
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

Avaliação Ecotoxicológica da Biodegradação Utilizando Inóculo Enriquecido com *Bacillus subtilis* em Solo Contaminado com Petróleo, Diesel e Biodiesel

JAQUELINE MATOS CRUZ

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 Microbiologia Aplicada.

Maio - 2013

576 Cruz, Jaqueline Matos
C957a Avaliação ecotoxicológica da biodegradação utilizando
inóculo enriquecido com *Bacillus subtilis* em solo
contaminado com petróleo, diesel e biodiesel / Jaqueline
Matos Cruz. - Rio Claro, 2013
68 f. : il., gráfs., tabs., fots.

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

1. Microorganismos. 2. Sementes. 3. Hidrocarbonetos. 4.
Biorremediação. I. Título.

Jaqueline Matos Cruz

**Avaliação Ecotoxicológica da Biodegradação Utilizando Inóculo
Enriquecido com *Bacillus subtilis* em Solo Contaminado com Petróleo,
Diesel e Biodiesel**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Aplicada.

Orientador: Profº Dr. Ederio Dino Bidoia

Março de 2013

Rio Claro

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À DEUS, por ter colocado em meu caminho todas as pessoas aqui citadas

À minha FAMILIA, principalmente mãe e pai, pelo amor incondicional, pelos valores ensinados e a dedicação em apoiar todas as minhas decisões;

Ao Profº Dr. Ederio Dino Bidoia pela orientação neste trabalho;

Ao pessoal do laboratório Graziely (Grazy), Ivo, Paulo Renato (Chal), Erica, Eduardo Mitter (Burns) e Renato Montagnolli (Bill); foi um enorme prazer conhecer e conviver com todos;

Ao técnico Roberto (Beto) pelas inúmeras vezes que me ajudou durante a pesquisa;

Ao Profº Dr. Antonio Carlos Simões Pião pelos esclarecimentos quanto aos testes estatísticos;

A Profº Dra. Dejanira F. de Angelis por ter auxiliado a obter as amostras de petróleo e diesel;

A Refinaria do Planalto (REPLAN) por ter cedido às amostras de petróleo e diesel utilizadas neste estudo;

A empresa JBS por ter cedido a amostra de biodiesel utilizada neste estudo;

Ao CNPq e PRH-05/Petrobrás pelo apoio financeiro.

RESUMO

Nos últimos anos, a avaliação da qualidade do solo após o processo de biorremediação era baseada apenas em dados químicos, porém este procedimento não pode prever os efeitos dessas substâncias aos organismos. Assim os testes ecotoxicológicos têm sido utilizados como ferramenta complementar para avaliação da toxicidade. O metabolismo microbiano responsável pela biodegradação de várias substâncias é diretamente relacionado com a toxicidade, pois o processo de biodegradação não garante diminuição da toxicidade. Além disso, a toxicidade de um poluente pode afetar os micro-organismos, inviabilizando parte dos processos biogeoquímicos cruciais para todos os organismos. Em ensaios ecotoxicológicos com sementes, a sensibilidade dos períodos de germinação e o desenvolvimento da plântula são utilizados para avaliar a interferência do contaminante no desenvolvimento do organismo. Deste modo, o objetivo do trabalho foi avaliar a fitotoxicidade de solo contaminado com biodiesel, diesel e petróleo em diferentes tempos de biodegradação utilizando como organismo-testes as sementes de *Cucumis sativus* (pepino), as de *Lactuca sativa* (alface) e as de *Eruca sativa* (rúcula). Avaliou-se, também, a eficiência da biodegradação utilizando o *Bacillus subtilis* no solo, como também o metabolismo da microbiota indígena frente aos contaminantes por meio de um método colorimétrico adaptado baseado no uso de acceptor de elétrons como o 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP). Os resultados mostraram que o biodiesel sofreu maior biodegradação que os hidrocarbonetos do petróleo e menor toxicidade após 240 dias. Todas as sementes foram inibidas com menor intensidade no solo contaminado com biodiesel biodegradado durante 240 dias. O petróleo e o diesel não foram totalmente biodegradados. O alongamento da raiz e do hipocótilo de *C. sativus* e *L. sativa* foram os parâmetros que apresentaram correlação entre o tempo de biodegradação e a diminuição da fitotoxicidade do biodiesel e do diesel enriquecido com *B. subtilis*. A incubação do solo contaminado com óleo diesel e *B. subtilis* durante 240 dias apresentou baixa inibição ao alongamento da raiz de pepino e alface. O solo contaminado com petróleo foi tóxico para *Eruca sativa* e *Lactuca sativa*, por outro lado as raízes de *C. sativus* foram insensíveis a presença do petróleo no solo. A adição do *B. subtilis* não afetou a consideravelmente a biodegradação e nem a toxicidade. O método colorimétrico com DCPIP foi sensível para indicar a atividade dos micro-organismos do solo na presença do contaminante, principalmente, em solo contaminado com biodiesel.

ABSTRACT

The assessment of soil quality after the bioremediation process was based solely on chemical data, but this procedure cannot predict the effects of these substances to organisms. Thus, the ecotoxicity tests have been used as a complementary tool for evaluation of toxicity. The microbial metabolism responsible for biodegradation of various substances is directly related to toxicity, because the biodegradation process does not guarantee decreased toxicity. Moreover, the toxicity of a pollutant can affect the microorganisms, preventing part of biogeochemical processes important to all organisms. In ecotoxicological assays with seed, the sensitivity of the periods of germination and seedling development are used to evaluate the influence of the contaminant on the organism development. Thus, the objective of this study was to evaluate the phytotoxicity of contaminated soil with biodiesel, diesel and petroleum at different times of the biodegradation using as organism-tests the seeds of *Cucumis sativus* (cucumber), *Lactuca sativa* (lettuce) and *Eruca sativa* (arugula). Also it was evaluated the efficiency of *Bacillus subtilis* in the biodegradation, as well as the metabolism of the microorganism indigenous against the contaminants by a colorimetric method adapted. The results showed that biodiesel was more biodegradable than petroleum hydrocarbons and less toxic after 240 days of biodegradation. The petroleum and diesel were not completely biodegraded. The root and hypocotyl elongation of *C. sativus* and *L. sativa* were the parameter that showed the correlation between the times of biodegradation and decrease of the phytotoxicity of biodiesel and diesel enriched with *B. subtilis*. The incubation of contaminated soil with diesel and *B. subtilis* during 240 days showed low inhibition of the root elongation of cucumber and lettuce. The contaminated soil with petroleum was toxic to *Eruca sativa* and *Lactuca sativa*, on the other hand the roots of *C. sativus* were insensitive to the presence of petroleum in the soil. The addition of *B. subtilis* did not affect considerably the biodegradation and toxicity. The colorimetric method with DCPIP was sensitive to indicate the activity of soil microorganisms in the presence of the contaminant, mostly in soil contaminated with biodiesel.

Lista de Figuras

Figura 1 - Disposição das amostras contaminadas no canteiro.....	23
Figura 2 - Estruturas medidas para calcular a porcentagem de inibição.....	23
Figura 3 - Espectro de Absorbância do DCPIP.....	25
Figura 4 - Sistema de extração de óleo por refluxo com hexano.....	26
Figura 5 - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz e do hipocótilo de <i>Cucumis sativus</i> no Tempo 0, no Tempo 1, e no Tempo 2.....	29
Figura 5 (continuação) - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz e do hipocótilo de <i>Cucumis sativus</i> Tempo 3 e no Tempo 4.....	30
Figura 6 - Crescimento normal das plântulas de <i>C. sativus</i> no ensaio controle negativo e crescimento das raízes na superfície do solo contaminado com petróleo.	31
Figura 7 - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz e do hipocótilo de <i>Eruca sativa</i> no Tempo 0.....	33
Figura 7 (continuação) - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz e do hipocótilo de <i>Eruca sativa</i> no Tempo 1, no Tempo 2 e no Tempo 3.....	34
Figura 7 (continuação) - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz e do hipocótilo de <i>Eruca sativa</i> no Tempo 4.....	35
Figura 8 - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz e do hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> no Tempo 0.....	37
Figura 8 (continuação) - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz e do hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> no Tempo 2 e no Tempo 3.....	38
Figura 8 (continuação) - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz e do hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> no Tempo 4.....	39
Figura 9 - Análise de regressão da porcentagem de inibição no alongamento da raiz de <i>L. sativa</i> em relação aos dias de incubação do solo.....	42
Figura 10 - Análise de regressão da porcentagem de inibição no alongamento da raiz de <i>C. sativus</i> em relação aos dias de incubação do solo.....	43
Figura 11 - Análise de regressão da porcentagem de inibição no alongamento do hipocótilo de <i>L. sativa</i> e <i>C. sativus</i>	43
Figura 12 - Pico de absorbância do 1,3,5-trifeniltetrazólio formazan e solo contaminado com biodiesel adicionado metanol, apresentando coloração leitosa.....	46
Figura 13 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo recém-contaminado (Tempo zero).....	47
Figura 14 - Foto da descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo recém-contaminado (Tempo zero).....	48
Figura 15 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 60 dias (Tempo 1).....	49
Figura 16 - Foto da descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 60 dias (Tempo 1).....	49
Figura 17 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 120 dias (Tempo 2)	50
Figura 18 - Foto da descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 120 dias (Tempo 2).	51
Figura 19 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 180 dias (Tempo 3).	52
Figura 20 – Foto da descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 180 dias (Tempo 3)	52

Figura 21 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 240 dias (Tempo 4)	53
Figura 22 - Foto da descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 240 dias (Tempo 4)	54
Figura 23 - Solo contaminado com petróleo antes do processo de extração de óleo e o mesmo solo após processo de extração.....	55
Figura 24 - Óleo residual dos contaminantes biodiesel, diesel e petróleo no tempo inicial (T0) e no tempo final (T4).....	56
Figura 25 - Colônias de bactérias e fungos observadas na contagem de UFC no solo contaminado com petróleo incubado durante 240 dias.	57

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização química da amostra de solo utilizada no experimento.....	20
Tabela 2 - Composição dos ensaios da contaminação simulada.....	22
Tabela 3 - Meios e condições experimentais utilizadas no plaqueamento.....	27
Tabela 4 – Média e desvio padrão do alongamento da raiz de <i>C. sativus</i>	32
Tabela 5 – Média e desvio padrão do alongamento do hipocótilo de <i>C. sativus</i>	33
Tabela 6 – Média e desvio padrão do alongamento da raiz de <i>E. sativa</i>	36
Tabela 7 – Média e desvio padrão do alongamento do hipocótilo de <i>E. sativa</i>	37
Tabela 8 – média e desvio padrão do alongamento da raiz de <i>L. sativa</i>	41
Tabela 9 – média e desvio padrão do alongamento do hipocótilo de <i>L. sativa</i>	41
Tabela 10 – Coeficiente de correlação linear entre a fitotoxicidade e os dias de biodegradação do contaminante.....	44
Tabela 11 – O pH do solo durante o início e final do experimento.....	45
Tabela 12 - Contagem de micro-organismos do solo controle e contaminado após 240 dias de incubação.....	57

