não apresentaram mudança de cor, validando a análise qualitativa.

A análise qualitativa apenas é um complemento da análise quantitativa demonstrando a mudança de cor nos tempo de biodegradação dos contaminantes. As fotos da análise qualitativa segue a ordem dos tubos ilustrada pela Figura 30.

Figura 30 – Disposição dos tubos durante análise qualitativa no método colorimétrico.

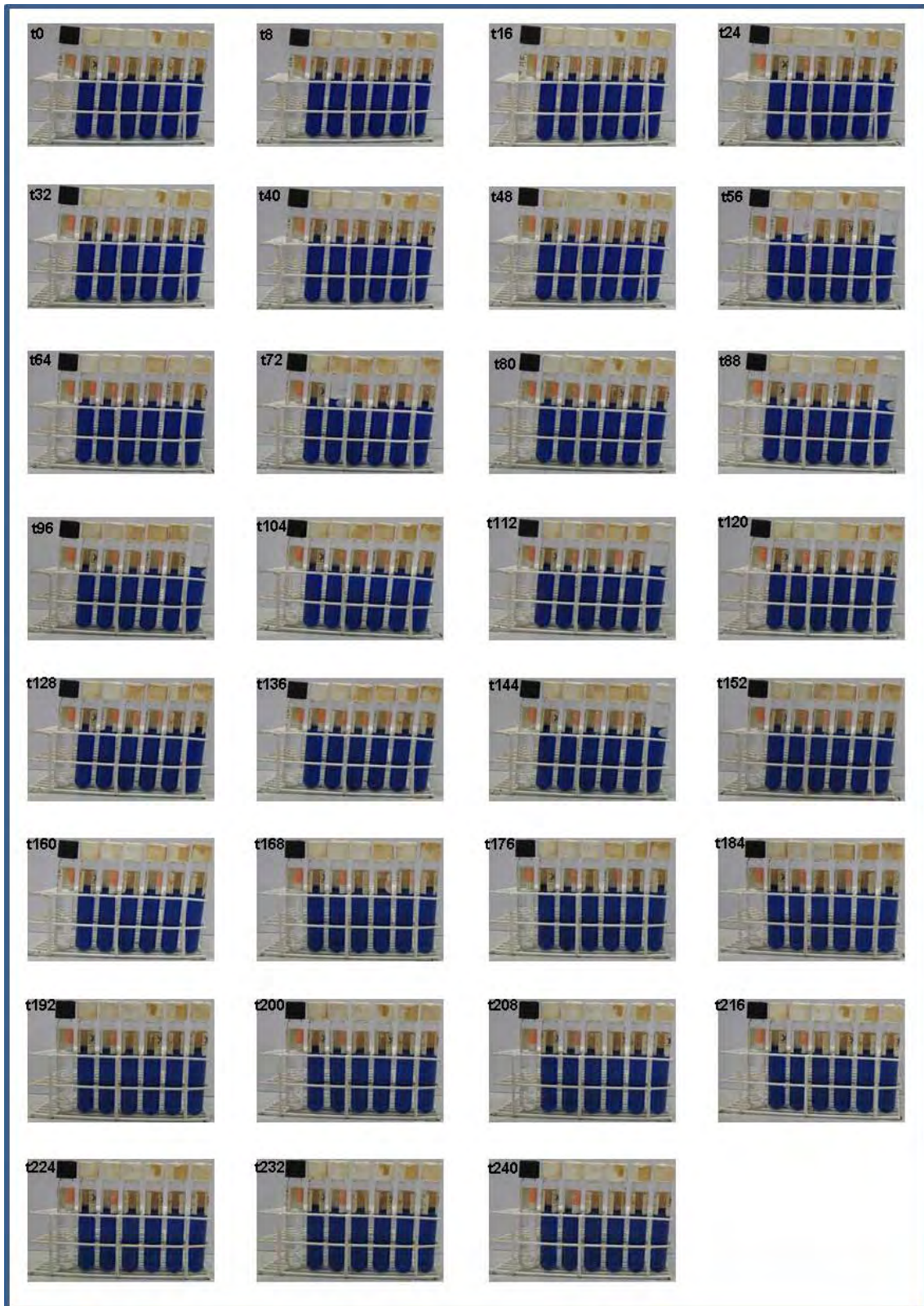


Fonte – Elaborada pelo autor.

Como já descrito na seção 5.2.1 os sistemas que apresentaram biodiesel em sua composição apresentou tempo de degradação menor e, quanto maior a proporção de biodiesel nos sistemas menor foi o tempo de descoloração do DCPIP. As Figuras 31 a 39 ilustram o ocorrido na seção 5.2.1 anterior.

A Figura 31 expressa a descoloração dos sistemas com diesel, ou seja, S01, Si01 e Sis01 em relação aos controles (C, Ci e Cis) e o branco (Br). Com o passar do tempo não ocorreu visível alteração por parte dos sistemas, o que mostra a recalcitrância do diesel.

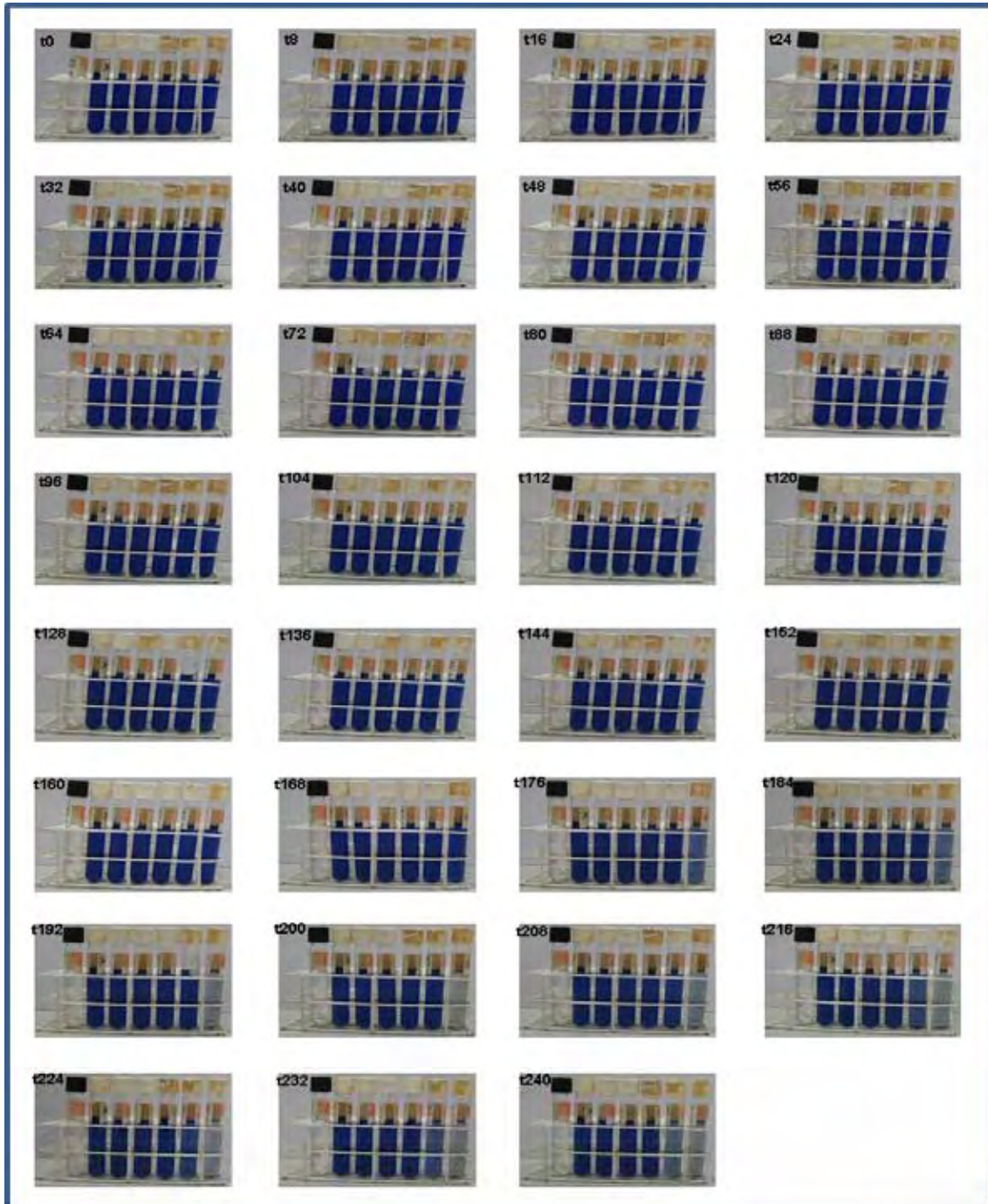
Figura 31 – Medida qualitativa do 2,6-diclorofenol-indofenol com Diesel (contaminante 01).



Fonte – Elaborada pelo autor. Ordem dos tubos da esquerda para direita: Br, C, Ci, Cis, S01, Si01 e Sis01.

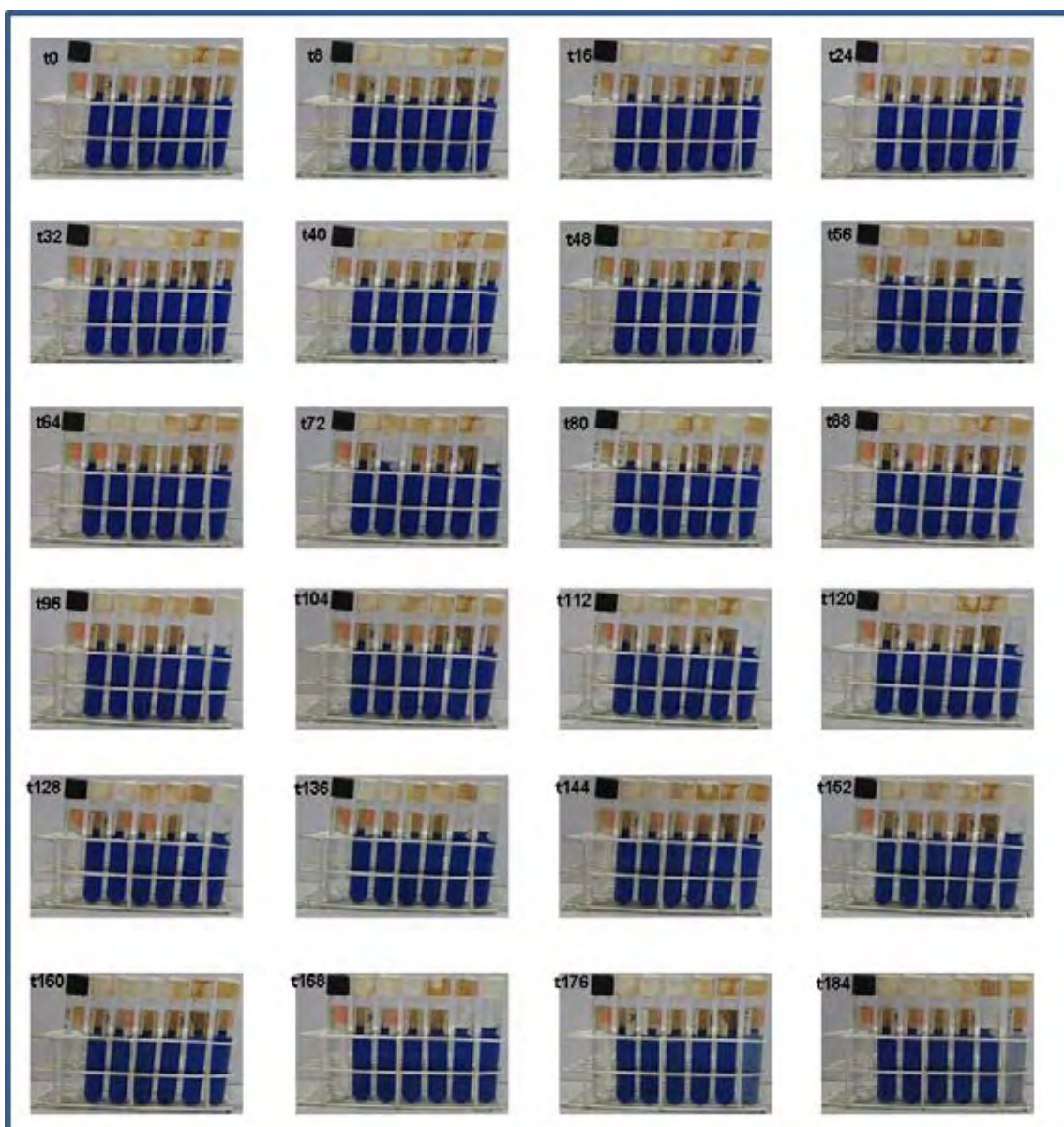
As Figuras 32 e 33 ilustram respectivamente a descoloração de sistemas com contaminante BA5 (contaminante 02) e BV5 (contaminante 06). Os sistemas apresentaram de forma visível a descoloração após 176 h, com descoloração máxima em 240 h. De acordo com a análise quantitativa podemos a acentuada variação ocorre a partir de 144 h de incubação.

Figura 32 - Medida qualitativa do 2,6-diclorofenol-indofenol com BA5 (contaminante 02).



Fonte – Elaborada pelo autor. Ordem dos tubos da esquerda para direita: Br, C, Ci, Cis, S02, Si02 e Sis02.