Lista de abreviaturas

DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol
B	Biodiesel
BI	Biodiesel com inóculo
D	Diesel
DI	Diesel com inóculo
P	Petróleo
PI	Petróleo com inóculo
C	Controle
CP	Controle positivo
BT0	Biodiesel extraído do solo no Tempo 0
BT4	Biodiesel extraído do solo no Tempo 4
DT0	Diesel extraído do solo no Tempo 0
DT4	Diesel extraído do solo no Tempo 4
DIT4	Diesel com inóculo extraído do solo no Tempo 4
PT0	Petróleo extraído do solo no Tempo 0
PT4	Petróleo extraído do solo no Tempo 4

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	Petróleo e óleo Diesel.....	12
2.2	Biodegradação de hidrocarbonetos no solo.....	12
2.3	Método colorimétrico para avaliar a atividade microbiana do solo.	14
2.4	Biodiesel.....	15
2.5	Ensaio Ecotoxicológicos.....	16
2.5.1	Bioensaio utilizando sementes	18
3	OBJETIVOS	19
3.1	Geral	19
3.2	Específicos	19
4	METODOLOGIA	20
4.1	Solo.....	20
4.2	Óleos.....	20
4.3	Organismos-teste	20
4.4	Teste da atividade microbiana com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC).....	21
4.5	Teste da atividade microbiana com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP).....	21
4.6	Manutenção da cepa <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	21
4.7	Preparo do inóculo	22
4.8	Amostra contaminada.....	22
4.9	Teste de germinação de sementes	23
4.10	Testes com DCPIP em solo	24
4.11	Avaliação do óleo residual	25
4.12	Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no solo após 240 dias de incubação do solo	26
4.13	Medida de pH das amostras de solo incubadas	27
4.14	Tratamento de Resíduos	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1	Bioensaio com sementes em diferentes tempos de incubação do solo	28
5.1.1	Bioensaio com sementes de <i>Cucumis sativus</i> no solo em diferentes períodos de incubação.....	28
5.1.2	Bioensaio com sementes de <i>Eruca sativa</i> no solo em diferentes períodos de incubação.....	33
5.1.3	Bioensaio com sementes de <i>Lactuca sativa</i> no solo em diferentes períodos de incubação.....	37
5.1.4	Relação da fitotoxicidade com o tempo de biodegradação	41
5.2	O pH do solo no tempo inicial e final do período de incubação	44
5.3	Uso do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) para estimar atividade microbiana.....	45
5.4	Uso do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) para detectar a atividade microbiana no solo contaminado em diferentes tempos de biodegradação	46
5.4.1	Atividade microbiana no Tempo zero.....	46
5.4.2	Atividade microbiana no Tempo 1	48
5.4.3	Atividade microbiana no Tempo 2	50
5.4.4	Atividade microbiana no Tempo 3	51
5.4.5	Atividade microbiana no Tempo 4	53

5.5	Óleo residual nas amostras de solo contaminado	54
5.6	Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no solo no T4 (240 dias) ..	56
6	CONCLUSÃO.....	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial e econômico impulsionou a grande expansão da indústria petrolífera no mundo, principalmente, após a invenção de motores a gasolina e a óleo diesel, no entanto a utilização em larga escala desse combustível trouxe também a preocupação quanto ao potencial de contaminação desse produto no meio ambiente (MARIANO, 2006).

Além da contaminação ambiental, os hidrocarbonetos do petróleo podem apresentar riscos à saúde humana, pois alguns compostos dos derivados do petróleo são conhecidos por serem mutagênicos e cancerígenos (BANKS e SCHULTZ, 2005).

O petróleo cru não tem aplicação direta, a sua utilização exige um processo de refino, do qual se obtém os seus derivados. A procura por fontes alternativas de energia aumentou o interesse pelos biocombustíveis, principalmente o biodiesel. O biodiesel é miscível com o diesel de petróleo em qualquer proporção. Em muitos países, esta propriedade levou ao uso de misturas binárias diesel/biodiesel, ao invés do biodiesel puro (SANCHES, 2009).

Diversas técnicas estão sendo desenvolvidas para diminuir os impactos ambientais causados por derramamento de petróleo e seus derivados, dentre elas destaca-se a biorremediação (MILLIOLI et al., 2008), que por definição é a utilização de organismos vivos, principalmente micro-organismos, para degradar os contaminantes ambientais em formas menos tóxicas (VIDALI, 2001), porém em alguns casos, após a biodegradação, ainda pode haver toxicidade devido a presença de subprodutos e intermediários resultantes do processo (NUNES-HALLDORSON et al., 2004).

As técnicas de biorremediação vêm sendo utilizadas no tratamento de solos contaminados por petróleo, no entanto a avaliação dessa contaminação focava-se apenas em parâmetros químicos, e esses dados por si só não podem fornecer informações de toxicidade para organismos vivos. Nesse contexto os ensaios ecotoxicológicos podem indicar uma resposta mais precisa da toxicidade dos contaminantes para os organismos (SISINNO et al., 2007). Assim o uso de bioensaios para avaliar a toxicidade de solos contaminados ganhou ampla atenção, pois estes testes têm se mostrado útil para prever o efeito de uma mistura complexa, como o petróleo (BANKS e SCHULTZ, 2005; DORN et al., 1998).

No presente trabalho foi avaliada a inibição que o solo contaminado por petróleo, diesel e biodiesel causa no desenvolvimento de plântulas e a ação dos micro-organismos autóctones do solo frente ao contaminante.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Petróleo e óleo Diesel

O petróleo é uma mistura de hidrocarbonetos composta de diversos tipos de moléculas formadas por átomos de hidrogênio e carbono e, em menor parte, de oxigênio, nitrogênio e enxofre, combinados de forma variável (ZÍLIO e PINTO, 2002). As principais classes de hidrocarbonetos constituintes do petróleo são os alifáticos e os cíclicos. Os alifáticos se dividem em: n-alcanos, alcanos ramificados ou isoprenóides e alcenos, os cíclicos são divididos em naftenos e aromáticos (BENTO, 2005). São produzidos mais compostos aromáticos no processo de refino (BAKER, 1970).

O óleo diesel é um subproduto do petróleo, constituído basicamente por hidrocarbonetos alifáticos, que variam de 9 a 28 átomos de carbono em sua cadeia, além de baixas concentrações de enxofre, nitrogênio e oxigênio (DAL FORNO, 2006). O consumo do diesel no Brasil pode ser dividido em três grandes setores: o de transportes, representando mais de 75% do total consumido; o agropecuário, representado em torno de 16% do consumo; e o de transformação, que utiliza o produto na geração de energia elétrica e corresponde à cerca de 5% do consumo total de diesel.

2.2 Biodegradação de hidrocarbonetos no solo

Ao ser adicionado ao solo, um composto orgânico pode sofrer processos físicos, químicos e biológicos, interagindo com as fases sólidas, líquidas, gasosas e com a microbiota do solo (MILLIOLI et al., 2008).

A organização dos particulados do solo oferece um habitat heterogêneo para os micro-organismos, caracterizado por diferentes substratos, concentrações de oxigênio e água, assim como pH variável (SESSITSCH et al., 2001). A microbiota do solo é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia, exercendo influência tanto na transformação da matéria orgânica, quanto na estocagem do carbono e minerais (MILLIOLI et al., 2008).

Dentre os constituintes dos hidrocarbonetos, os n-alcanos são considerados os mais facilmente degradáveis, assim como os aromáticos com até três anéis (ROSATO, 1997; DAS e MUKHERJEE, 2006). Os micro-organismos têm capacidade enzimática para degradar a maioria dos constituintes do petróleo, alguns deles degradam os alcanos, outros aromáticos de

baixo peso molecular, sendo necessária uma complexa interação ecológica dos micro-organismos para degradação desta substância. O passo inicial da biodegradação de hidrocarbonetos por fungos e bactérias envolve a oxidação do substrato pelas oxigenases, para isso um oxigênio molecular é necessário. Os alcanos são convertidos em ácidos carboxílicos que são ainda biodegradados através de β -oxidação (ATLAS, 1995).

A presença de hidrocarbonetos promove além de forte seleção dos micro-organismos autóctones, uma sucessão microbiana com capacidades metabólicas diferentes para biodegradar todos os compostos intermediários provindos do processo de biodegradação (KOSTKA et al., 2011). Assim, Kaplan e Kitts (2004) concluíram baseados em suas análises que a comunidade microbiana responsável pela biodegradação da principal porção dos hidrocarbonetos é realizada por poucas espécies. Uma vez esgotada o petróleo como fonte de carbono, essas bactérias diminuem sua abundância e permanecem em pequena quantidade dando lugar para outras espécies que vão biodegradar os subprodutos e conseqüentemente tornam-se abundantes. No entanto quando há poucos micro-organismos capazes de degradar o contaminante no local, a bioaumentação da microbiota local pode ser uma opção (LIU e SUFLITA, 1993).

A bioaumentação é o método que promove o enriquecimento dos micro-organismos no local da contaminação através da inoculação de micro-organismos com potencial para biodegradar o contaminante (LIU e SUFLITA, 1993). No entanto, a sobrevivência do inóculo no ambiente é dificultada pela competição com micro-organismos autóctones. Contudo, linhagens de *Bacillus* e *Pseudomonas* têm sido indicadas para bioaumentação em locais contaminados com hidrocarbonetos por serem produtores de biossurfactantes (JENNINGS e TANNER, 2000; DAS e MUKHERJEE, 2006; MONTAGNOLLI et al., 2011).

O biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, a surfactina, é considerado um dos mais poderosos biossurfactantes devido a seu poder de diminuir a tensão superficial da água para até 27 mN.m^{-1} (milinewtons por metro) a qual normalmente apresenta tensão superficial em torno de $72,75 \text{ mN/m}$ a 20° C (Cooper et al., 1981). Quando compostos imiscíveis são colocados em uma mistura há a formação de um limite interfacial entre elas. A porção hidrofóbica fica concentrada na superfície enquanto que a porção hidrofílica permanece coesa na porção inferior. Neste caso a aplicação do biossurfactante torna a mistura um colóide, onde não é mais possível identificar as fases devido à natureza anfipática dos biossurfactantes. Deste modo os micro-organismos capazes de produzir biossurfactantes podem emulsificar o óleo facilitando a passagem do substrato pela membrana e utilizá-los para seu crescimento.

De acordo com Jaques et al. (2008) quando culturas puras de micro-organismos são inoculados separadamente a degradação do poluente é nula, por outro lado quando inoculados juntos, ou seja, em consórcio, há uma eficiente degradação e mineralização do composto. Estes autores estudaram a degradação de alguns tipos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) como benzo(a)pireno, eles levantaram a hipótese de que o primeiro passo da oxidação do benzo(a)pireno atribui-se a ação dos fungos que liberam metabolitos intermediários extracelular, convertidos em CO₂ pelas bactérias.

Os principais organismos capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo são as bactérias e os fungos. Plaza et al. (2008) isolaram os micro-organismos de um local altamente poluído por HAP e encontraram 4 linhagens bacterianas identificadas como: *Ralstonia picketti*, *Alcaligenes piechaudii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.* Estas bactérias foram capazes de biodegradar os hidrocarbonetos nos testes realizados. Ogbo et. al. (2010) utilizaram fungos da espécie *Pleurotus tuberregium* para remediar substratos contaminados com óleo diesel, e destaca a habilidade deste micro-organismo em degradar e diminuir a toxicidade no solo com um nível de contaminação de até 5%.