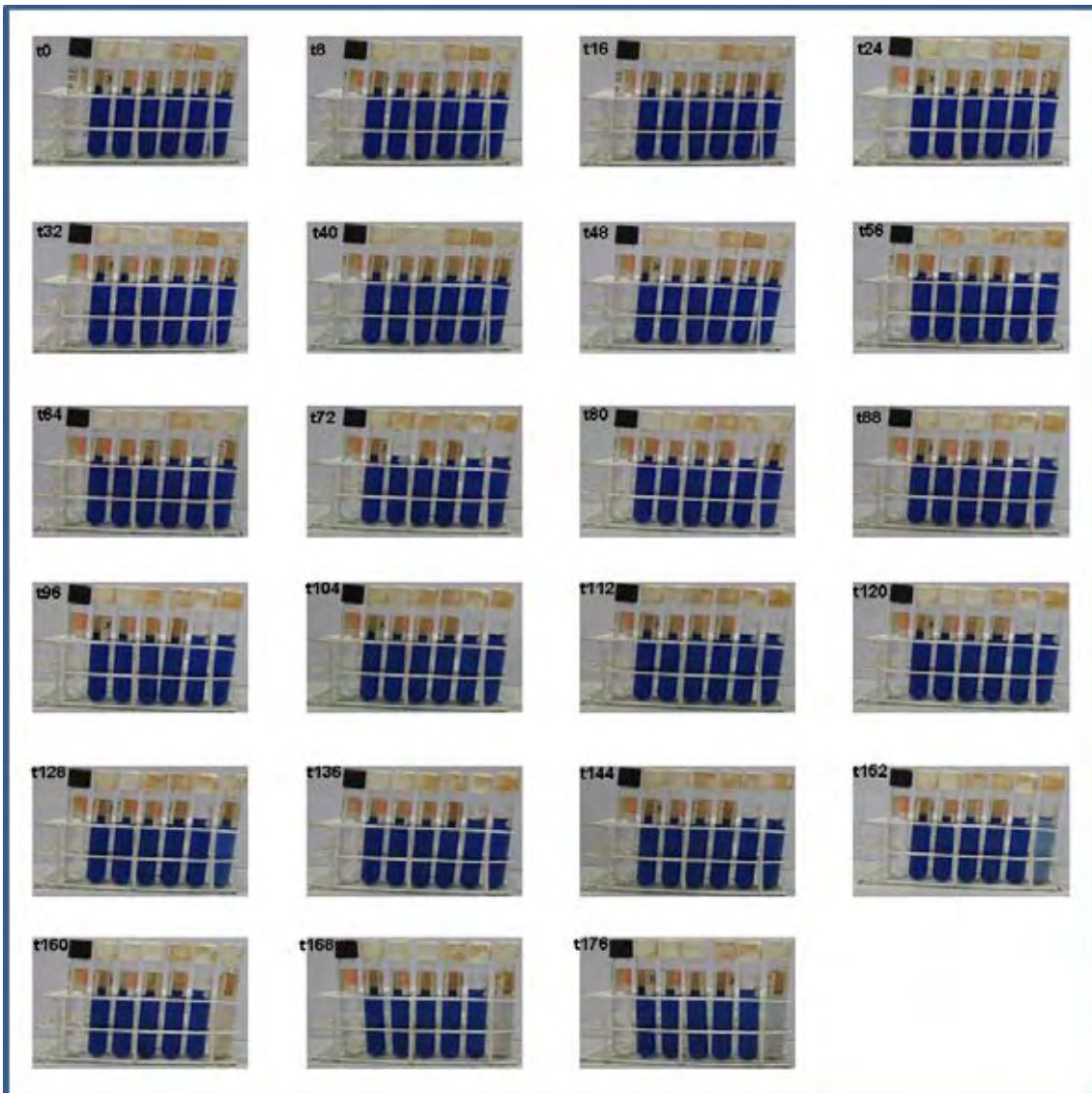
Figura 33 - Medida qualitativa do 2,6-diclorofenol-indofenol com BV5 (contaminante 06).



Fonte – Elaborada pelo autor. Ordem dos tubos da esquerda para direita: Br, C, Ci, Cis, S06, Si06 e Sis06

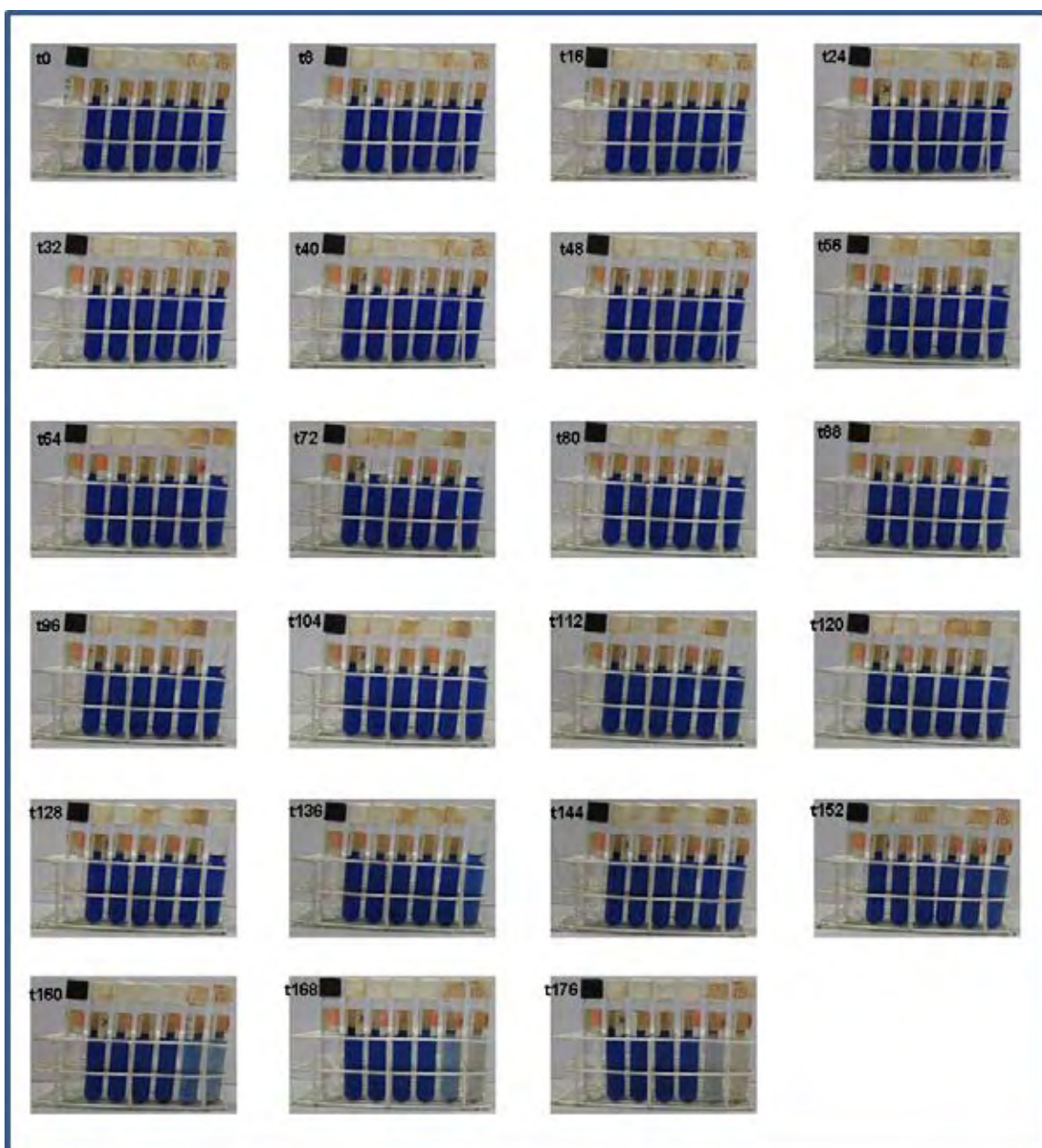
Nas Figuras 34 e 35 pode-se observar descoloração semelhante às Figuras 32 e 33, porém o tempo de incubação para que se iniciasse uma descoloração visível foi menor, após 152 h.

Figura 34 - Medida qualitativa do 2,6-diclorofenol-indofenol com BA10 (contaminante 03).



Fonte – Elaborada pelo autor. Ordem dos tubos da esquerda para direita: Br, C, Ci, Cis, S03, Si03 e Sis03.

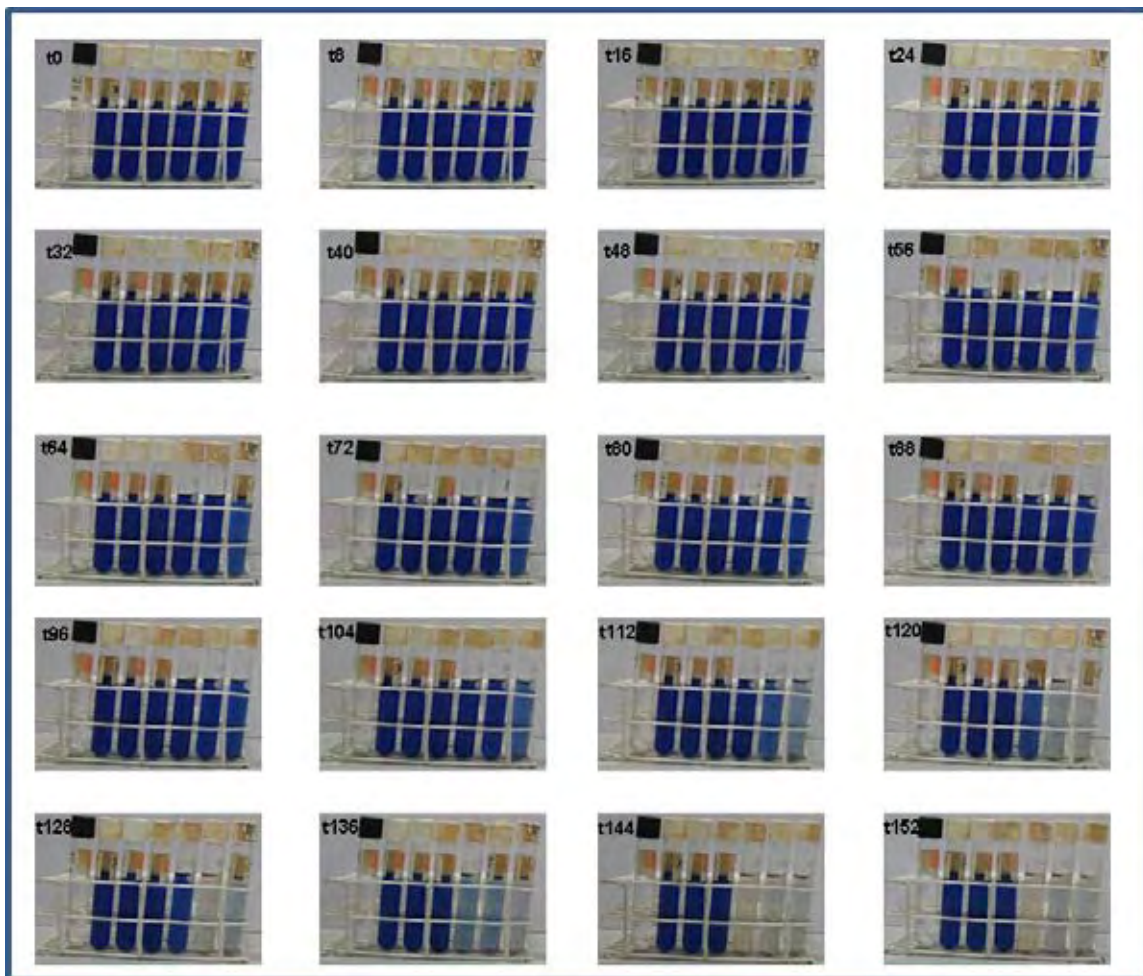
Figura 35 - Medida qualitativa do 2,6-diclorofenol-indofenol com BV10 (contaminante 07).



Fonte – Elaborada pelo autor. Ordem dos tubos da esquerda para direita: Br, C, Ci, Cis, S07, Si07 e Sis07.

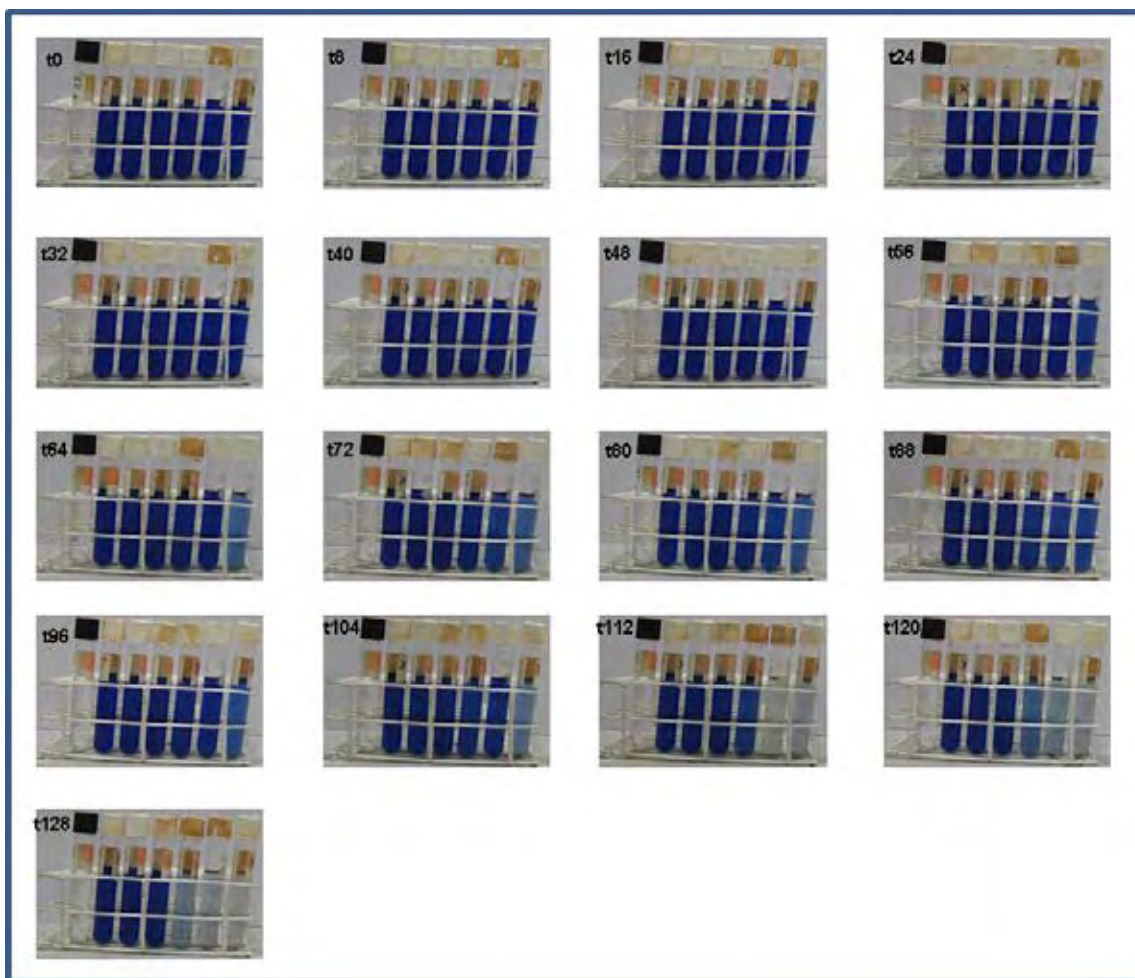
Nas Figuras 36 e 37, nos sistemas que possuem BA50 (contaminante 04) e BV50 (contaminante 08), a descoloração visível se iniciou em 64 h de incubação, com grande variação apresentada principalmente com BV50.

Figura 36 - Medida qualitativa do 2,6-diclorofenol-indofenol com BA50 (contaminante 04).



Fonte – Elaborada pelo autor. Ordem dos tubos da esquerda para direita: Br, C, Ci, Cis, S04, Si04 e Sis04.

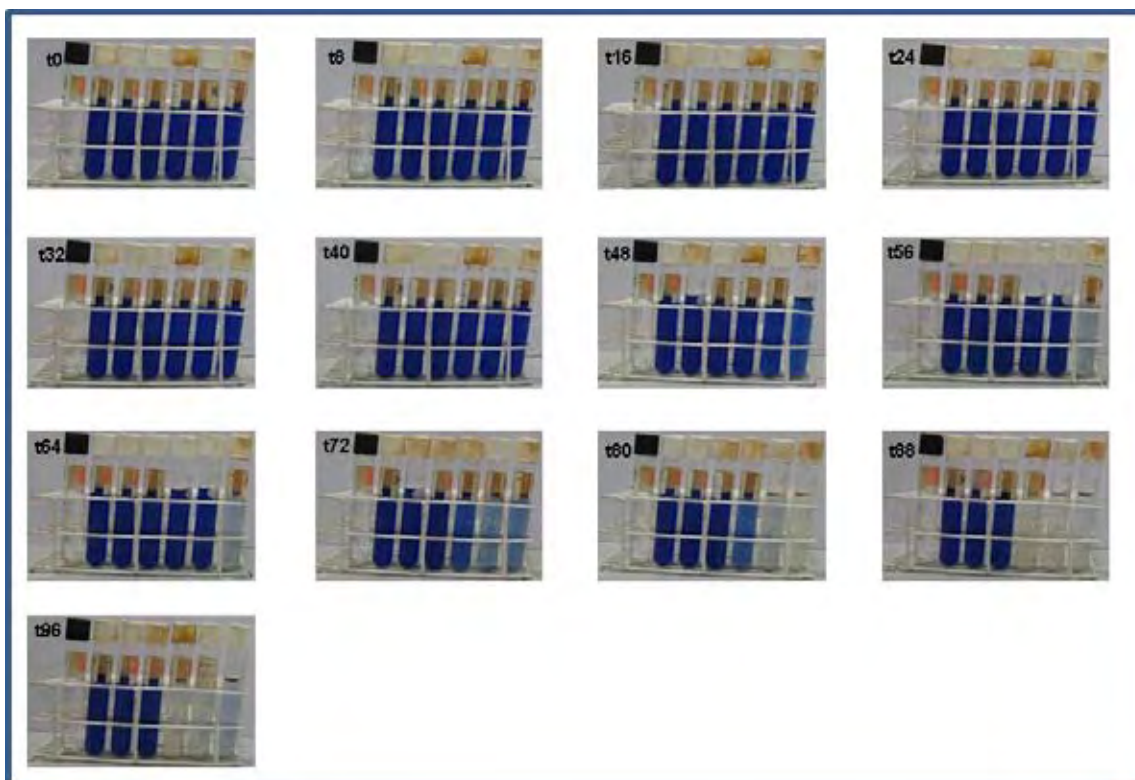
Figura 37 - Medida qualitativa do 2,6-diclorofenol-indofenol com BV50 (contaminante 08).



Fonte – Elaborada pelo autor. Ordem dos tubos da esquerda para direita: Br, C, Ci, Cis, S08, Si08 e Sis08.

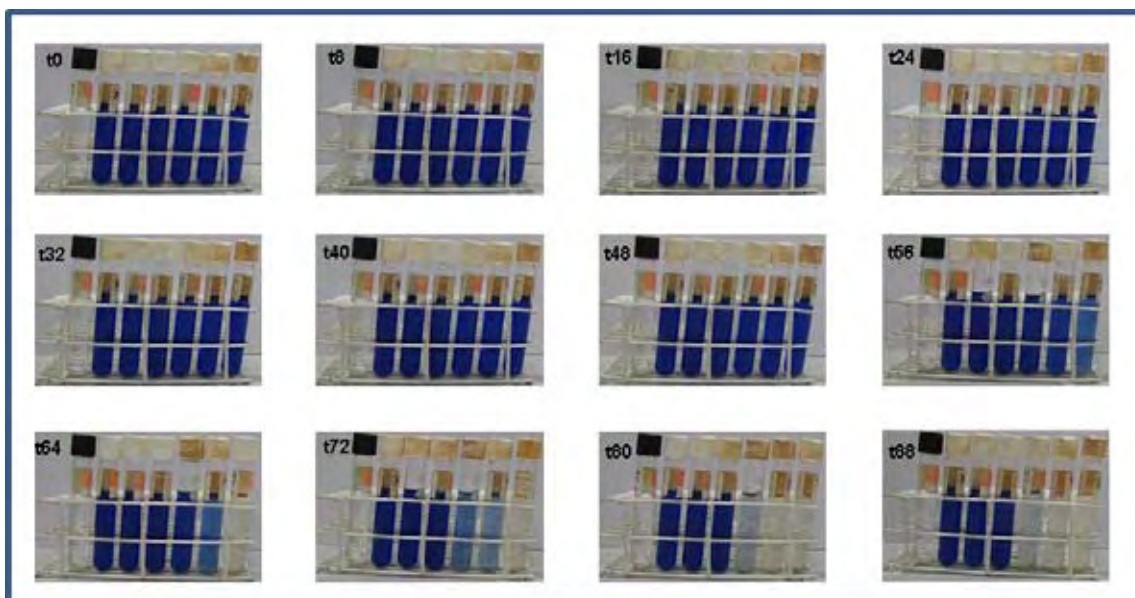
As Figuras 38 e 39 ilustram respectivamente, os sistemas com BA100 (contaminante 05) e BV100 (contaminante 09) como contaminantes. O tempo para descoloração desses sistemas foi o menor, apresentando visível descoloração a partir 56 h.

Figura 38 - Medida qualitativa do 2,6-diclorofenol-indofenol com BA100 (contaminante 05).



Fonte – Elaborada pelo autor. Ordem dos tubos da esquerda para direita: Br, C, Ci, Cis, S05, Si05 e Sis05.

Figura 39 - Medida qualitativa do 2,6-diclorofenol-indofenol com BV100 (contaminante 09).



Fonte – Elaborada pelo autor. Ordem dos tubos da esquerda para direita: Br, C, Ci, Cis, S09, Si09 e Sis09.

5.3 Discussão sobre a biodegradação

A adição do surfactante Tween[®] 80 teve um papel importante tanto na colorimetria como na respirometria, apresentando valores maiores de biodegradação na maioria dos casos, caso similar foi observado por Mariano et al. (2007), que analisaram a degradação do diesel com sistema respirométrico, e Owsianiak et al. (2009) que observaram melhora na biodegradação de misturas de diesel/ biodiesel quando biosurfactantes foram adicionados. Balba et al. (2002) e Urun et al. (2003) relataram que a utilização de agente tensoativos tem efeito benéficos na degradação de hidrocarbonetos, fato confirmado por Celik et al. (2008), que utilizaram surfactante Tween[®] 80 na biodegradação de petróleo por *Pseudomonas stutzeri*.

Mariano et al. (2009) observaram que em solos já contaminados anteriormente com diesel o bioaumento não alterava a taxa de biodegradação, uma vez que os micro-organismos presentes já apresentavam adaptações. No caso deste trabalho o substrato utilizado nos respirômetros não possuíam micro-organismos previamente adaptados a biodegradar hidrocarbonetos de origem fóssil e nem biodiesel, por isso a necessidade da preparação do inóculo base. O mesmo pode se aplicar a colorimetria em que a presença do inóculo aquoso influenciou a descoloração dos sistemas. Trabalho realizado por Bento et al. (2003) mostraram que o bioaumento na degradação de hidrocarbonetos de petróleo apresentava melhores resultados em relação a atenuação natural e a bioestimulação, o que mostra o potencial do inóculo na respirometria e na colorimetria realizados neste trabalho, o favorecimento causado pelo bioaumento também foi constatado também por Ward et al. (2003).

Segundo Owsianiak et al. (2009) o biodiesel apresenta melhor biodegradação em relação ao diesel puro, este fato apresentou coerência com trabalho realizado, mostrando que o biodiesel de forma pura apresenta melhor biodegradação em relação ao diesel puro tanto na respirometria quanto nos sistemas colorimétricos. Também, segundo Owsianiak et al. (2009), misturas de 10% de biodiesel no diesel apresenta queda na biodegradação, fato não observado no trabalho realizado.

Outro fato constatado por Owsianiak et al. (2009) foi que misturas de biodiesel acima de 35% melhorava a biodegradação. Este fato foi confirmado neste trabalho na respirometria, mostrando que a mistura de diesel com biodiesel em torno de 50% é promissor no que se refere à biodegradação dos contaminantes.

Segundo Sendzikiene et al. (2007) a mistura de biodiesel de origem animal e vegetal, em certa proporção, aumenta sua biodegradabilidade em relação ao biodiesel de origem vegetal puro, fato observado neste trabalho nos sistemas que não apresentavam surfactante, pois o biodiesel de origem “animal” (BA) utilizado apresenta cerca de 33% de origem vegetal.

5.4 Fitotoxicidade

Os resultados dos bioensaios de fitotoxicidade estão expressos nas Figuras 40 a 48. As análises dos dados são baseadas na inibição de hipocótilo e da raiz em relação ao controle negativo e o índice de germinação (IG).

Os dados de inibição de hipocótilo e raiz estão apresentados em percentual em relação ao controle negativo, ou seja, quanto maior o percentual maior sua toxicidade. Para o índice de germinação a interpretação torna-se diferente, quanto maior a porcentagem, mais próximo se está do controle negativo, ou seja, menor será sua toxicidade.