A biodegradação primária refere-se à modificação de uma substância pelos micro-organismos que produzem uma mudança em algumas de suas propriedades (US ARMY CORPS OF ENGINEERS, 1999). Este processo pode acarretar um caráter mais tóxico que o da substância original, como visto por Gersberg et al. (1995) que testaram o efeito de uma área de biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos na toxicidade de águas subterrâneas contaminadas e relata que apesar de 81 a 99% dos hidrocarbonetos terem sido transformados devido a biodegradação, a água subterrânea ainda era significativamente tóxica.

Muitos fatores ambientais influenciam no processo de biodegradação de hidrocarbonetos. A temperatura, por exemplo, interfere na biodegradação pelo efeito na natureza físico-química do petróleo como também pela alteração da população microbiana. As taxas de biodegradação geralmente aumentam com o aumento da temperatura (ROSATO, 1997), ao contrário de um ecossistema exposto a temperatura extremamente baixa que degrada hidrocarbonetos muito lentamente (LEAHY e COLWELL, 1990).

2.3 Método colorimétrico para avaliar a atividade microbiana do solo.

A degradação de substratos orgânicos envolve reações de oxido-redução que são cruciais ao metabolismo dos micro-organismos. A principal via de obtenção de energia pelos

micro-organismos é a respiratória, onde o aceptor final de elétrons é o oxigênio. Os processos anaeróbicos também utilizam as reações oxido-redutoras para a obtenção de energia, no entanto neste caso necessitam de aceptores alternativos como os nitratos e sulfatos (CAO et al., 2009; HUTCHINS et al., 1991).

Os micro-organismos catalisam inúmeras reações essenciais para a manutenção do balanço eletrônico do ecossistema, a degradação de substratos orgânicos está envolvida nessas transformações redox. Para um contaminante ser incorporado nas reações redox é necessário que ele seja capaz de ser oxidado ou reduzido e que a comunidade microbiana seja capaz de ajustar se as novas vias bioquímicas para a incorporação do contaminante nas reações redox podendo acarretar em modificações na estrutura da comunidade microbiana no local da contaminação (MIHELICIC e LUTHY, 1988; CRUZ et al., 2011).

O método colorimétrico são processos rápidos e de baixo custo para detectar a atividade microbiana, baseado na substituição de um mediador natural de elétrons como oxigênio, sulfatos, entre outros, por um mediador sintético (HANSON et al., 1993).

O 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) é um mediador sintético utilizado para indicar a capacidade dos micro-organismos em biodegradar hidrocarbonetos (HANSON et al., 1993; VAN HAMME et al., 2000). Kubota et al. (2008) determinaram a sensibilidade do método, comparando os resultados dos ensaios com DCPIP e os resultados da cromatografia gasosa das amostras que sofreram biodegradação. Na comparação desses resultados os autores confirmaram que nos ensaios com DCPIP que se tornaram incolores, a cromatografia detectou biodegradação e os ensaios com DCPIP que permaneceram azuis, a cromatografia não detectou biodegradação. Grande parte dos estudos utilizou o DCPIP para testar a capacidade de culturas puras ou consórcios em biodegradar hidrocarbonetos (HANSON et al., 1993; VAN HAMME et al., 2000; KUBOTA et al., 2008).

2.4 Biodiesel

O biodiesel é uma mistura de alquil ésteres de cadeia linear, obtida da transesterificação dos triglicerídeos de óleos e gorduras com alcoóis de cadeia curta, esta reação tem como co-produto o glicerol (LOBO et al., 2009). A transesterificação, geralmente, é o método escolhido por que este processo diminui a viscosidade dos óleos naturais e gorduras (FANGRUI e MILFORD, 1999).

No Brasil, a introdução do biodiesel na matriz energética foi alcançada por meio da mistura com o diesel mineral. Assim, uma lei federal estabeleceu uma mistura obrigatória de no mínimo 3% do biodiesel no diesel mineral em 2008 (BRASIL, 2008) e em 2013 esse percentual passará a 5% obrigatoriamente. Uma das principais vantagens na utilização do biodiesel está ligada as questões ambientais visto que é um produto de origem vegetal.

No ambiente o biodiesel é degradado mais fácil e mais rápido que o diesel por várias razões. Primeiramente, para que um processo bioquímico ocorra rapidamente, enzimas apropriadas para um substrato específico precisam estar disponíveis. Como o biodiesel é um produto natural que consiste de ácidos graxos puros, as enzimas responsáveis pela sua quebra também existem naturalmente. Todos os ácidos graxos são cadeias de hidrocarbonetos, em forma de éster com dois átomos de oxigênio unidos, que os tornam muito ativos biologicamente (ZHANG et al., 1998).

Assim, Mariano et al. (2008) compararam a biodegradabilidade de diesel e misturas de biodiesel/diesel e seus resultados mostraram que a mistura com maior desempenho na biodegradação apresentava altas concentrações do biocombustível.

2.5 Ensaios Ecotoxicológicos

Para Lynch et al. (2001) a ecotoxicologia é “o estudo dos efeitos de substâncias químicas perigosas sob o ecossistema”. Isto significa que este estudo não está interessado apenas na detecção das substâncias, mas sim nos efeitos biológicos dos produtos químicos que contaminam o meio ambiente.

Embora o conceito de ecotoxicologia seja amplo, abrangendo a totalidade do ecossistema, mais atenção tem sido dada aos efeitos em organismos individuais por meio de ensaios ecotoxicológicos, pois a resposta dos organismos fornece uma boa avaliação do risco ambiental, antes que os efeitos possam se expressar no nível de população, comunidades e ecossistemas (MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008).

Os testes ecotoxicológicos são usados para avaliar os efeitos da contaminação da água, sedimento ou solo nos organismos-teste quanto a sua sobrevivência, crescimento, reprodução e comportamento. Estes testes podem ajudar a determinar se as concentrações dos contaminantes em um local são altas o suficiente para causar efeitos adversos no organismo (USEPA, 1996).

A presença de um contaminante em si não indica um potencial de efeitos adversos, ele só pode ter efeitos tóxicos se estiver biodisponível para o organismo, ou seja, as substâncias presentes têm que estar em uma forma que os organismos possam absorver. Os testes de toxicidade aguda são testes de curta duração, que medem os efeitos da exposição a concentrações relativamente altas de substâncias químicas (USEPA, 1996).

O potencial nocivo de uma substância tóxica pode ser compensado pelo sistema biológico através de várias estratégias, tais como reações metabólicas de desintoxicação e a excreção de toxinas. Portanto, a toxicidade aparente avaliada em bioensaios é o resultado da interação entre a substância e os sistemas biológicos. Além disso, considera-se que o efeito tóxico sobre os sistemas biológicos é exercido pela ação combinada de todas as substâncias nocivas no meio ambiente, mesmo aqueles que não são tóxicos em si, mas afetam as propriedades físico-químicas do sistema e, conseqüentemente, as condições de vida dos organismos (RONCO et al., 2004).

Até recentemente a avaliação do risco ambiental em lugares descontaminados eram baseados apenas em análises químicas das substâncias presentes no contaminante, porém esse tipo de teste por si só é inadequado para prever os efeitos negativos de misturas complexas, como os hidrocarbonetos. Neste caso seria impossível avaliar todos os compostos e efeitos sinérgicos contribuindo para a toxicidade (PLAZA et al., 2005). Essa afirmação apóia os resultados de VAAJASAARI et al. (2002), pois segundo esses autores dentre três amostras de composição química bem similares, os níveis de toxicidade apresentavam se diferentes. Marwood et al. (1998) relataram que, quimicamente, houve biodegradação dos hidrocarbonetos porém dos cinco bioensaios realizados nem todos responderam com a redução da toxicidade, sendo assim as análises químicas e os bioensaios se complementam.

Diversos organismos podem ser utilizados nos testes de ecotoxicidade para monitoramento do processo de biorremediação, buscando uma correlação entre a sensibilidade do organismo com a biodegradação do contaminante (Juvonen et al., 2000; PLAZA et al., 2005). Dorn e Salanitro (2000) utilizaram minhocas, bactérias, germinação e crescimento de plantas como bioindicadores, para monitorar a toxicidade do processo de biorremediação e concluíram que este processo reduz a toxicidade permitindo a colonização de minhocas e a reintrodução de plantas.

2.5.1 Bioensaios utilizando sementes

Os testes químicos por si só não podem mostrar os efeitos nocivos das substâncias aos organismos vivos. Desta forma os testes ecotoxicológicos surgem como ferramenta muito importante para avaliar o potencial tóxico de um contaminante.

As plantas são utilizadas em testes ecotoxicológicos, tendo em vista que durante o período de germinação e os primeiros dias de desenvolvimento da plântula ocorrem numerosos processos fisiológicos, que na presença de uma substância tóxica pode interferir na sobrevivência e no crescimento, sendo uma etapa de grande sensibilidade frente a fatores externos adversos. Assim os testes ecotoxicológicos utilizam-se dessa sensibilidade para avaliar o potencial tóxico do contaminante. Como parâmetros para a avaliação dos efeitos fitotóxicos determina-se a inibição da germinação e inibição do alongamento da raiz e hipocótilo (SOBRERO e RONCO, 2004).

A avaliação do efeito sobre o alongamento da raiz e do hipocótilo das plântulas pode refletir a toxicidade dos compostos solúveis presentes em níveis de concentração tão baixos, que não são suficientes para inibir a germinação, mas podem atrasar ou inibir o processo de alongamento da raiz ou do hipocótilo, dependendo do modo e local de ação dos compostos. Assim, a inibição do alongamento da raiz e do hipocótilo são sensíveis indicadores subletais para avaliar efeitos biológicos nas plantas (SOBRERO e RONCO, 2004; TAMADA, 2012).

Sidiqui et al. (2001) analisaram a inibição da germinação de um tipo de grama em solo contaminado por óleo diesel, para demonstrar a alta toxicidade deste óleo. O desenvolvimento da raiz e a germinação de alface e aveia foram escolhidos por Meier et al. (1997) para complementar os resultados das análises químicas e assim avaliar a eficiência do processo de remediação do solo contaminado.

Dentre os parâmetros utilizados para realização de bioensaios com plantas, não há um consenso do qual deles seria o melhor bioindicador. Para Fuentes et al. (2004) o crescimento radicular é o método mais sensível para avaliações fitotóxicas. Os resultados de Araújo e Monteiro (2005) determinam o crescimento da raiz mais sensível comparado à germinação.