5.4.1 Biosensaio de Fitotoxicidade com sementes de *Eruca sativa*

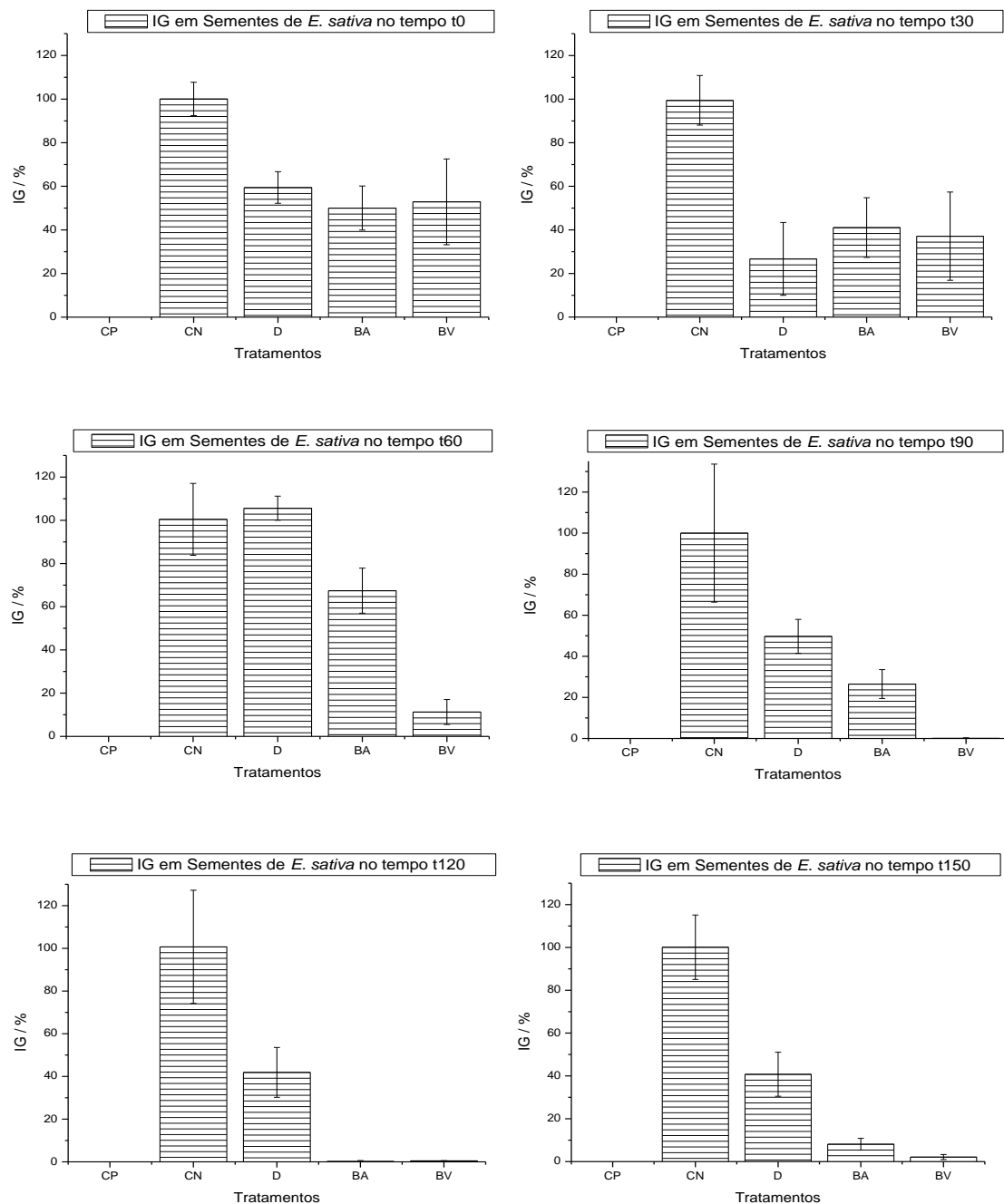
As Figuras 40, 41 e 42 expressam os resultados gerados dos bioensaios de fitotoxicidade utilizando sementes de *Eruca sativa*. Pelo índice de germinação (IG) pode-se observar que no tempo t0 ocorreu toxicidade mediana para todos os bioensaios e, após 30 dias houve diminuição dessa toxicidade. No tempo t60 o IG do bioensaio com diesel (D) apresentou baixa toxicidade, IG maior que 100% (Figura 39). Isto também ocorreu com o biodiesel de origem animal (BA), mas com menor intensidade com IG de 67,43%.

No tempo t90 (Figura 40) o bioensaio com diesel apresentou aumento em sua toxicidade (IG 49,71%) e permaneceu com IG próximo a 40% nos restantes dos tempos (t120 e t150).

Nos dois bioensaios com biodiesel (origem animal e vegetal) a toxicidade aumentou em relação ao tempo de biodegradação, apresentando-se tóxico mesmo após 150 dias de biodegradação (IG menor que 10%). Também foi observado por Tamada et al. (2012b) em que testes de germinação de sementes de *Eruca sativa* e

Lactuca sativa em tratamentos com biodiesel em solo provocaram alta inibição de acordo com o tempo de biodegradação em solo.

Figura 40 - Índice de germinação para sementes de *E. sativa* em porcentagem ao longo de 150 dias de análise.



Fonte - Elaborada pelo autor. Dados de média e desvio padrão. CP: Controle positivo, CN: Controle negativo, D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal.

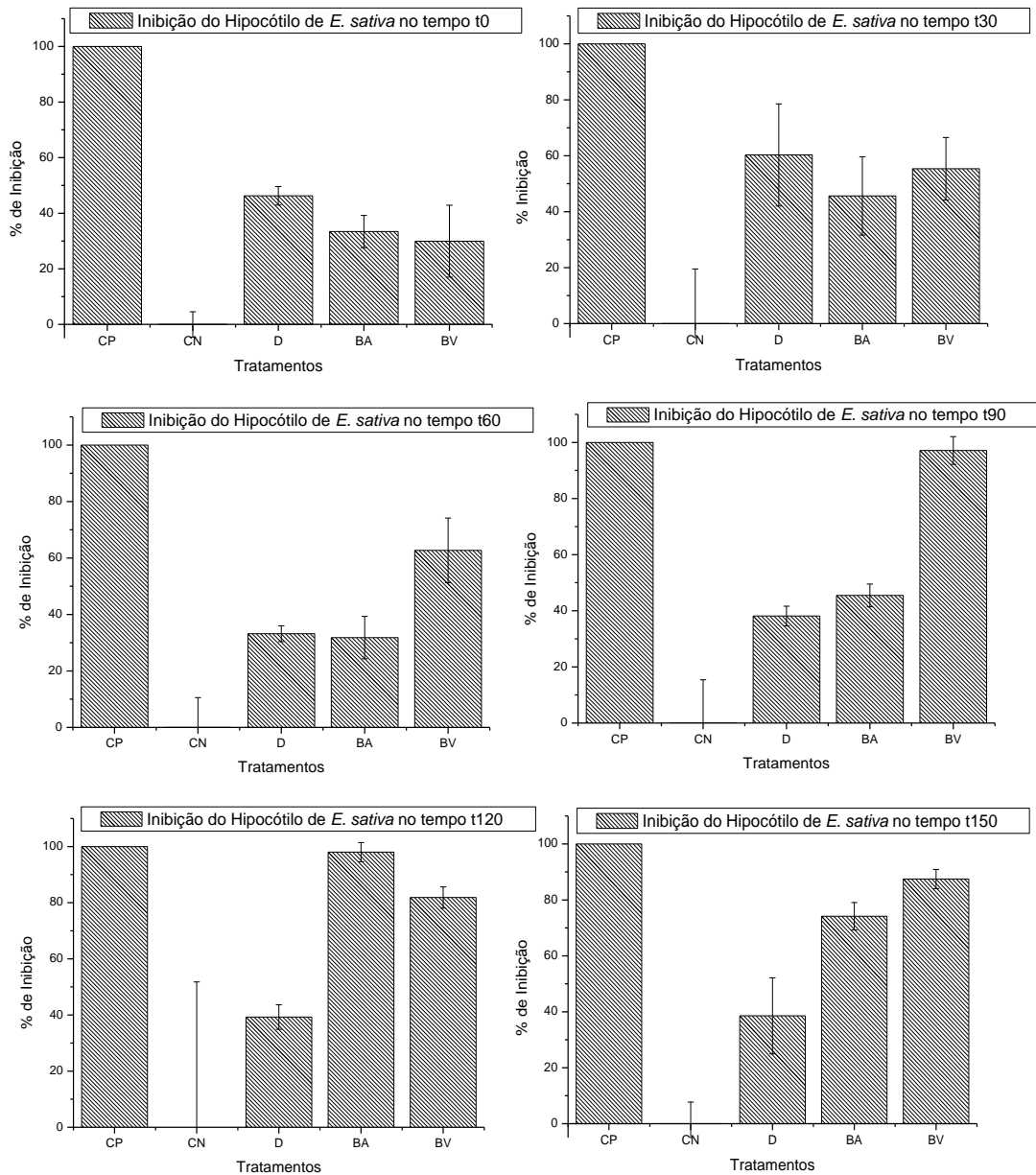
Na Figura 41, no bioensaio com diesel, pode-se observar variação menor na inibição do hipocótilo de *E. sativa* de acordo com o tempo. O hipocótilo apresentou aproximadamente de 33% a 60% de inibição em todos os tempos utilizados.

O biodiesel não apresentou as mesmas características que o diesel, tanto o biodiesel de origem animal quanto o de origem vegetal apresentaram grande variação de inibição nos diferentes tempos estudados, apresentando nos tempos finais (t120 e t150) as maiores inibições em relação ao controle negativo.

A Tabela 11 expressam as médias de crescimento de hipocótilo nos bioensaios com sementes de *E. sativa*, as médias de crescimento se relacionam de forma inversa a inibição, pois quanto maior o crescimento menor é a inibição.

Pelos dados apresentados na Tabela 11 pode-se observar que a partir do tempo t90 não existe mais diferença significativa entre o controle e o bioensaios com diesel. Fato não observado entre o controle e os bioensaios com biodiesel, tanto de origem animal (BA) quanto de origem vegetal (BV).

Figura 41 - Inibição do hipocótilo de plântulas de *E. sativa* em porcentagem ao longo de 150 dias de análise.



Fonte - Elaborada pelo autor. Dados de média e desvio padrão. CP: Controle positivo, CN: Controle negativo, D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal.

Tabela 11 – Média do crescimento de hipocótilo de *Eruca sativa*

Bioensaios	t0		t30		t60		t90		t120		t150	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Hipocótilo de <i>E. sativa</i>												
Controle Negativo	2,7833 ±0,6472 ^a		2,33 ±1,1914 ^a		3,6467 ±1,1328 ^a		2,505 ±1,4268 ^a		1,8467 ±1,466 ^a		1,465 ±0,8967 ^a	
D	1,495 ±0,4987 ^b		0,925 ±1,0801 ^b		2,4367 ±0,5716 ^b		1,55 ±1,262 ^{ab}		1,1217 ±1,1367 ^{ac}		0,9 ±0,9015 ^{ab}	
BA	1,8533 ±1,0272 ^c		1,2667 ±1,1395 ^b		2,4867 ±0,7777 ^b		1,366 ±0,9951 ^b		0,0367 ±0,2008 ^b		0,3783 ±0,5771 ^{bc}	
BV	1,95 ±0,8225 ^c		1,04 ±1,0419 ^b		1,36 ±1,2125 ^c		0,0717 ±0,3925 ^c		0,335 ±0,7144 ^{bc}		0,1833 ±0,4428 ^c	

Fonte – Elaborada pelo autor. D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal. As letras minúsculas sobrescritas correspondem as diferenças significativas entre os bioensaios ($p < 0,05$) no tempo de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

Na Figura 42 pode-se observar a variação da inibição de raiz de *E. sativa* de acordo com tempo de biodegradação em solo e a Tabela 12 expressam as médias e os respectivos desvios padrões do crescimento da raiz de plântulas de *E. sativa*.

No bioensaio com diesel ocorreu uma pequena variação de inibição, em torno de 40% ao longo de quase todos os tempos de análise. Somente no tempo t60 ocorreu variação inesperada, onde a inibição se mostrou negativa, ou seja, o crescimento radicular se mostrou maior que no controle (Figura 42).

No bioensaio com biodiesel de origem animal (BA) a toxicidade se mostrou maior no tempo t120 e t150, com maior inibição no tempo t120 (Figura 42).

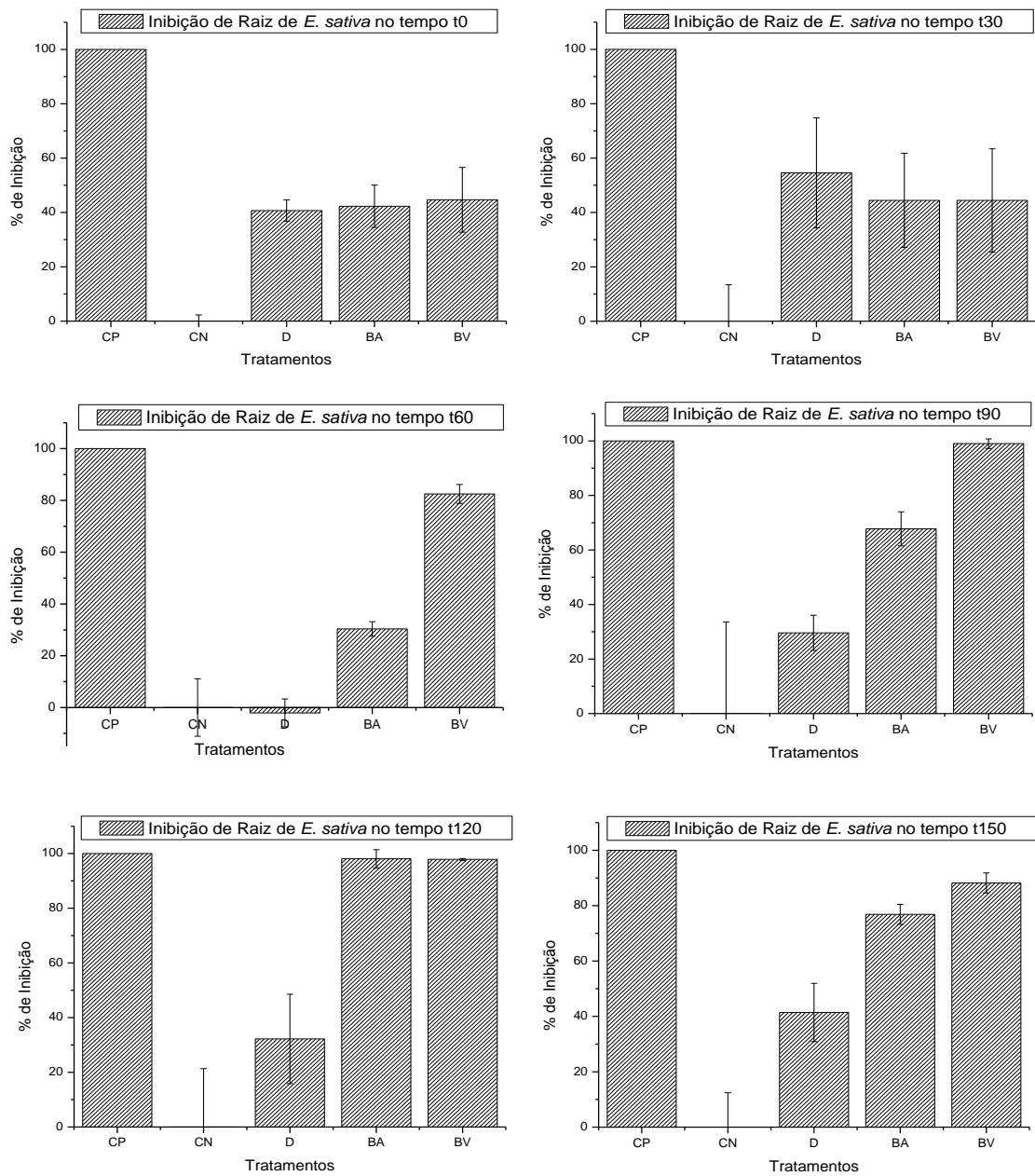
Para o biodiesel de origem vegetal (BV) a toxicidade foi mais intensa no tempo t60 e aumentou sua toxicidade até quase 100% de inibição no tempo t90, mantendo alta toxicidade até o tempo t150 (Figura 42).