Grande parte dos estudos ecotoxicológicos em solo contaminado é feito a partir do extrato do solo. No entanto, Gyurica et al. (2010) realizou testes ecotoxicológicos em solo contaminado com metais e concluiu que a inibição do crescimento de plântulas de pepino e trigo utilizando extrato do solo resultou em um potencial tóxico subestimado quando comparado com o mesmo solo nos testes de contato direto. Além disso, quando se trata de

contaminantes hidrofóbicos como o petróleo e seus derivados, esta metodologia pode não ser interessante, pois parte da substância fica adsorvido no solo e poucos compostos ficam disponíveis em solução, tornando subestimados os resultados dos ensaios (ALEXANDER et al., 1999; VAN GESTEL et al., 2001). Nesse aspecto o teste com sementes é totalmente viável, pois as sementes são organismos que podem ser testados diretamente em contato com o solo. Nos estudos de Hubálek et al. (2007) os resultados demonstraram claramente maior sensibilidade nos testes utilizando diretamente o solo contaminado ao invés do extrato desse solo, o chamado elutriato, para realização dos testes ecotoxicológicos. Esses autores levantam a questão de que os óleos são extremamente hidrofóbicos e muito pouco dele é extraído no elutriato, por este motivo quando o organismo é exposto diretamente ao solo apresentam maior sensibilidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a fitotoxicidade de solo contaminado com diesel, petróleo e biodiesel em diferentes tempos de biodegradação; e avaliar a biodegradação utilizando o método colorimétrico que estima a atividade microbiana.

3.2 Específicos

Comparar a toxicidade entre petróleo, diesel e biodiesel;

Analisar as alterações quanto à fitotoxicidade durante o processo de biodegradação; comparar a fitotoxicidade da amostra contaminada que sofreu apenas ação dos micro-organismos autóctones e a amostra contaminada com adição do inóculo;

Estimar o potencial de biodegradação dos micro-organismos do solo contaminado através do método colorimétrico com DCPIP e por meio do óleo residual;

Análise do óleo residual dos contaminantes biodiesel, diesel e petróleo.

4 METODOLOGIA

Preparo do solo contaminado e inóculos para realização dos ensaios de toxicidade e teste colorimétrico.

4.1 Solo

O solo do tipo arenoso utilizado nos ensaios foi obtido em estabelecimento comercial de materiais de construção, previamente peneirado utilizando peneira de granulometria de 2 mm. Na Tabela 1 está a caracterização química e a composição granulométrica da amostra de solo.

Tabela 1 - Caracterização química da amostra de solo utilizada no experimento

<i>pH</i>	<i>g/dm³</i>	<i>mg/dm³</i>	<i>mmolc/dm³ TFSA</i>						<i>%</i>	<i>Relações</i>	
CaCl ₂	MO	P res	K	Ca	Mg	H+ Al	SB	CTC	V%	Ca/Mg	Mg/K
6,2	1	5,0	1,0	18	1	7	20,7	27,8	74,4	18,00	1,00
<i>Micronutrientes mg/dm³</i>					<i>Cond. Elétrica dS/m</i>			<i>Sub-classe</i>			
S	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	B	X	Fino arenoso			
14	17	15	6,4	0,3	1,4	1,7					
<i>Composição Granulométrica (%)</i>								<i>Classe</i>	<i>Sub-classe</i>		
Areia Grossa		Areia Fina		Limo		Cascalho		Limo arenosos	Fino arenoso		
31,0		57,0		8,3		X					

Fonte: ICASA Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo, dezembro 2012.

4.2 Óleos

Foram avaliadas as taxas de toxicidade de solo contaminado com biodiesel de origem animal (34% de óleo de soja e 66% sebo) cedido pela empresa JBS localizada em Lins (SP); diesel puro e petróleo, cedidos pela Refinaria do Planalto (REPLAN) Petrobrás em Paulínia (SP).

4.3 Organismos-teste

Nos testes de toxicidade do solo foram utilizados como organismos-teste as sementes de *Cucumis sativus* (Pepino caipira), as de *Lactuca sativa* (alface) e as de *Eruca sativa* (rúcula). Todas as sementes utilizadas foram da marca Topseed®.

4.4 Teste da atividade microbiana com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)

A atividade da desidrogenase nas amostras de solo foi determinada segundo metodologia proposta por Alef (1995), que se baseia na estimativa da taxa de redução do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a trifeniltetrazólio formazan (TPF), estimando-se colorimetricamente o teor de TPF liberado devido à ação da enzima.

Os ensaios foram realizados em triplicatas, cada um dos ensaios contendo 5 g da amostra contaminada e 5 mL de solução TTC, acondicionados em tubos que foram fechados e incubados por 24 h a 30°C na ausência de luz. O controle continha apenas solução tampão tris-HCl. O tampão foi preparado com 12.1 g/L de hidroximetil aminometano (abreviação tris) e ajustado o pH com HCl para 7,8. Após a incubação, 40 mL de metanol foram adicionadas em cada tubo para extração do TPF. A amostra foi então filtrada e medida colorimetricamente. A reta padrão foi feita com o TPF da Sigma-Aldrich.

4.5 Teste da atividade microbiana com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP)

O teste para analisar se a microbiota do solo é apta a degradar o contaminante foi realizado utilizando tubos com tampa da Hach para acondicionar a amostra de solo com a solução de DCPIP em uma concentração de 1,0000 g L⁻¹ e, juntamente, o caldo Bushnell Haas (DIFCO, 1984). O caldo Bushnell Haas (BH) é composto pelos seguintes sais: 0,2 g L⁻¹ de sulfato de magnésio, MgSO₄.7H₂O (Chemco P. A.); 0,02 g L⁻¹ de cloreto de cálcio, CaCl₂.2H₂O (Vetec P.A.); 1,00 g L⁻¹ de fosfato dipotássico, K₂HPO₄ (Impex P.A.); 1,00 g L⁻¹ fosfato mono potássico, KH₂PO₄ (Dinâmica P.A.); 1,00 g L⁻¹ de nitrato de amônia, NH₄NO₃ (Vetec P.A.) e 0,05 g L⁻¹ de cloreto férrico e FeCl₃.6H₂O (Dinâmica P. A.).

4.6 Manutenção da cepa *Bacillus subtilis* ATCC 6633

As colônias de *B. subtilis* foram inoculadas em tubos inclinados contendo ágar nutriente incubadas em estufa durante 24 horas a 35°C para crescimento das colônias e depois foram mantidas sob refrigeração a 4°C.

4.7 Preparo do inóculo

O *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi reativado de uma cultura isolada da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, IB, Rio Claro. A reativação foi feita em meio caldo nutriente por 24 h a 35°C sob agitação 150 rpm. Depois de 24 h o caldo nutriente foi centrifugado por 5 min a 3000 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 mL de solução salina a 0,85%, posteriormente, 1 mL desta solução foi utilizado para diluições e assim estimar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *B. subtilis* adicionados em cada amostra de solo. A diluição 10^{-7} foi utilizada para contagem de UFC. Por meio do plaqueamento foi possível contar 3,5 UFC/mL.

4.8 Amostra contaminada

Foram necessários 28 kg de solo peneirado e, também, os óleos e biodiesel utilizados como contaminantes, descrito por Lopes e Bidoia (2009) e Cruz (2010). Na Tabela 2 está mostrada a composição dos ensaios.

Tabela 2 - Composição dos ensaios da contaminação simulada

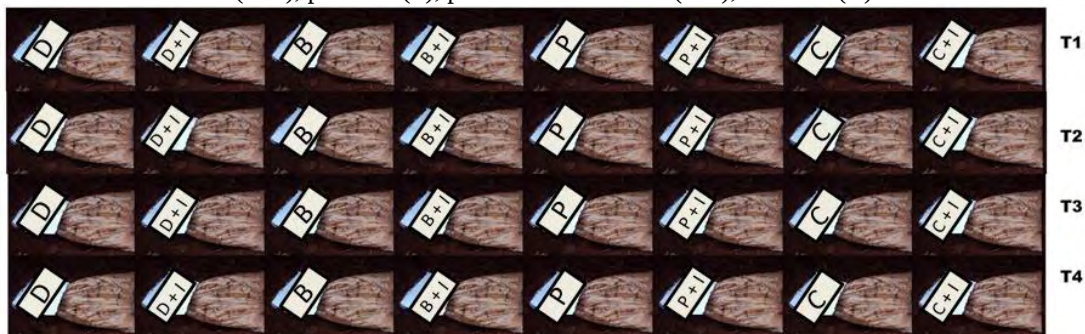
Ensaio	Contaminante	Solo	Inóculo (<i>Bacillus subtilis</i>)	Água destilada
Diesel	56 mL	700 g	--	40,25 mL
Diesel+inóculo	56 mL	700 g	6,5 mL	34 mL
Biodiesel	56 mL	700 g	--	40,25 mL
Biodiesel+inóculo	56 mL	700 g	6,5 mL	34 mL
Petróleo	56 mL	700 g	--	40,25 mL
Petróleo+inóculo	56 mL	700 g	6,5 mL	34 mL
Controle	--	700 g	--	96,25 mL
Controle +inóculo	--	700 g	6,5 mL	89,75 mL

Fonte: autoria própria

Após a homogeneização, os sacos foram perfurados a fim de estabelecer um contato com o meio externo e a amostra. Posteriormente, os sacos foram enterrados no canteiro do Jardim Experimental da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Rio Claro, dispostos como no esquema da Figura 1. Os tempos de biodegradação foram definidos como: Tempo zero (T0), Tempo um (T1 = 60 dias), Tempo dois (T2 = 120 dias), Tempo três (T3 =

180 dias) e Tempo quatro (T4 = 240 dias). Exceto T0, todos os ensaios foram desenterrados na sequência descrita anteriormente.

Figura 1- Disposição das amostras contaminadas no canteiro. diesel (D), diesel e *B. subtilis* (D+I), biodiesel (B), biodiesel e *B. subtilis* (B+I), petróleo (P), petróleo e *B. subtilis* (P+I), controle (C) e controle e *B. subtilis* (C+I).



Fonte: autoria própria.

4.9 Teste de germinação de sementes

O teste de toxicidade com sementes foi realizado segundo Morales (2004). As sementes utilizadas foram semeadas em placas de Petri contendo 40,00 g de solo contaminado. Os ensaios foram realizados em triplicata contendo 10 sementes cada. Ao controle positivo foram adicionados 2,5mL de solução de sulfato de zinco 0,05 M para testar a sensibilidade das sementes utilizadas e aos outros ensaios foi adicionada água destilada. Depois de semeados as placas foram incubadas em câmara climática de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) durante 120 h a 22°C, na ausência de luz.

Após esse período, as plântulas foram retiradas para medição. Cada plântula foi medida com régua a raiz e o hipocótilo (Figura 2).

Figura 2- Estruturas medidas para calcular a porcentagem de inibição.



Fonte: autoria própria.

A partir das medidas calculou-se a média de crescimento em cada tratamento e inseridas na equação 1 para obter a porcentagem de inibição no alongamento da raiz e do hipocótilo, seguindo Morales (2004).

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{média do controle} - \text{média do tratamento}}{\text{média do controle}} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

4.10 Testes com DCPIP em solo

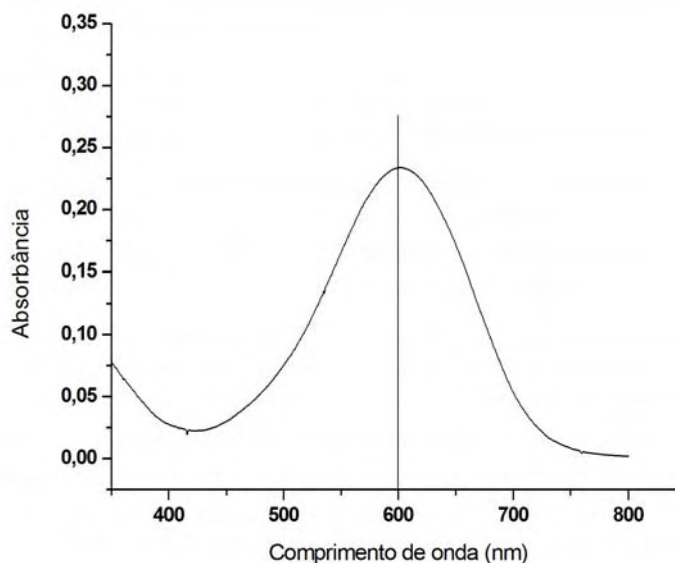
O 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) é um indicador que quando oxidado é incolor e quando reduzido passa a coloração azul. Assim a atividade dos micro-organismos pode ser estimada pela mudança de coloração do meio segundo metodologia descrita por Bidoia et al. (2010) com adaptações.

Para preparo do teste de biodegradação 1,00 g de solo de cada tratamento foi colocado em tubos, adicionou-se 250 µL de solução de DCPIP e 7,5 mL de caldo Bushnell Haas que contém todos os sais que os micro-organismos necessitam para crescer, no entanto não possuem nenhuma fonte de carbono. Deste modo, os micro-organismos do solo que têm a capacidade de utilizar o contaminante como fonte de carbono pode crescer e consequentemente reduzir o DCPIP tornando-o incolor.

Os tubos foram acondicionados em estufa a 35°C e medidos a absorbância em espectrofotômetro Hach Odissey DR-2500 a cada 24 h até que a amostra se tornasse incolor. As medições só foram feitas até que o DCPIP fosse totalmente reduzido, pois após a total oxidação o indicador volta a ficar azul novamente por ser um indicador reversível.

Foi necessário determinar o comprimento de onda de maior absorbância do DCPIP ilustrado na Figura 3. Estabelecido o comprimento de onda de 600 nm (Figura 3) foi realizado a confecção de uma reta padrão com cinco diluições da solução de DCPIP a 1,000 g/L, sendo 0,0100 mg L⁻¹, 0,0200 mg L⁻¹, 0,0300 mg L⁻¹, 0,0400 mg L⁻¹ e 0,0500 mg L⁻¹. Deste modo foi possível calcular a quantidade de DCPIP oxidado presente nos tubos durante o período de análise.

Figura 3 - Espectro de Absorbância do DCPIP em nm e indicação do comprimento de onda do pico, 600 nm, em que foram coletados os dados de absorbância.

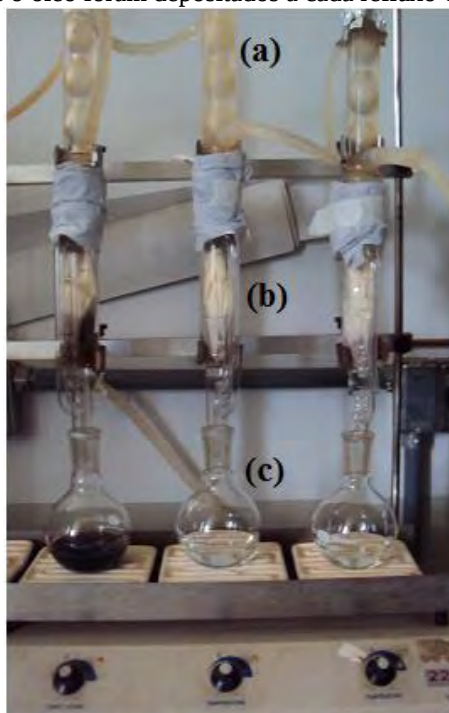


Fonte: autoria própria.

4.11 Avaliação do óleo residual

O processo de extração de gordura foi realizado através do método Soxlet (AOAC, 2006) nos solos com biodiesel, diesel e petróleo no tempo inicial e no tempo final. O petróleo e diesel foram submetidos ao teste de óleo residual para estimar a quantidade de óleo presente no solo após o período de incubação, pois estes são contaminantes de difícil biodegradação. Para montagem do experimento foi necessário um balão de fundo redondo para cada amostra de solo, onde foram colocados 80 mL de hexano e dentro do digestor 10 g de solo envolvidos em um papel filtro onde ocorreu o refluxo. A placa aquecedora proporcionou a temperatura para que o hexano entrasse em ebulição e iniciasse o contato com as amostras de solo que permaneceram durante 6 h no refluxo para a remoção de todo óleo presente no solo. A Figura 4 mostra a montagem do sistema de extração do óleo por refluxo com hexano. Após o período de refluxo, o conteúdo dos balões foi submetido a destilação para separar o óleo do hexano. Posteriormente, colocado em cadinhos de peso conhecido, e assim calcular o quanto de óleo estava no solo.

Figura 4- Sistema de extração de óleo por refluxo com hexano. (a) condensador Allihn tipo bola é o responsável pela condensação e retorno do solvente (b) digestor onde ocorre o contato do hexano com a amostra de solo e (c) balão de fundo redondo onde o hexano e o óleo foram depositados a cada refluxo Soxlet.



Fonte: autoria própria.

4.12 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no solo após 240 dias de incubação do solo

O plaqueamento foi realizado no Tempo 4, pois nesta amostra estão presentes os micro-organismos que resistiram a essa contaminação durante os dias de incubação ou micro-organismos que fazem parte da sucessão microbiana responsável pela biodegradação de misturas complexas, ou seja, micro-organismos com potencial para biodegradação do contaminante.

O meio PCA da Scharlau® foi utilizado para contagem de UFC bacterianas. Para o preparo, foram pesados 11,75 g de Plate Count Agar da Scharlau® e dissolvidos em 0,5 L de água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave e posteriormente vertido em placas de Petri.

O meio PDA foi utilizado para contagem de UFC de fungos. Este meio foi preparado utilizando a infusão de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 15 g de ágar e água destilada para completar 1L (DIFCO, 1984). O meio foi esterilizado em autoclave e, posteriormente, vertido em placas de Petri.

O meio PDA que tinha como finalidade o crescimento de fungos foi preparado adicionando 10 mL de ácido tartárico a 10% para 1,0 L de meio, pois o pH ácido inibe o crescimento bacteriano. Todos os meios foram autoclavados e vertidos em placas de Petri. A solução de ácido tartárico foi esterilizada separadamente e adicionada ao meio resfriado.

Para realização das diluições decimais foram utilizados solução salina a 0,85%, da Labsynth®. Foram utilizadas 10 g de cada amostra de solo, ou seja, controle, biodiesel, diesel e petróleo adicionados 90 mL de solução salina a 0,85%, agitados por 1 h a 215 rpm, transcorrido o período, 1 mL de esta diluição foi utilizado para a diluição seriada.

A contagem de UFC de bactérias e fungos foi realizada utilizando à diluição apropriada. Foi inoculado 100 uL da diluição no meio de cultura e espalhados com alça de Drigalski esterilizada. Após o período de incubação foram contadas as UFC de cada amostra de solo.

Tabela 3 - Meios e condições experimentais utilizadas no plaqueamento

Micro-organismos	Meios	Temperatura	Tempo
<i>Bactérias</i>	PCA	35° C	48 h
<i>Fungos</i>	PDA	29° C	168 h

Fonte: autoria própria.

4.13 Medida de pH das amostras de solo incubadas

O pH das amostras de solo incubadas foram monitoradas, pois a alteração do pH tornando o meio ácido ou básico pode comprometer o desenvolvimento das sementes. Para isso foi pesado em um béquer 10 g da amostra de solo contaminado e adicionados 25 mL de água destilada, seguido de agitação a 215 rpm durante 1 minuto e deixado descansar por 1 h. A suspensão foi filtrada e mediu-se o pH do sobrenadante (FOSTER, 1995).

4.14 Tratamento de Resíduos

Os resíduos químicos a serem descartados foram coletados e guardados em frascos rotulados para posterior tratamento a ser efetuado na Unesp. Os resíduos são acumulados em uma área satélite de acumulação até uma empresa especializada contratada pela Unesp venha tratar os resíduos.

Os resíduos biológicos (solo contaminado com inóculo, meios de cultura, placas de Petri, etc.) foram autoclavados antes do descarte.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bioensaios com sementes em diferentes tempos de incubação do solo

Os ensaios com sementes refletem a contaminação com diferentes óleos no solo recém-contaminado, após 60, 120, 180 e 240 dias de incubação. Como as medidas do alongamento da raiz e do hipocótilo não apresentaram uma distribuição normal dos dados, foi necessária a utilização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar se há diferença significativa entre os tratamentos. Assim, dentro de cada Tempo, letras diferentes de “a” não diferem significativamente do controle, quando marcadas por “b” diferem apenas do controle e quando marcadas por “c” há diferença entre o controle e entre os tratamentos. A junção de letras como “ab”, “ac” foram utilizadas para indicar que os tratamentos não diferem do controle nem de mostras marcadas pela letras que estão na sequência de “a”. Assim também as junções “bc” indicam que a amostra difere significativamente do controle, no entanto não difere de amostras marcadas pela letra “c”.

5.1.1 Bioensaios com sementes de *Cucumis sativus* no solo em diferentes períodos de incubação

Os ensaios com solo do Tempo zero foram feitos imediatamente após a contaminação, deste modo, os resultados revelam a toxicidade dos contaminantes intactos, ou seja, sem nenhuma biodegradação.

A Figura 5a a 5j mostra a porcentagem de inibição no alongamento de *Cucumis sativus* (pepino) em relação ao controle negativo, este não possui contaminante (vide Tabela 1). Também nos solos contaminados com biodiesel (B), biodiesel e *B. subtilis* (BI), diesel (D), diesel e *B. subtilis* (DI), petróleo (P), petróleo e *B. subtilis* (PI) e controle positivo (CP). Este último tem adição de sulfato de zinco para inibição completa da germinação.

Nas Tabelas 4 e 5 estão indicadas as médias e o desvio padrão do alongamento da raiz e do hipocótilo, respectivamente.

Figura 5 - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz de *Cucumis sativus* no Tempo 0 (a) no Tempo 1 (c), e no Tempo 2 (e). Porcentagem de inibição do alongamento do hipocótilo de *Cucumis sativus* no Tempo 0 (b) no Tempo 1(d) e no Tempo 2 (f). Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel (D), Diesel e *B. subtilis* (DI), Petróleo (P), Petróleo e *B. subtilis* (PI) e Controle positivo (CP), este tem adição de sulfato de zinco para inibição completa da germinação.