Com relação ao crescimento de raiz pode-se observar que no tempo inicial (t0) os bioensaios com diesel e biodiesel tem diferença significativa em relação ao controle negativo e essa diferença é presente também no tempo t30.

Com relação à análise de média de crescimento de raiz em *E. sativa* pode-se observar diferença em relação ao comportamento do hipocótilo, pois no tempo final o bioensaio com diesel se mostrou diferente do controle negativo.

Em comparação ao controle negativo, tanto o BA quanto o BV se mostraram diferentes, apresentando inibição em todos os tempos, evidenciado pela diferença significativa (Tabela 09). No bioensaio com o diesel, nos tempos t60, t90 e t120 o diesel não apresentou diferença no crescimento em relação ao controle negativo (Tabela 12).

Figura 42 - Inibição da raiz de plântulas de *E. sativa* em porcentagem ao longo de 150 dias de análise.



Fonte - Elaborada pelo autor. Dados de média e desvio padrão. CP: Controle positivo, CN: Controle negativo, D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal.

Tabela 12 – Média do crescimento de raiz de *Eruca sativa*

Bioensaios	t0		t30		t60		t90		t120		t150	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle Negativo	2,1833	±0,6126 ^a	2,3733	±1,1333 ^a	4,9717	±1,44 ^a	2,9667	±1,8482 ^a	2,2617	±1,4138 ^a	2,145	±1,0323 ^a
D	1,295	±0,3284 ^b	1,0783	±1,2218 ^b	5,075	±1,3831 ^a	2,0883	±1,8189 ^{ab}	1,5333	±1,6604 ^a	1,2567	±1,1496 ^b
BA	1,26	±0,6333 ^b	1,3183	±1,1907 ^b	3,4633	±1,3309 ^b	0,9567	±0,7458 ^b	0,0433	±0,2373 ^b	0,4967	±0,7917 ^{bc}
BV	1,2083	±0,501 ^b	1,3183	±1,3131 ^b	0,87	±0,8358 ^b	0,03	±0,1643 ^c	0,0483	±0,1004 ^b	0,2533	±0,5998 ^c

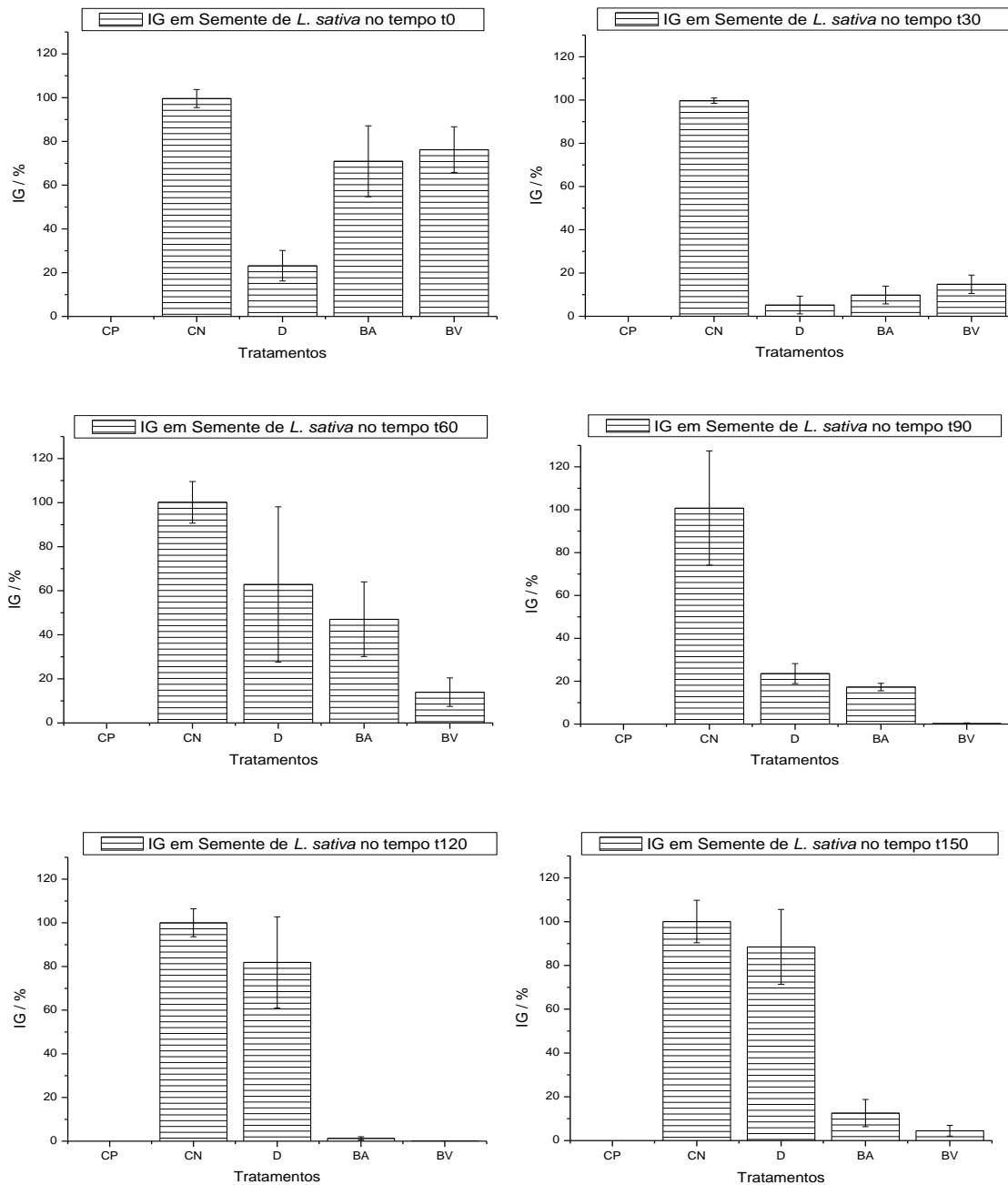
Fonte – Elaborada pelo autor. D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal. As letras minúsculas sobrescritas correspondem as diferenças significativas entre os bioensaios ($p < 0,05$) no tempo de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

5.4.2 Bioensaio de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*

Nas Figuras 43, 44 e 45 estão apresentados os dados dos bioensaios de fitotoxicidade referentes à *Lactuca sativa*.

Na Figura 43 pode-se observar a variação do bioensaio com diesel (D), que apresentou índice de germinação (IG) inicialmente baixo, ou seja, alta toxicidade nos tempos t0 e t30. Ao longo da biodegradação do diesel o IG aumentou chegando ao valor próximo do controle negativo, 100%, nos tempos finais (t120 e t150). Este fato demonstrou queda de toxicidade do diesel para este organismo-teste. De modo contrário ao bioensaio com diesel, os bioensaios com biodiesel de origem animal (BA) e o biodiesel de origem vegetal (BV) se mostraram tóxicos ao longo do tempo de análise. Sendo de forma mais intensa o BV, chegando a valores próximos a zero já no tempo t90.

Figura 43 - índice de germinação para sementes de *L. sativa* em porcentagem ao longo de 150 dias de análise.



Fonte - Elaborada pelo autor. Dados de média e desvio padrão. CP: Controle positivo, CN: Controle negativo, D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal.

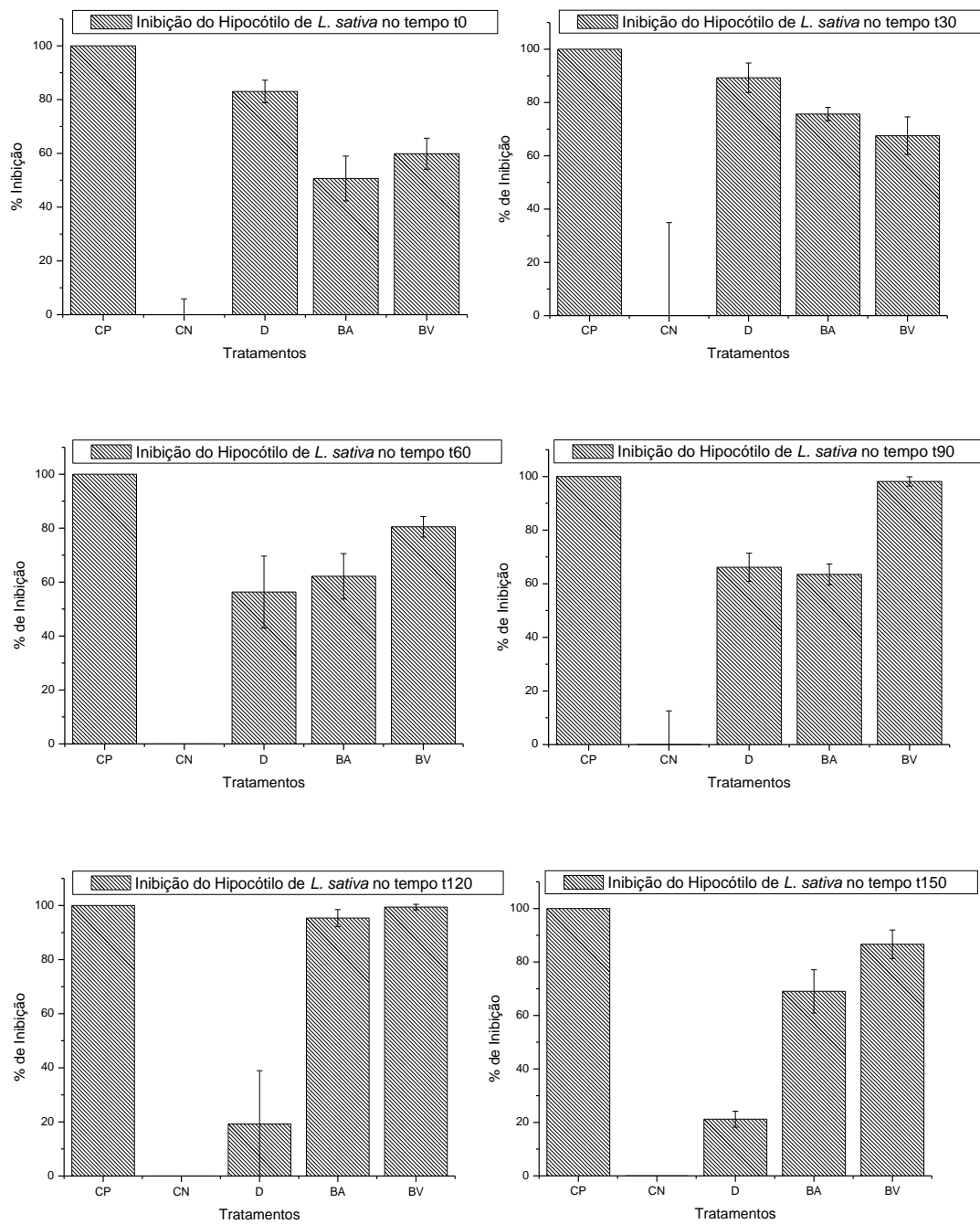
Na Figura 44 pode-se observar a inibição do hipocótilo de *Lactuca sativa* ao longo do tempo de biodegradação em solo em relação ao controle negativo e na Tabela 13 pode-se observar a variação da média de crescimento do hipocótilo de *L. sativa*.

O bioensaio com diesel mostrou menos tóxico ao longo do tempo no que se refere a inibição de hipocótilo (Figuras 44). Durante o tempo de biodegradação o diesel apresentou diminuição na inibição de hipocótilo chegando a 21,21% de inibição em relação ao controle no tempo t150.