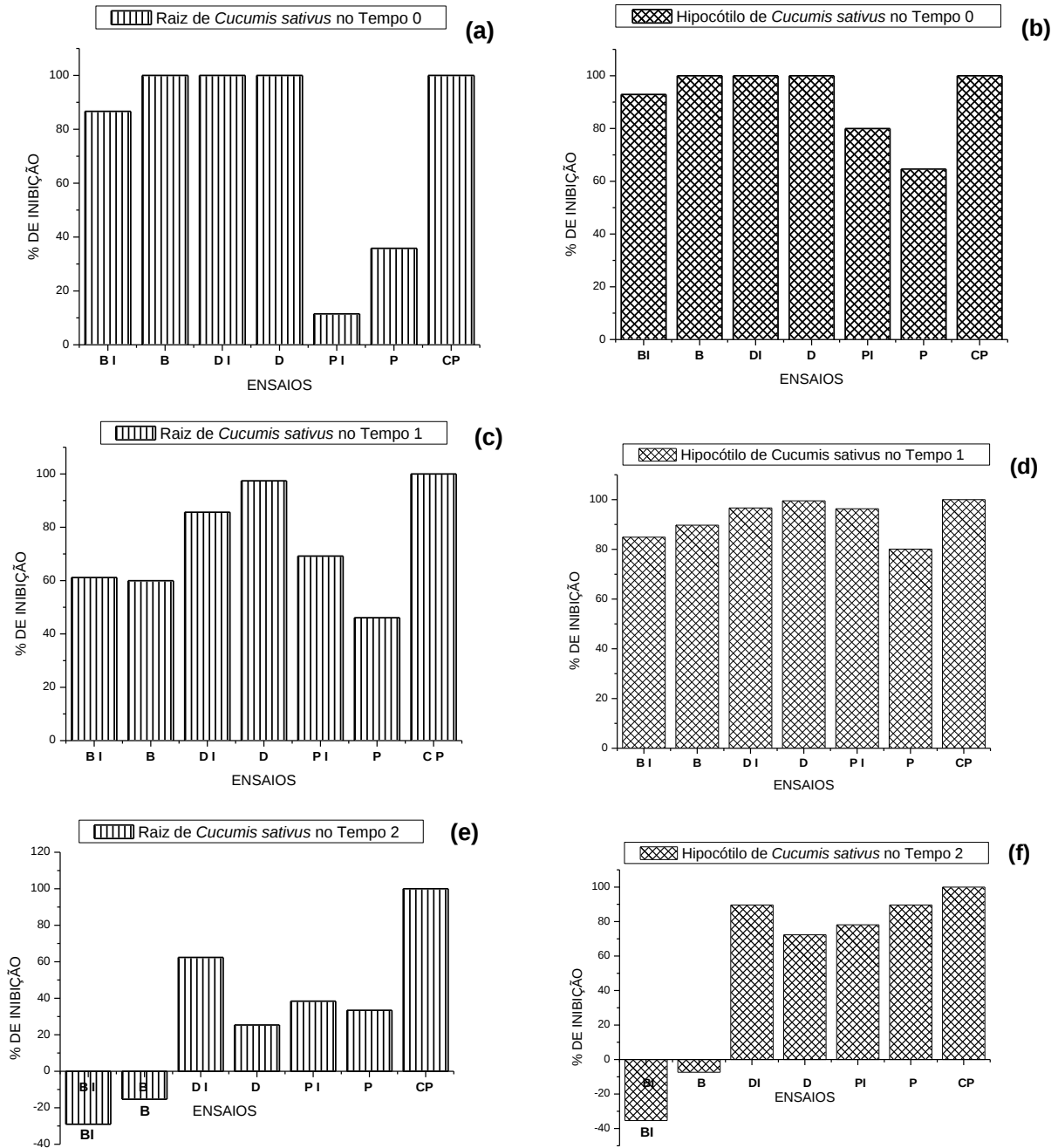
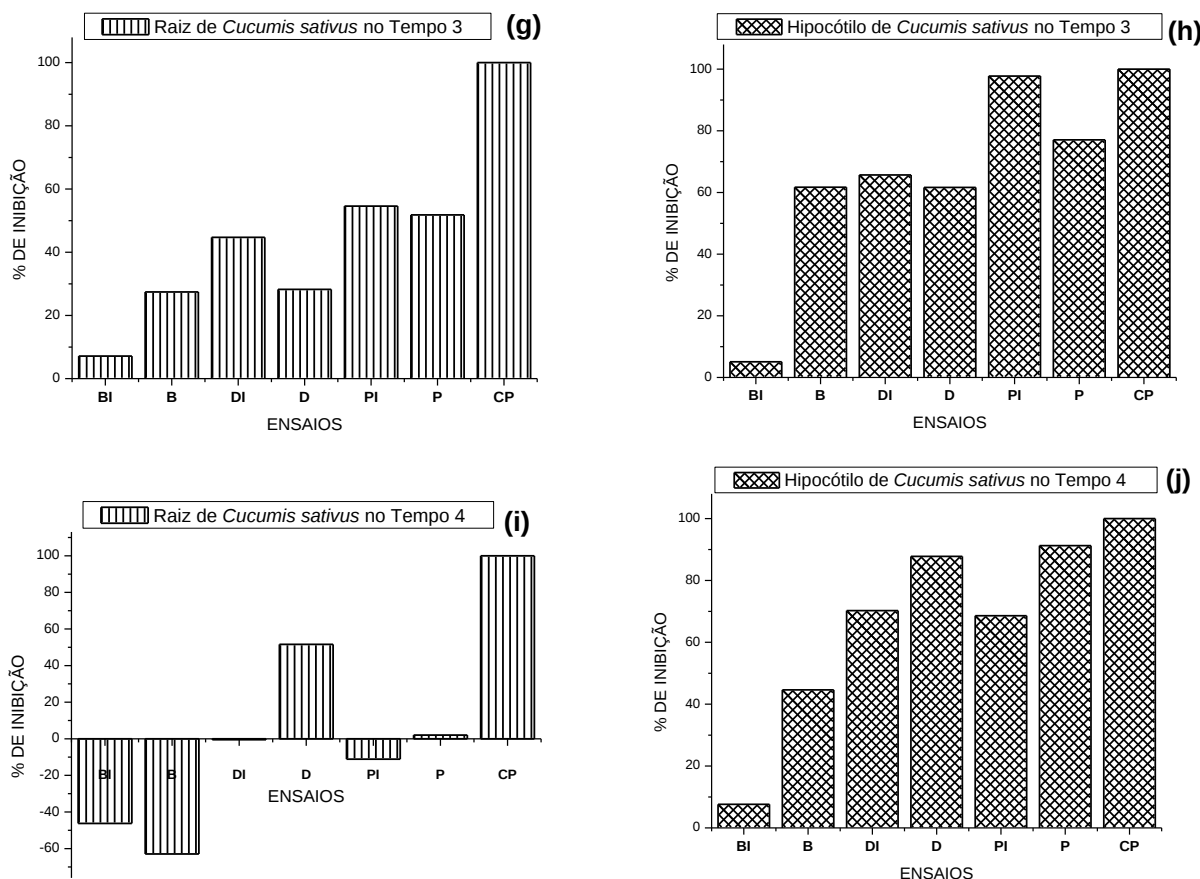


Figura 5 (continuação) - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz de *Cucumis sativus* no Tempo 3 (g) e no Tempo 4 (i). Porcentagem de inibição do alongamento do hipocótilo de *Cucumis sativus* no Tempo 3 (h) e no Tempo 4 (j). Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel (D), Diesel e *B. subtilis* (DI), Petróleo (P), Petróleo e *B. subtilis* (PI) e Controle positivo (CP), este tem adição de sulfato de zinco para inibição completa da germinação.



Fonte: autoria própria.

A Figura 5a mostra que o solo contaminado com petróleo no Tempo 0, não inibiu o desenvolvimento da raiz de *C. sativus*. As amostras contaminadas com diesel e biodiesel apresentaram inibição no crescimento em relação ao controle negativo. Os tratamentos com inóculo não apresentaram diferença na porcentagem de inibição em relação à amostra sem o inóculo.

O diesel apresentou 100% de toxicidade em ambos os parâmetros e o biodiesel também apresentou alta toxicidade. Tanto no solo contaminado apenas com petróleo como também na amostra bioaumentada a raiz de pepino apresentou 35% e 11,5% de inibição, respectivamente, nesse solo as plântulas se desenvolveram e não apresentam diferença significativa em relação ao controle (Tabela 4). Entretanto, o hipocótilo foi muito afetado, 64% de inibição na amostra com petróleo e 80% na amostra bioaumentada. O crescimento da raiz no solo contaminado com petróleo ocorreu de forma que as raízes cresceram na superfície do solo (Figura 5)

devido à coesão que o petróleo forma nas partículas de solo, impedindo a condutividade hidráulica e a difusão do oxigênio para as raízes conforme mencionado em estudos de Essien e John (2010); e também nos estudos de Caravaca e Roldán (2003). Assim não foi possível medir a toxicidade do petróleo refletindo na inibição do alongamento, mas foi possível notar uma resposta no desenvolvimento da plântula diferente dos observados no controle.

Figura 6 - Crescimento normal das plântulas de *C. sativus* no ensaio controle negativo e crescimento das raízes na superfície do solo contaminado com petróleo.



Fonte: autoria própria.

Todos os contaminantes foram muito tóxicos ao desenvolvimento de *Cucumis sativus* no Tempo 1, apresentando inibição acima de 50%, exceto o alongamento da raiz em solo contaminado com petróleo teve apenas 46% de inibição, apesar disto, esta inibição apresentou diferença significativa em relação ao controle (Tabela 4). O diesel foi o contaminante mais tóxico como visto nas Figuras 5c e 5d. Apesar de apresentarem alta inibição, as sementes de pepino em solo contaminado com diesel e biodiesel e suas amostras bioaumentadas têm menores valores de inibição quando comparando aos ensaios do Tempo zero.

Após 120 dias de biodegradação, Tempo 2, o biodiesel não apresentou nenhuma toxicidade, pelo contrário, as porcentagens negativas indicam que neste solo tanto a raiz quanto o hipocótilo de *Cucumis sativus* tiveram um crescimento maior que no solo controle, onde teoricamente as sementes teriam o máximo de desenvolvimento visto que não há adição de contaminante no solo (Figuras 5e e 5f), além disso, foi possível notar que no solo com biodiesel e *B. subtilis* o crescimento é ainda maior (Tabela 4). O diesel juntamente com o petróleo não apresentou alta toxicidade para o desenvolvimento da raiz, no entanto, os hidrocarbonetos foram muito tóxicos para o hipocótilo de *Cucumis sativus*.

No Tempo 3, após 180 dias a raiz de *C. sativus* ainda apresenta toxicidade baixa, os maiores valores de inibição foram em solo contaminado com petróleo, no entanto não passou de 55% de inibição. Por outro lado o hipocótilo ainda foi muito inibido pelos contaminantes do solo (Figura 5g e 5h).

Assim, após 240 dias de incubação do solo (Tempo 4), a raiz de *C. sativus* consegue se desenvolver em quase todas as amostras, exceto no solo contaminado com diesel que apresentou 51% de inibição no alongamento da raiz registrado na Figura 5i. No entanto, no solo contaminado com biodiesel e biodiesel com *B. subtilis*, houve crescimento significativo das raízes quando comparado ao controle (Tabela 4), por este motivo os números aparecem negativos como relatado anteriormente em outros tempos.

O alongamento da raiz de *C. sativus* não apresentou diferença significativa entre as amostras contaminadas e as amostras bioaumentadas, ou seja, a adição do *B. subtilis* não alterou a toxicidade para as raízes de *C. sativus*. Assim também, o alongamento do hipocótilo não apresentou diferença significativa entre o solo contaminado com biodiesel mais inóculo e o controle nos Tempos 3 e 4 (Tabela 5). Por outro lado, no solo contaminado com diesel e petróleo a diferença em relação ao controle foi significativa.