Para os bioensaios com biodiesel o contrário foi constatado, mostrando aumento de toxicidade ao longo do tempo de biodegradação. O biodiesel de origem vegetal (BV) apresentou alta inibição, principalmente, após o tempo t60 (Figura 44).

De acordo com a média de crescimento somente o diesel apresentou semelhança com o controle negativo e somente nos tempo finais (t120 e t150), nos restante dos tempo e bioensaios existe diferença significativa, evidenciando toxicidade dos contaminantes durante a biodegradação.

Figura 44 - Inibição do hipocótilo de plântulas de *L. sativa* em porcentagem ao longo de 150 dias de análise.



Fonte - Elaborada pelo autor. Dados de média e desvio padrão. CP: Controle positivo, CN: Controle negativo, D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal.

Tabela 13 – Média do crescimento de hipocótilo de *Lactuca sativa*

Bioensaios	t0		t30		t60		t90		t120		t150	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Hipocótilo de <i>L. sativa</i>												
Controle Negativo	1,7567 ±0,6239 ^a		1,0267 ±0,656 ^a		2,4 ±1,1921 ^a		1,4517 ±0,8606 ^a		1,6817 ±0,9229 ^a		1,2967 ±0,7963 ^a	
D	0,2983 ±0,2571 ^b		0,11 ±0,2053 ^b		1,0483 ±0,7977 ^b		0,4917 ±0,3917 ^b		1,3583 ±1,0151 ^a		1,0217 ±0,6741 ^a	
BA	0,8667 ±0,6063 ^c		0,25 ±0,439 ^b		0,9083 ±0,6369 ^{bc}		0,53 ±0,4401 ^b		0,0783 ±0,1928 ^b		0,4017 ±0,6521 ^b	
BV	0,705 ±0,5246 ^{bc}		0,3333 ±0,5964 ^b		0,4683 ±0,4403 ^c		0,0267 ±0,0828 ^c		0,01 ±0,0548 ^b		0,1733 ±0,3303 ^b	

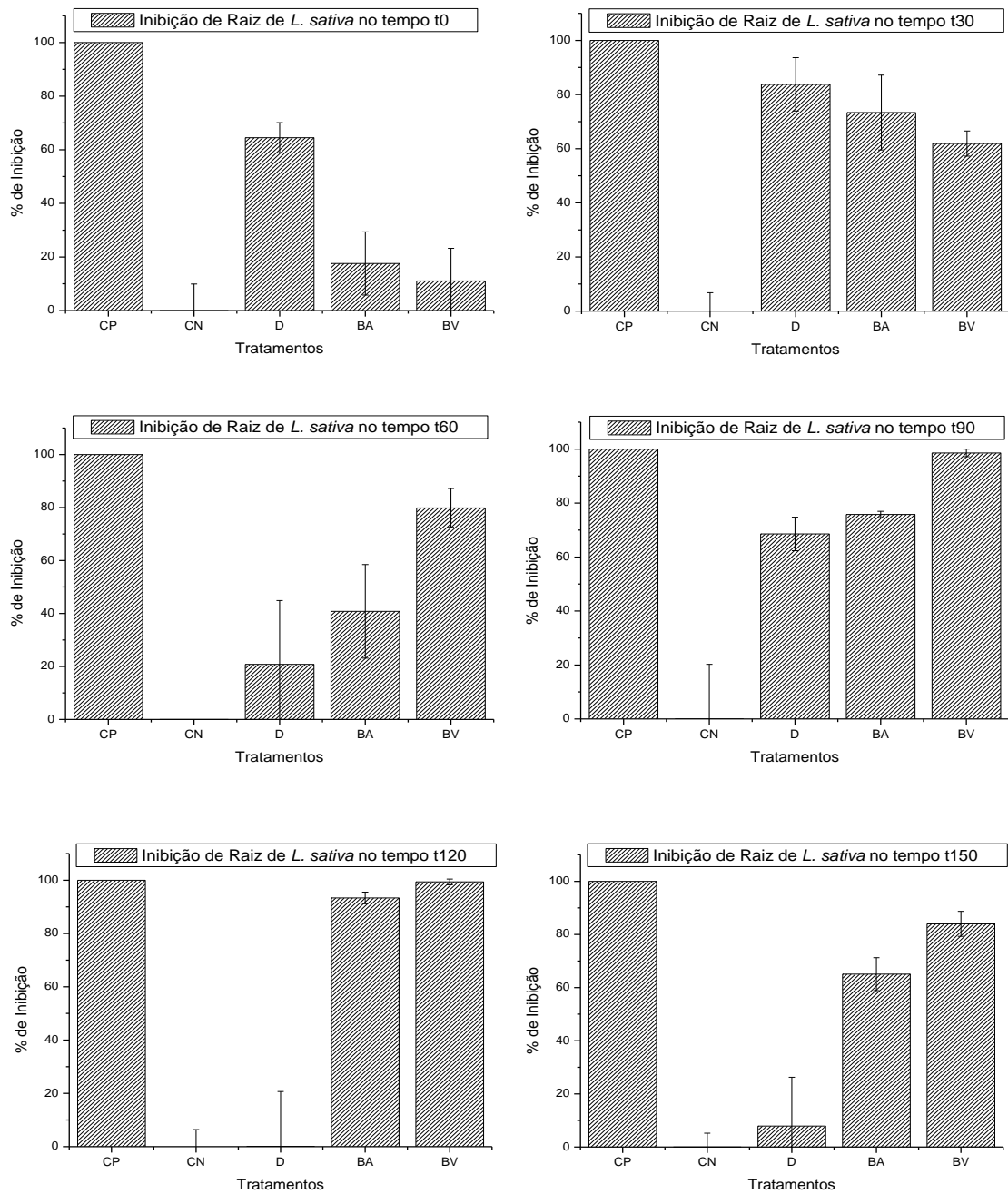
Fonte – Elaborada pelo autor. D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal. As letras minúsculas sobrescritas correspondem as diferenças significativas entre os bioensaios ($p < 0,05$) no tempo de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

Na Figura 45 os dados ilustram o comportamento das plântulas mediante a presença dos contaminantes ao longo do tempo de biodegradação.

No bioensaio com diesel, pode-se observar variação em relação a inibição do crescimento da raiz. Os bioensaios apresentaram variação de inibição no tempos iniciais (t0 e t30), no tempo t60 diminuiu a inibição não apresentando diferença significativa em relação ao controle. No tempo t90 a inibição aumenta e nos tempo finais (t120 e t150) a inibição volta a diminuir, não apresentando diferença significativa na inibição da raiz no bioensaio com diesel em relação ao controle negativo (Tabela 14).

Nos bioensaios com biodiesel, diferentemente com o que ocorreu no hipocótilo, inicialmente os contaminantes (BA e BV) apresentaram menor toxicidade, evidenciado pela diferença na média de crescimento de raiz (Tabela14). Porém, ao longo do tempo de biodegradação os bioensaios com biodiesel se mostraram tóxicos. O biodiesel de origem vegetal (BV) mostrou toxicidade mais intensa (Figura 45).

Figura 45 - Inibição da raiz de plântulas de *L. sativa* em porcentagem ao longo de 150 dias de análise.



Fonte - Elaborada pelo autor. Dados de média e desvio padrão. CP: Controle positivo, CN: Controle negativo, D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal.

Tabela 14 – Média do crescimento de raiz de *Lactuca sativa*

Bioensaios	t0		t30		t60		t90		t120		t150	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Hipocótilo de <i>L. sativa</i>												
Controle Negativo	0,9483 ±0,3861 ^a		1,295 ±0,7357 ^a		2,6633 ±1,4233 ^a		2,1267 ±1,1172 ^a		1,6083 ±0,9102 ^a		1,4167 ±0,8209 ^a	
D	0,3367 ±0,3 ^b		0,21 ±0,4444 ^b		2,11 ±1,6249 ^{ac}		0,6683 ±0,5911 ^b		1,6067 ±1,1884 ^a		1,305 ±0,9479 ^a	
BA	0,7817 ±0,5037 ^a		0,345 ±0,6828 ^b		1,5767 ±1,4223 ^{bc}		0,515 ±0,5206 ^b		0,1067 ±0,2599 ^b		0,495 ±0,8051 ^b	
BV	0,8433 ±0,5536 ^a		0,4933 ±0,7393 ^b		0,5367 ±0,5372 ^c		0,03 ±0,0952 ^c		0,01 ±0,0548 ^b		0,2267 ±0,4307 ^b	

Fonte – Elaborada pelo autor. D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal. As letras minúsculas sobrescritas correspondem as diferenças significativas entre os bioensaios ($p < 0,05$) no tempo de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

5.4.3 Bioensaio de fitotoxicidade com sementes de *Cucumis sativus*

As Figuras 46, 47 e 48 mostram, respectivamente, o índice de germinação (IG) de sementes de *Cucumis sativus*, inibição do hipocótilo de plântulas de *C. sativus* e inibição do crescimento de raiz de plântulas de *C. sativus*.

Na Figura 46, em que os dados se apresentam em porcentagem, pode-se observar o comportamento das sementes de *C. sativus* mediante a presença de um contaminante e o como se dá o comportamento mediante a biodegradação desses contaminantes.

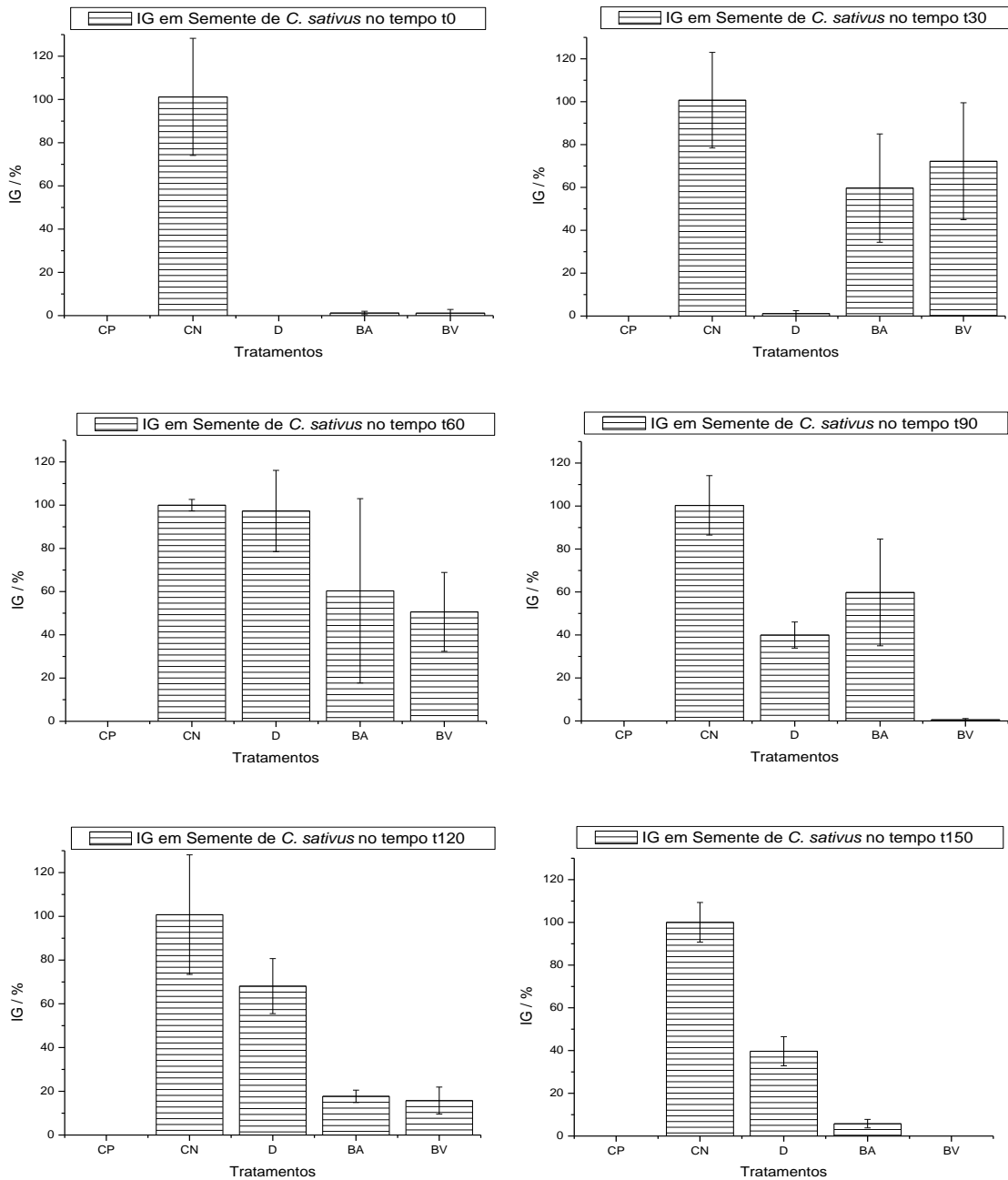
Pode-se observar na Figura 46 que no bioensaio com diesel apresentou-se mais tóxico nos tempos iniciais (t0 e t30) e diminui sua toxicidade nos demais tempos (t60, t90, t120 e t150). Lembrando que no caso do índice de germinação, quanto maior o valor menor foi sua toxicidade em relação ao controle negativo.

Nos bioensaios com biodiesel de origem animal (BA) e de origem vegetal (BV) os dados se mostraram semelhantes, somente no tempo t90 o biodiesel de origem vegetal se mostrou muito mais tóxico que o biodiesel de origem animal (Figura 46).

O bioensaio com BA (Figura 46) apresentou no t0 alta toxicidade (IG de 1,21%), nos tempos t30, t60 e t90 apresentou toxicidade mediana e nos tempos finais (t120 e t150) apresentou novamente alta toxicidade.

Na Figura 46, inicialmente o bioensaio com BV se mostrou tóxico para as sementes ao apresentar o índice de germinação (IG) de 1,16%. Nos tempos seguintes, t30 e t60, as toxicidades diminuíram, ou seja, os valores do IG aumentaram, respectivamente 72,23% e 50,62%. Apesar do aumento do IG nos tempos t30 e t60, nos demais tempo de biodegradação em solo os valores diminuíram para zero.

Figura 46 - índice de germinação para sementes de *C. sativus* em porcentagem ao longo de 150 dias de análise.



Fonte - Elaborada pelo autor. Dados de média e desvio padrão. CP: Controle positivo, CN: Controle negativo, D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal

Na Figura 47 pode-se observar a inibição do hipocótilo de plântulas de *Cucumis sativus* e a Tabela 15 mostra a diferença do crescimento do hipocótilo de plântulas de *C. sativus* entre os tratamentos.

No tempo t0 os bioensaios mostraram alta toxicidade por parte dos contaminante, chegando a quase 100% de inibição no bioensaio com diesel (D), biodiesel de origem animal (BA) e biodiesel de origem vegetal (BV), a diferença de crescimento de hipocótilo é significativa e evidencia a toxicidade inicial para esses contaminantes (Tabela 15).

No tempo t30 ocorreu a diminuição de toxicidade para os bioensaios com biodiesel, não apresentando diferença significativa entre o controle, BA e BV (Tabela 15).

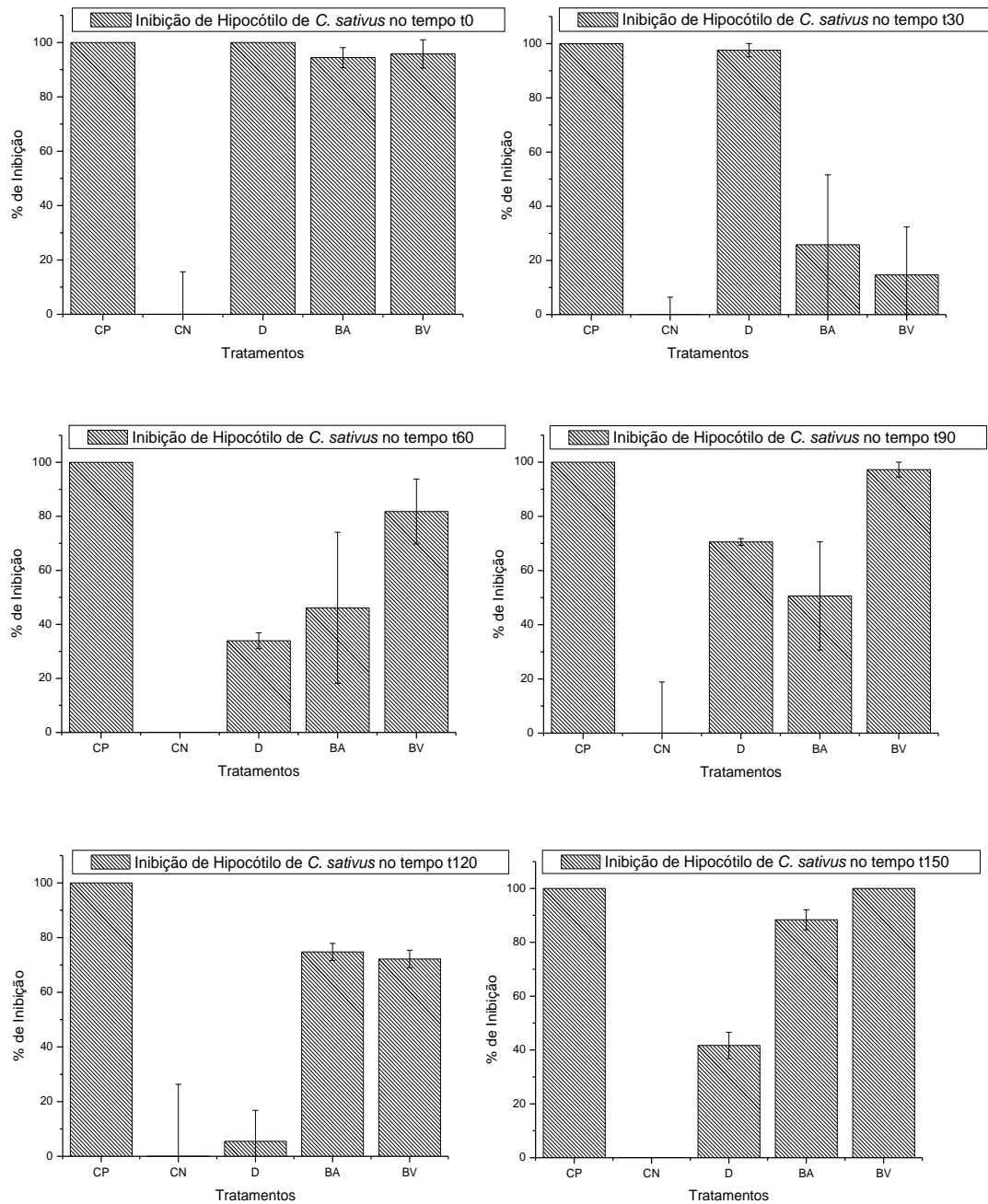
No tempo t60 ocorreu aumento de toxicidade para BA e BV, com maior intensidade para BV, tendo inibição de 81,79%. O diesel diminuiu sua toxicidade, mas apresentou-se de forma mediana (46,13%) com menor crescimento de hipocótilo em relação ao controle.

No tempo t90 ocorreu o mesmo fato do tempo anterior (t60), o bioensaio com BV com maior inibição de hipocótilo e, de forma intermediária, os bioensaios com diesel e BA.

No tempo t120 ocorreu a diminuição de inibição no bioensaio com diesel e nos bioensaios com biodiesel se mantiveram tóxicos, o bioensaio com BA apresentou inibição de 74,75% e com BV apresentou inibição de 72,17%.

No tempo t150 ocorreu aumento maior de inibição para BA e BV e, em menor quantidade, um aumento de toxicidade no bioensaio com o diesel (41,70% de inibição).

Figura 47 - Inibição do hipocótilo de plântulas de *C. sativus* em porcentagem ao longo de 150 dias de análise.



Fonte: Elaborada pelo autor. Dados de média e desvio padrão. CP: Controle positivo, CN: Controle negativo, D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal.

Tabela 15 – Média do crescimento de hipocótilo de *Cucumis sativus*

Bioensaios	t0		t30		t60		t90		t120		t150	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Hipocótilo de <i>C. sativus</i>												
Controle Negativo	2,7017	±1,1076 ^a	2,5600	±1,3346 ^a	5,9033	±0,8533 ^a	4,3283	±2,0436 ^a	3,1617	±1,7172 ^a	7,845	±2,3779 ^a
D	0,0000	±0,0000 ^b	0,0617	±0,1892 ^b	3,8983	±1,4287 ^b	1,2733	±0,7497 ^b	2,9883	±1,3616 ^a	4,5733	±3,556 ^b
BA	0,1500	±0,4152 ^b	1,9000	±1,9144 ^a	3,1800	±2,5707 ^b	2,1367	±1,8563 ^b	0,7983	±0,7342 ^b	0,9117	±1,1041 ^c
BV	0,1133	±0,3655 ^b	2,1850	±1,8263 ^a	1,0750	±1,4202 ^c	0,1183	±0,3720 ^c	0,88	±0,5386 ^b	0	±0 ^c

Fonte – Elaborada pelo autor. D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal. As letras minúsculas sobrescritas correspondem as diferenças significativas entre os bioensaios ($p < 0,05$) no tempo de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

A Figura 48 e a Tabela 16 apresentam respectivamente os dados referentes a inibição da raiz em relação ao controle de *Cucumis sativus* e a média de crescimento da raiz.

No tempo t0 ocorreu o mesmo fato observado para o hipocótilo, alta inibição de raiz de *C. sativus* para todos os bioensaios com presença de contaminantes (Figura 48).

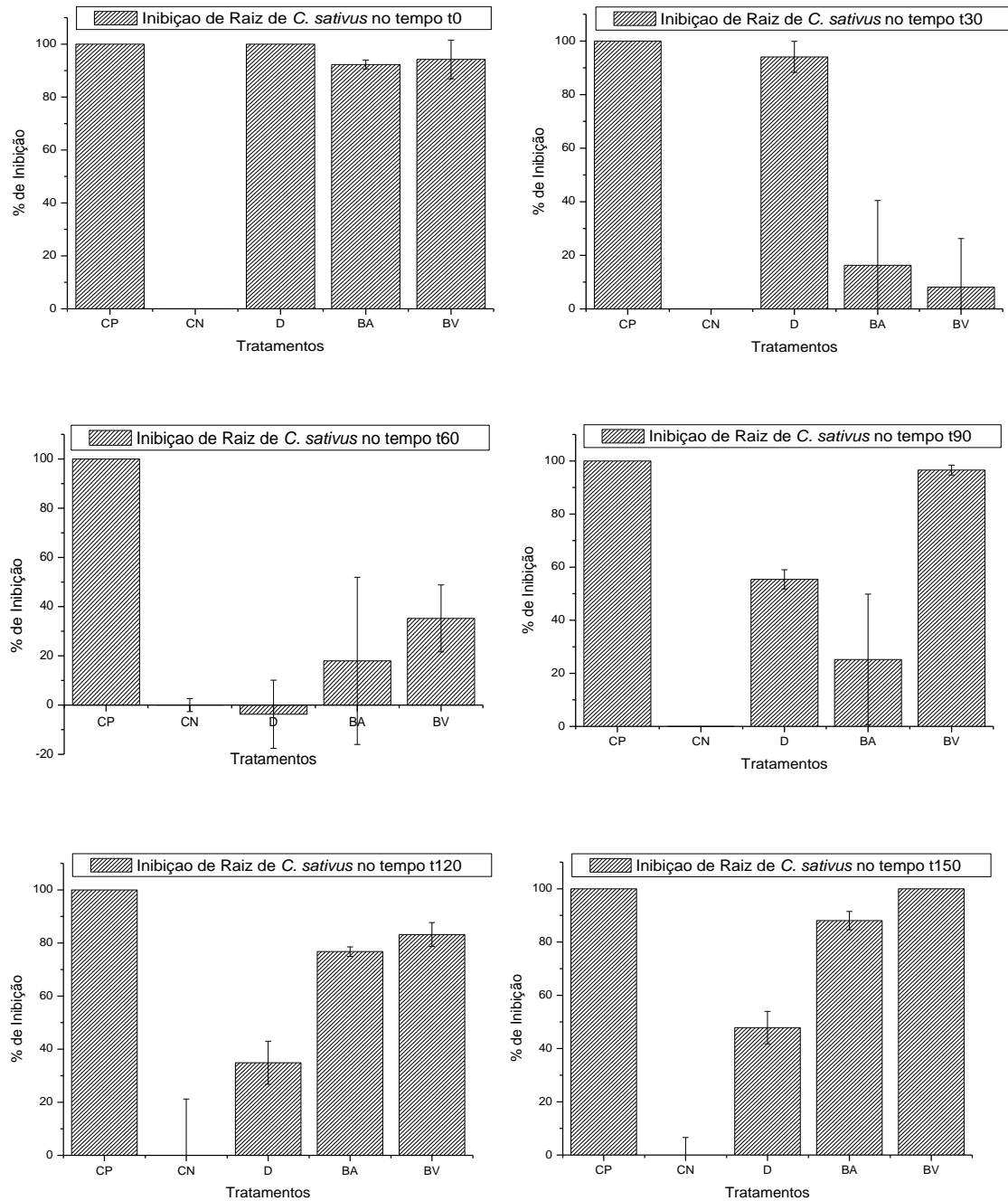
Observando a Figura 48, no tempo t30, ocorreu diminuição na inibição para os bioensaios com BA e BV, evidenciado pela não diferença significativa em relação ao controle negativo (Tabela16). No bioensaio com diesel a inibição se manteve alta (94,07%).

No tempo seguinte (t60) ocorreu diminuição na inibição em todos os bioensaios, evidenciado pela diferença não significativa de crescimento em relação ao controle negativo.

No t90 ocorreu aumento de toxicidade principalmente para o bioensaio com BV, seguido pelo diesel.

Nos tempo seguintes (t120 e t150) ocorreu aumento na inibição por parte de todos os bioensaios, evidenciado pela diferença significativa de crescimento de raiz em relação ao controle negativo, principalmente no tempo t150 (Tabela16).

Figura 48 - Inibição da raiz de plântulas de *C. sativus* em porcentagem ao longo de 150 dias de análise.