Tabela 4 – Média e desvio padrão do alongamento da raiz de *C. sativus*

Raiz de <i>C. sativus</i>	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4
Controle negativo	5,27 ±1,71 ^a	6,62 ±2,17 ^a	4,23 ±1,47 ^a	5,19 ±2,33 ^a	2,61 ±1,06 ^a
Biodiesel + In.	0,70 ±0,40 ^b	2,57 ±1,33 ^b	5,46 ±1,92 ^a	4,82 ±2,12 ^a	3,81 ±0,89 ^{ab}
Biodiesel	0,00 ±0,00 ^b	2,65 ±1,92 ^b	4,88 ±2,17 ^a	3,76 ±0,96 ^a	4,25 ±0,91 ^b
Diesel+ In.	0,00 ±0,00 ^b	0,95 ±0,87 ^{bc}	1,59 ±1,14 ^b	2,87 ±1,45 ^{ab}	2,62 ±0,94 ^a
Diesel	0,00 ±0,00 ^b	0,17 ±0,35 ^c	3,16 ±1,44 ^{ab}	3,72 ±1,55 ^a	1,26 ±1,03 ^a
Petróleo + In.	4,67 ±1,22 ^a	2,04 ±1,20 ^b	2,60 ±1,19 ^b	2,35 ±0,86 ^b	3,02 ±0,98 ^{ab}
Petróleo	3,38 ± 0,99 ^a	3,57 ±1,14 ^{ab}	2,82 ±0,94 ^{ab}	2,5 ±1,37 ^b	2,55 ±0,90 ^a

Os valores correspondem a média ± desvio padrão. As diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo Tempo são marcados por letras diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 5 – Média e desvio padrão do alongamento do hipocótilo de *C. sativus*

Hipocótilo de <i>C. sativus</i>	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4
Controle negativo	2,49 ±1,7 ^a	6,23 ±1,39 ^a	4,09 ±1,51 ^a	3,86 ±1,29 ^a	2,01 ±1,05 ^a
Biodiesel + In.	0,17 ±0,21 ^b	0,94 ±1,03 ^b	5,46 ±1,60 ^a	3,67 ±1,30 ^a	1,11 ±0,80 ^a
Biodiesel	0,00 ±0,00 ^b	0,64 ±0,56 ^b	4,40 ±1,53 ^a	1,48 ±0,49 ^b	1,86 ±0,68 ^{ab}
Diesel+ In.	0,00 ±0,00 ^b	0,21 ±0,26 ^{bc}	0,42 ±0,53 ^b	1,32 ±1,29 ^b	0,60 ±0,62 ^b
Diesel	0,00 ±0,00 ^b	0,03 ±0,18 ^c	1,13 ±0,98 ^b	1,48 ±1,01 ^b	0,24 ±0,31 ^b
Petróleo + In.	0,50 ±0,39 ^c	0,23 ±0,15 ^{bc}	0,89 ±0,75 ^b	0,08 ±0,11 ^c	0,63 ±0,62 ^b
Petróleo	0,88 ±0,83 ^{ac}	1,24 ±1,17 ^{bd}	0,42 ±0,25 ^b	0,88 ±0,86 ^{bc}	0,17 ±0,11 ^a

Os valores correspondem a média ± desvio padrão. As diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo Tempo são marcados por letras diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

5.1.2 Bioensaios com sementes de *Eruca sativa* no solo em diferentes períodos de incubação

As Figuras 7a a 7j mostram a porcentagem de inibição no alongamento de *Eruca sativa* (rúcula) em relação ao controle negativo, nos solos contaminados com biodiesel (B), biodiesel e *B. subtilis* (BI), diesel (D), diesel e *B. subtilis* (DI), petróleo (P), petróleo e *B. subtilis* (PI) e controle positivo (CP).

As médias de alongamento da raiz e do hipocótilo de *E. sativa* estão apresentadas nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Figura 7 - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz de *Eruca sativa* no Tempo 0 (a). Porcentagem de inibição do alongamento do hipocótilo de *Eruca sativa* no Tempo 0 (b). Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel (D), Diesel e *B. subtilis* (DI), Petróleo (P), Petróleo e *B. subtilis* (PI) e Controle positivo (CP), este tem adição de sulfato de zinco para inibição completa da germinação

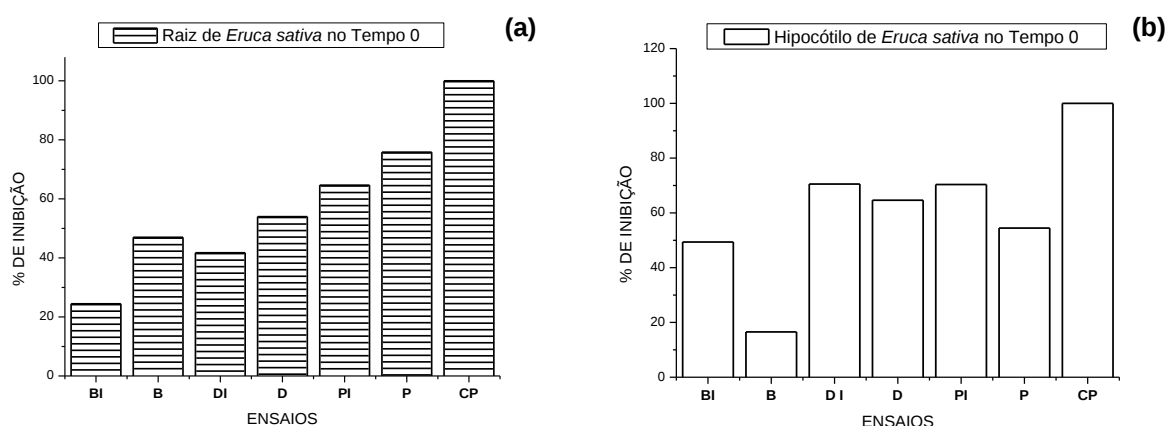


Figura 7 (continuação) - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz de *Eruca sativa* no Tempo 1 (c), no Tempo 2 (e) e no Tempo 3 (g). Porcentagem de inibição do alongamento do hipocótilo de *Eruca sativa* no Tempo 1 (d), no Tempo 2 (f) e no Tempo 3 (h). Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel (D), Diesel e *B. subtilis* (DI), Petróleo (P), Petróleo e *B. subtilis* (PI) e Controle positivo (CP), este tem adição de sulfato de zinco para inibição completa da germinação.

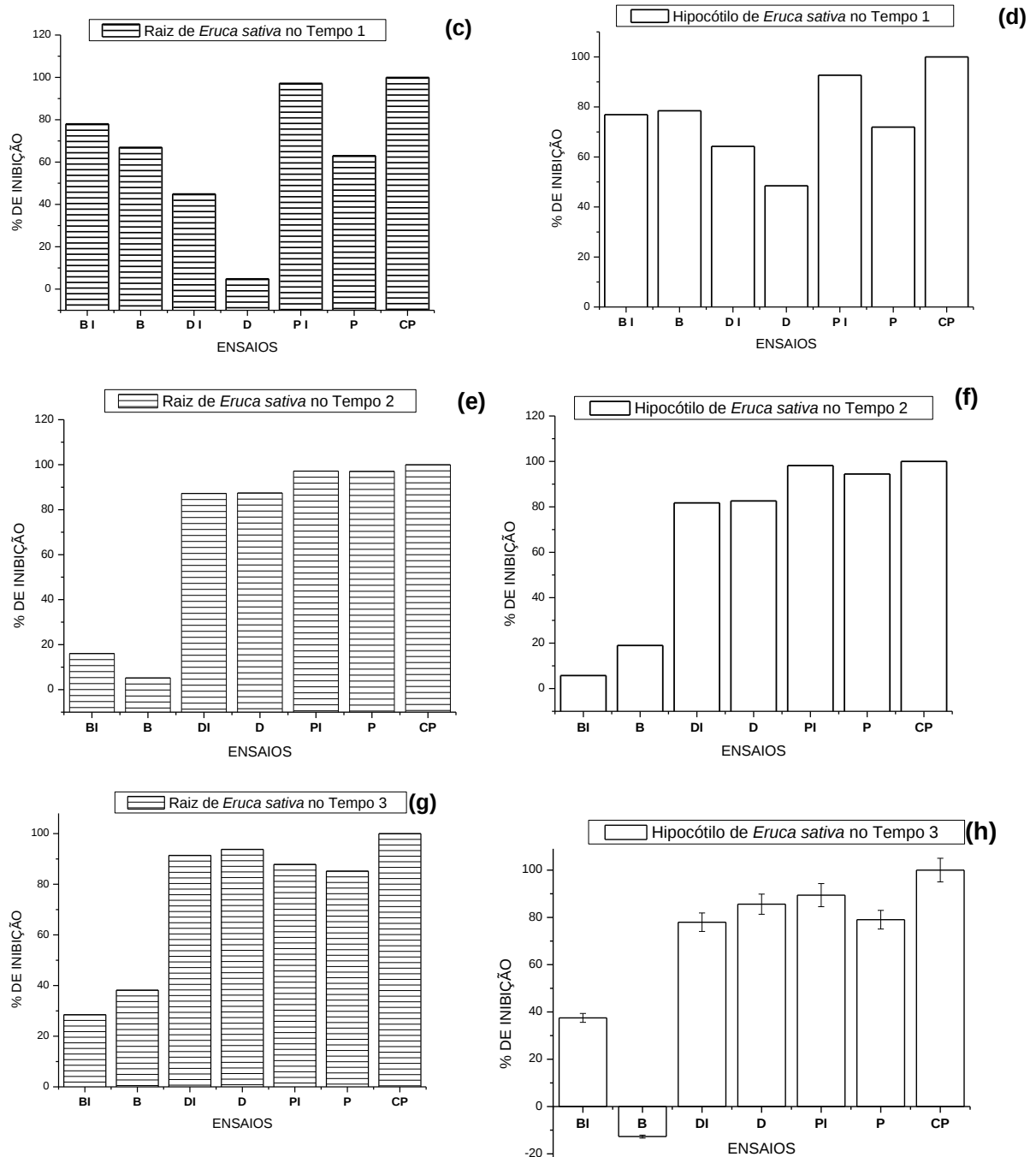
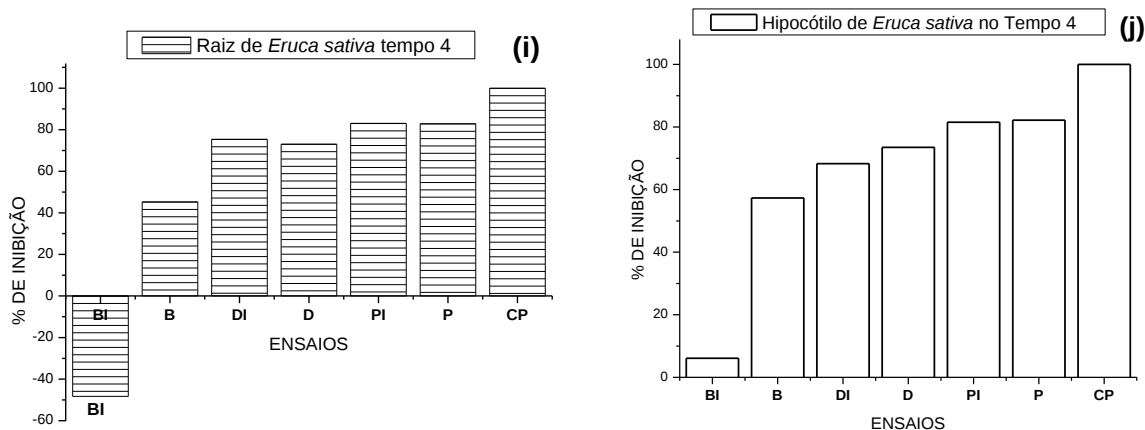


Figura 7 (continuação) - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz de *Eruca sativa* no Tempo 4 (i). Porcentagem de inibição do alongamento do hipocótilo de *Eruca sativa* no Tempo 4 (j). Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel (D), Diesel e *B. subtilis* (DI), Petróleo (P), Petróleo e *B. subtilis* (PI) e Controle positivo (CP), este tem adição de sulfato de zinco para inibição completa da germinação.