Fonte: Elaborada pelo autor. Dados de média e desvio padrão. CP: Controle positivo, CN: Controle negativo, D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal

Tabela 16 – Média do crescimento de raiz de *Cucumis sativus*

Bioensaios	t0		t30		t60		t90		t120		t150	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Raiz de <i>C. sativus</i>												
Controle Negativo	4,8150 ±1,8251 ^a		3,4867 ±1,6818 ^a		5,5213 ±0,8775 ^{ab}		4,6233 ±1,7781 ^a		4,2767 ±2,3457 ^a		5,0333 ±1,5048 ^a	
D	0,0000 ±0,0000 ^b		0,2067 ±0,6487 ^b		5,7267 ±1,7794 ^a		2,0617 ±1,0500 ^b		2,785 ±1,2467 ^a		2,625 ±1,8677 ^b	
BA	0,3700 ±1,0124 ^b		2,9183 ±2,5981 ^a		4,5300 ±3,6113 ^{ab}		3,4583 ±2,5426 ^{ab}		0,9933 ±0,825 ^b		0,6017 ±0,7711 ^c	
BV	0,2783 ±0,9768 ^b		3,2033 ±2,5164 ^a		3,5767 ±2,8443 ^b		0,1583 ±0,4418 ^c		0,7183 ±0,5446 ^b		0 ±0 ^c	

Fonte – Elaborada pelo autor. D: Diesel, BA: Biodiesel de origem animal, BV: Biodiesel de origem vegetal. As letras minúsculas sobrescritas correspondem as diferenças significativas entre os bioensaios ($p < 0,05$) no tempo de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

5.4.4 Discussão dos bioensaios de fitotoxicidade com sementes

De modo geral pode-se observar que nos bioensaios utilizando *E. sativa* a toxicidade aumentou em tempos maiores de biodegradação do biodiesel no solo. No bioensaio com diesel mostrou inibição de hipocótilo e raiz não muito alta, da mesma forma o índice de germinação. O aumento de toxicidade já foi observado por Tamada et al. (2012b), onde estudaram a biodegradação de óleos vegetais e biodiesel em solo.

Para *Lactuca sativa* o diesel se mostrou menos tóxico principalmente nos tempos finais (t120 e t150), porém para os bioensaios com biodiesel de origem animal e biodiesel de origem vegetal a biodegradação aumentou a inibição de hipocótilo e raiz, evidenciados dela diferença significativa no crescimento em relação ao controle negativo.

De modo geral, pode-se observar início alto de toxicidade nos bioensaios tendo *Cucumis sativus* como organismo-teste e, com o passar do tempo, ocorreu diminuição de toxicidade, porém nos tempo finais a toxicidade volta a aumentar, indicando que o tempo amostrado ainda não foi o suficiente para que ocorresse total degradação dos contaminantes.

O fato do diesel se mostrar tóxico nos tempos iniciais dos bioensaios realizados pode estar relacionado à sua forma de atuar quanto presente no solo, pois Adam e Ducan (2002) inferem que o diesel envolve as sementes criando assim uma barreira física impedindo trocas gasosas e entrada de água, em outras palavras dificultando sua germinação e, segundo Ogbo (2009) o diesel interfere também no crescimento da raiz, fato esse confirmado pela diferença significativa de crescimento em relação ao controle negativo em alguns casos.

Pode-se observar que o biodiesel de origem vegetal apresentou alta inibição no solo, principalmente após 90 dias de biodegradação. Isto mostra que o biodiesel ao ser biodegradado aumenta consideravelmente a toxicidade no solo devido a sua degradação, pois forma peróxidos e ácidos orgânicos de forma a reduzir o pH do solo, fato esse observado por Bouaid et al. (2007) no estudo com biodiesel de origem vegetal. A diminuição do pH do solo inibe organismos superiores, como os organismos testes utilizados; além de interferir na microbiota local, pois estes só vão aumentar a biodegradação com o auxílio do surfactante.

Um aspecto interessante observado é a toxicidade alta para os bioensaios com biodiesel de origem animal e de origem vegetal, sem diferença significativa para todos os bioensaios nos tempos finais de biodegradação (120 e 150 dias e biodegradação em solo). O fato de não apresentar diferença significativa mostra que o conservante TBHQ não influencia de forma efetiva na toxicidade dos contaminantes.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode se concluir que o modelo de Membré e colaboradores adaptado para produção semanal de CO₂ não se adequou aos valores obtidos na respirometria.

Pela respirometria pode se observar as melhores misturas em termos de biodegradação, colocando os sistemas 08, 09 e 12 como os que mais produzem CO₂ sem a presença de surfactante e em sistemas que apresentaram surfactante ocorreu melhora na produção de CO₂, principalmente, nos que apresentavam 10% de mistura de biodiesel no diesel (BA10 com surfactante e BV10 com surfactante) não sendo de forma proporcional para todos os tratamentos. Ainda, de acordo com a modelagem adaptada do Schmidt e colaboradores o sistema 17 (BA50+Surf.) apresentou a maior produção de CO₂, mostrando ser a melhor mistura de biodiesel com diesel analisada.

A colorimetria não apresentou resultados iguais a respirometria. A colorimetria mostrou que o biodiesel (de origem animal e vegetal) é mais biodegradável que o diesel puro e que quanto maior a proporção de biodiesel em misturas com diesel, menor é o tempo para degradação.

Quanto à fitotoxicidade os bioensaios se mostraram bem claros, com toxicidade maior para o biodiesel de origem vegetal, principalmente nos tempo finais de biodegradação em solo. Os bioensaios mostraram também que o tempo para degradação dos contaminantes amostrados é superior a 150 dias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. Biodegradation and bioremediation. San Diego: Academic Press, 453 p., 1994.

ADAM, G. DUNCAN, H. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environment Pollution**, v. 120, p. 363-370, 2002.

AYRES, M.; AYRES, M. J.; AYRES D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas na áreas das ciências biomédicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, Ministério da Ciência e Tecnologia; Belém Imprensa Oficial do Estado do Pará, 2007. 364 p.

BALBA, M. T., AL-AWADHI, N. AND AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, n. 32, p.155-164. 1998.

BALBA, M. T.; AL-SHAYJI, Y.; AL-AWADHI, N.; YATEEM, A. Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from oil-contaminated soil. **Soil and Sediment Contamination**, v. 11, p. 41-55, 2002.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, p. 57-68, 2003.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of flask and method of measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v. 100, n. 1, p. 60-70, 1965.

BENTO, F. M., CAMARGO, F. A. O.; Okeke, B.; Frankenberger-Júnior, W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34 (Supl.1):65-68, 2003.

BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. **Fuel**, v. 86, p. 2596–2602, 2007.

CELIK, G. Y.; ASLIM, B.; BEYATLI, Y. Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 6, p. 867-870, 2008.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Solos – Determinação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha**. Norma técnica L.6.350, 1990.

CHAÎNEAU, C. H.; YEPREMIAN, C.; VIDALIE, J. F.; DUCREUX, J.; BALLERINI, D. Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessment. **Water, air and Soil Pollution**, v.144, p.419-440, 2003.

CUNHA, C. D. **Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996.

DAL FORNO, R. G. **Avaliação da poluição do solo por derivados de petróleo e sua remediação**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 89 p., 2006

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

DEMIRBAS, A. Biodegradability of biodiesel and petrodiesel fuels. **Energy Sources, Part A**, v. 32, p. 169-174, 2008.

DIFCO. Difco Manual. Difco Laboratories, Detroit, 1155 p., 1984.

DUTKA, B. **Short-term root elongation toxicity bioassay - Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments**. National Water Research Institute (NWRI), Canada, 1989.

FERRARI, R. A.; SOUZA, W. L. Avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 1 p. 106-111, 2009.

FETTER, C. W. Contaminant Hydrogeology. New York: Macmillan, 500 p., 1993.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO J. R. M.. Biodiesel de Soja – Reação de Transesterificação para Aulas Práticas de Química Orgânica. **Química Nova**, v. 30, n.5, p. 1369-1373, 2007.

HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, p. 745-748, 1993.

HARAYAMA, S.; KISHIRA, H.; KASAI, Y.; SHUTSUBO, K. Petroleum biodegradation in marine environments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.1, p. 63-70, 1999.

IEA – International Energy Agency, 2011. Disponível em < <http://www.iea.org/stats/index.asp> >. Acesso em: 09 set 2012.

INAZAKI, T. H. **Avaliação da biodegradação de efluentes com substâncias persistentes antes e após tratamento eletrolítico para proposta de tratamento físico-biológico alternativo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, 127 p., 2003.

INAZAKI, T. H.; PIÃO, A. C. S.; BIDOIA, E. D.; RÉGIS, G.; ANGELIS, D. F. Teste de toxicidade utilizando sementes de *Euruca sativa*. Arquivos do Instituto Biológico, v. 68 (supl.), p. 1-131, 2001.

KERNANSHANI, A.; KARARNANEV, D.; MARGARITIS, A. Kinetic modeling of the biodegradation of the aqueous p-xylene in the immobilized soil bioreactor. **Engineering Journal**, v. 27, p. 204–211, 2006.

KOSTKA, J. E.; PRAKASH, O.; OVERHOLT, W. A.; GREEN, S. J.; FREYER, J.; CANION, A.; DELGARDIO, J.; NORTON, N.; HAZEN, T. C.; HUETTEL, M. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico Beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 7962-7974, 2011.

LANDIS, W. G.; YU, M. H. Introduction to environmental toxicology: impacts of chemical upon ecological systems. Florida. Lewis Publishers, 1998. 390p.

LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Evaluation of the biodegradation of different types of lubricant oils in liquid médium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1285-1290, 2009.

LOPES, P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; DOMINGUES, R. F.; BIDOIA, E. D. Toxicity and biodegradation in sandy soil contaminated by lubricant oil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, p. 454-458, 2010.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

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

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; PIRÔLLO, M. P. S., CONTIERO, J.; BONOTTO, D. M. Investigation about the efficiency of the bioaugmentation technique when applied to diesel oil contaminated soils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n. 5: pp. 1297-1312, 2009.

MME - Ministerio de Minas e Energia. **Resenha Energética**, 2011. Disponível em <<http://www.mme.gov.br/>> Acesso em: 20 fev 2013.

MONTAGNOLLI, R. N. **Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 2011: 245 p. Dissertação (mestrado em microbiologia aplicada) – Universidade estadual paulista, Rio Claro, 2011.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 297-305, 2009.

MORALES, G. C. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: Estación, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**. México: IMTA, 2004. 189 p.

OGA, S.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Introdução à toxicologia. In: Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, p. 1-7, 2003.

OGBO, E. M. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants - *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8 (2), pp. 250-253, 2009.

OLLIVIER, B.; MAGOT, M. Petroleum Microbiology. ASM Press, Washington, 365 p., 2005.

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

PALA, D. M.; CARVALHO, D. D.; PINTO, J. C.; SANT'ANNA, G. L. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.58, p.254–260, 2006.

PASSARELLI, M. M. Poluentes da Atmosfera. In: Oga, S. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, p. 102-104, 2003.

PENET, S.; MARCHAL, R.; SGHIR, A.; MONOT, F. Biodegradation of hydrocarbon cuts used for diesel oil formulation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.66, p. 40–47, 2004.

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

PRIMAVESI, A. Manejo Ecológico do Solo: a agricultura em regiões tropicais. São Paulo: Nobel, p. 164-203, 1987.

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

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology Progress*, v. 18, 1277–128, 2002.

RÉGIS, G. **Tratamento eletrolítico das águas residuárias de uma indústria produtora de antioxidante de borracha visando sua biodegradação**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, 117 p., 2000.

ROSA, A. P.; TRIGUIS, A. J. Biorremediation process on Brazil shoreline. **Environmental Science Pollution Resource International**, v. 17, p. 470-476, 2007.

ROSATO, Y. B. Biodegradação de Petróleo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: Embrapa- CNPMA, 440 p., 1997.

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

SILVA, R. L. B.; BARRA, C. M.; MONTEIRO, T. C. N.; BRILHANTE, O. M. A. Study of groundwater contamination with organic fuels and potential public health impact in Itaguaí, Rio de Janeiro State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v.18, n.6, p. 1599-1607, 2002.

SMILES, D. E. Aspects of the physical environment of soils organisms. **Biology and Fertility of Soils**, v. 6, n. 3, p. 204-215, 1988.

STINE, K., Brown, T. M. Principles of Toxicology. Boca Raton: CRC Press, 392 p., 1996.

SUTER, G. Organism-level Effects. In: SUTER, G.W.II; Ecological risk assessment. Michigan: Lewis Publishers, 538 p., 1993.

TAMADA, I. S.; LOPES, P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; BIDOIA, E. D. Biodegradation and toxicological evaluation of lubricant oils. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.55 (6), pp.951-956, 2012a.

TAMADA, I. S.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. *Brazilian Journal. Microbiology*. 43(4): 1576-1581, 2012b.

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. Processos oxidativos avançados. Conceitos teóricos. Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Caderno temático, v.3, 2004.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spendpig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, v. 93, n.3, p. 249-256, 1996.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; GOPUR, M. Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 81, p. 203-209, 2003.

USEPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological Effects Test Guidelines: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test**, 1996.

VARGAS, M. Introdução a Mecânica dos Solos. São Paulo, McGraw'Hill do Brasil, Ed. da Universidade de São Paulo, p. 03-46, 1977.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. **Environmental International**, v. 26, p. 409–411, 2001.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

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

WANG, W. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 6, p. 409-414, 1987.

WARD, O.; SINGH, A.; VAN HAMME, J. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial and Microbiology Biotechnology**, v. 30, p. 260–270, 2003.

WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 259–276, 2001.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. 1 ed. São Paulo, SP, Brasil. Editora Rima, 2006. 478 p.

ZILLI, J. R.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciências e Tecnologia**, v. 20, n. 3, p.391-411, 2003.