Fonte: autoria própria.

As Figuras 7a e 7b representam a porcentagem de inibição do alongamento da raiz e do hipocótilo de *Eruca sativa* em solo contaminado no Tempo 0. Na Figura 7a pode-se notar um aumento crescente na toxicidade do desenvolvimento da raiz. Neste caso, o biodiesel apresentou menor toxicidade que foi seguida pelo diesel e por fim o petróleo sendo o mais tóxico. Na Figura 7a os contaminantes (biodiesel, diesel e petróleo) com adição do inóculo, apresentaram menor toxicidade comparada às amostras sem o inóculo. Por outro lado, na Figura 7b o hipocótilo reagiu de forma contrária à raiz (Figura 7a). Os contaminantes com inóculo apresentaram-se mais tóxicos ao desenvolvimento do hipocótilo, porém pode-se notar que tanto o desenvolvimento da raiz quanto do hipocótilo em solo com biodiesel foi o menos tóxico seguido de diesel e petróleo.

No Tempo 1 os solos contaminados com petróleo e petróleo mais *B. subtilis* foram os mais tóxicos para o desenvolvimento das raízes de rúcula seguido do biodiesel, como pode ser observado na Figura 7c, ou seja, o alongamento das raízes em solo contaminado com biodiesel e com petróleo apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Por outro lado, como pode-se observar na Figura 7c, as raízes de rúcula foram pouco inibidas pelo solo contaminado com óleo diesel (4,88%) não apresentando diferença significativa em relação ao controle. e também, o desenvolvimento do hipocótilo apresentou 48% de inibição como pode ser observado na Figura 7d.

Nas Figuras 7e e 7f, o biodiesel apresentou baixa toxicidade ao desenvolvimento das sementes de *Eruca sativa*, após 120 dias de incubação do solo (Tempo 2). Assim, o

alongamento da raiz (Tabela 6) e do hipocótilo (Tabela 7) não apresentou diferença significativa em relação ao controle. No entanto, o diesel seguido pelo petróleo apresentou alta porcentagem de inibição no alongamento da raiz e do hipocótilo (Figuras 7e e 7f), diferindo significativamente do controle (Tabelas 6 e 7). De acordo com Li et al. (1997), o processo de biodegradação produz compostos residuais que causam mudanças significativas nas propriedades físico-químicas do solo e essas alterações podem causar a inibição no crescimento da planta como observados neste estudo (Tabelas 6 e 7).

No Tempo 3, o biodiesel apresentou baixa porcentagem de inibição para a raiz e o hipocótilo de *E. sativa* comparados ao petróleo e diesel como observados nas Figuras 7g e 7h, respectivamente. Nas Tabelas 6 e 7, os contaminantes, diesel e petróleo, apresentaram crescimento significativamente menor da raiz e do hipocótilo em relação ao controle, ou seja, o petróleo e o diesel ainda foram tóxicos em relação ao biodiesel e ao controle. O solo com biodiesel estimulou o crescimento do hipocótilo, apresentando porcentagens negativas na Figura 7h. No entanto, o solo com biodiesel mais inóculo apresentou uma inibição (Figura 7h) em relação ao controle, sendo que a biodegradação com a presença do inóculo pode ter produzido metabólitos tóxicos ao hipocótilo. Entretanto, os dados para o biodiesel, Tempo 3, na Tabela 7 mostram que não houve diferença significativa (teste de Kruskal-Wallis) em relação ao controle.

Após 240 dias de incubação (Tempo 4) o alongamento da raiz e do hipocótilo não apresentou inibição em solo contaminado com biodiesel, consequentemente, não houve diferença significativa em relação ao controle, indicados na Tabela 6 e 7. No entanto, em solo contaminado com petróleo e diesel a porcentagem de inibição ainda foi alta (Tabela 6). O alongamento da raiz e do hipocótilo difere significativamente do controle (Tabela 6 e 7).

Tabela 6– Média e desvio padrão do alongamento da raiz de *E. sativa*

Raiz de <i>E. sativa</i>	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4
Controle negativo	3,49 ±1,87 ^a	2,87 ± 1,2 ^a	3,29 ±1,45 ^a	2,41 ±2,11 ^a	1,19 ±1,20 ^a
Biodiesel + In.	2,63 ±0,73 ^{ab}	0,63 ±0,72 ^b	2,76 ±1,02 ^a	1,72 ±0,97 ^{ab}	2,91 ±1,67 ^a
Biodiesel	1,85 ±1,00 ^{ab}	0,95 ±1,15 ^b	3,12 ±1,35 ^a	1,49 ±1,20 ^a	1,07 ±0,50 ^{ab}
Diesel+ In.	2,03 ±0,82 ^{ab}	1,58 ±2,45 ^b	0,42 ±0,19 ^b	0,20 ±0,22 ^{bc}	0,48 ±0,25 ^{bc}
Diesel	1,60 ±0,82 ^b	2,7 ±1,45 ^a	0,41 ±0,29 ^b	0,15 ±0,18 ^c	0,53 ±0,28 ^{bc}
Petróleo + In.	1,23 ±0,42 ^b	0,08 ±0,35 ^b	0,09 ±0,44 ^b	0,00 ±0,00 ^c	0,33 ±0,52 ^c
Petróleo	0,84 ±0,48 ^b	1,06 ±1,05 ^b	0,09 ±0,39 ^b	0,35 ±0,53 ^{bc}	0,33 ±0,54 ^c

Os valores correspondem a média ± desvio padrão. As diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo Tempo são marcados por letras diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 7 – Média e desvio padrão do alongamento do hipocótilo de *E. sativa*

Hipocótilo de <i>E. sativa</i>	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4
Controle negativo	3,14 ±0,80 ^a	2,60 ±0,59 ^a	3,30 ±0,89 ^a	1,57 ±0,55 ^a	2,61 ±1,17 ^a
Biodiesel + In.	2,62 ±0,76 ^{ab}	0,60 ±0,54 ^b	3,11 ±0,82 ^a	0,98 ±0,53 ^{ab}	2,45 ±0,77 ^a
Biodiesel	1,59 ±0,63 ^{bc}	0,56 ±0,49 ^b	2,67 ±0,94 ^a	1,72 ±0,91 ^a	1,11 ±0,58 ^{ab}
Diesel+ In.	1,11 ±0,49 ^c	0,93 ±1,07 ^b	0,60 ±0,36 ^b	0,34 ±0,33 ^b	0,83 ±0,51 ^b
Diesel	0,92 ±0,55 ^c	1,34 ±0,39 ^{ab}	0,57 ±0,27 ^b	0,22 ±0,22 ^b	0,69 ±0,31 ^b
Petróleo + In.	1,43 ±0,43 ^c	0,19 ±0,33 ^{bc}	0,06 ±0,29 ^b	0,00 ±0,00 ^b	0,48 ±0,37 ^b
Petróleo	0,93 ±0,28 ^c	0,73 ±0,58 ^b	0,18 ±0,70 ^b	0,33 ±0,29 ^b	0,46 ±0,37 ^b

Os valores correspondem a média ± desvio padrão. As diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo Tempo são marcados por letras diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

5.1.3 Bioensaios com sementes de *Lactuca sativa* no solo em diferentes períodos de incubação

As Figuras 8a a 8j mostram a porcentagem de inibição no alongamento de *Lactuca sativa* (alface) em relação ao controle negativo, nos solos contaminados com biodiesel (B), biodiesel e *B. subtilis* (BI), diesel (D), diesel e *B. subtilis* (DI), petróleo (P), petróleo e *B. subtilis* (PI) e controle positivo (CP).

A média de alongamento das raízes e hipocótilos está mostrada nas Tabelas 8 e 9, seguidos do desvio padrão e marcados por letras que indicam a diferença significativa segundo teste de Kruskal-Wallis.

Figura 8 - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz de *Lactuca sativa* no Tempo 0 (a). Porcentagem de inibição do alongamento do hipocótilo de *Lactuca sativa* no tempo 0 (b). Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel (D), Diesel e *B. subtilis* (DI), Petróleo (P), Petróleo e *B. subtilis* (PI) e Controle positivo (CP), este tem adição de sulfato de zinco para inibição completa da germinação.

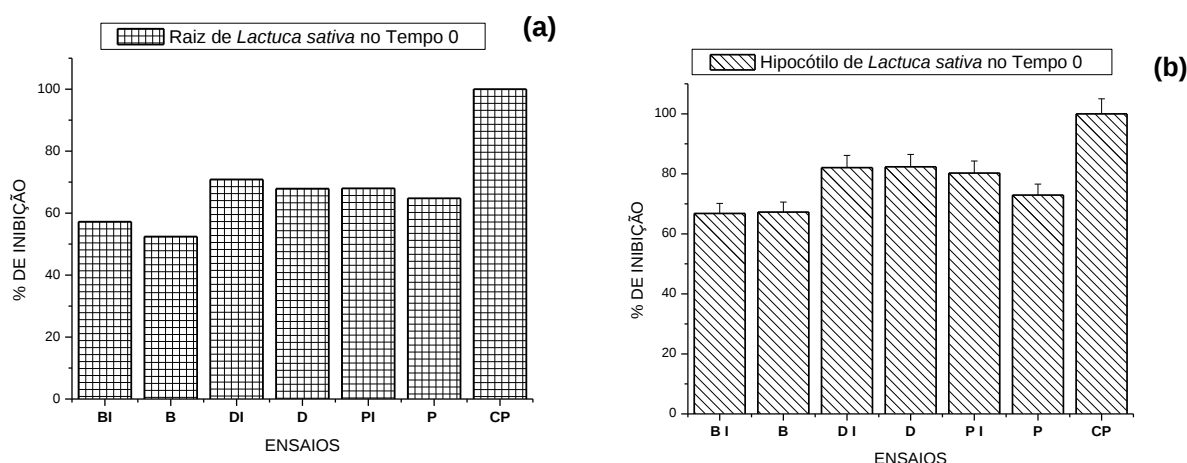


Figura 8 (continuação) - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz de *Lactuca sativa* no Tempo 1 (c), no Tempo 2 (e), no Tempo 3 (g) e no Tempo 4 (i). Porcentagem de inibição do alongamento do hipocótilo de *Lactuca sativa* no Tempo 1(d), no Tempo 2 (f), no Tempo 3(h) e no Tempo 4 (j). Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel (D), Diesel e *B. subtilis* (DI), Petróleo (P), Petróleo e *B. subtilis* (PI) e Controle positivo (CP), este tem adição de sulfato de zinco para inibição completa da germinação.

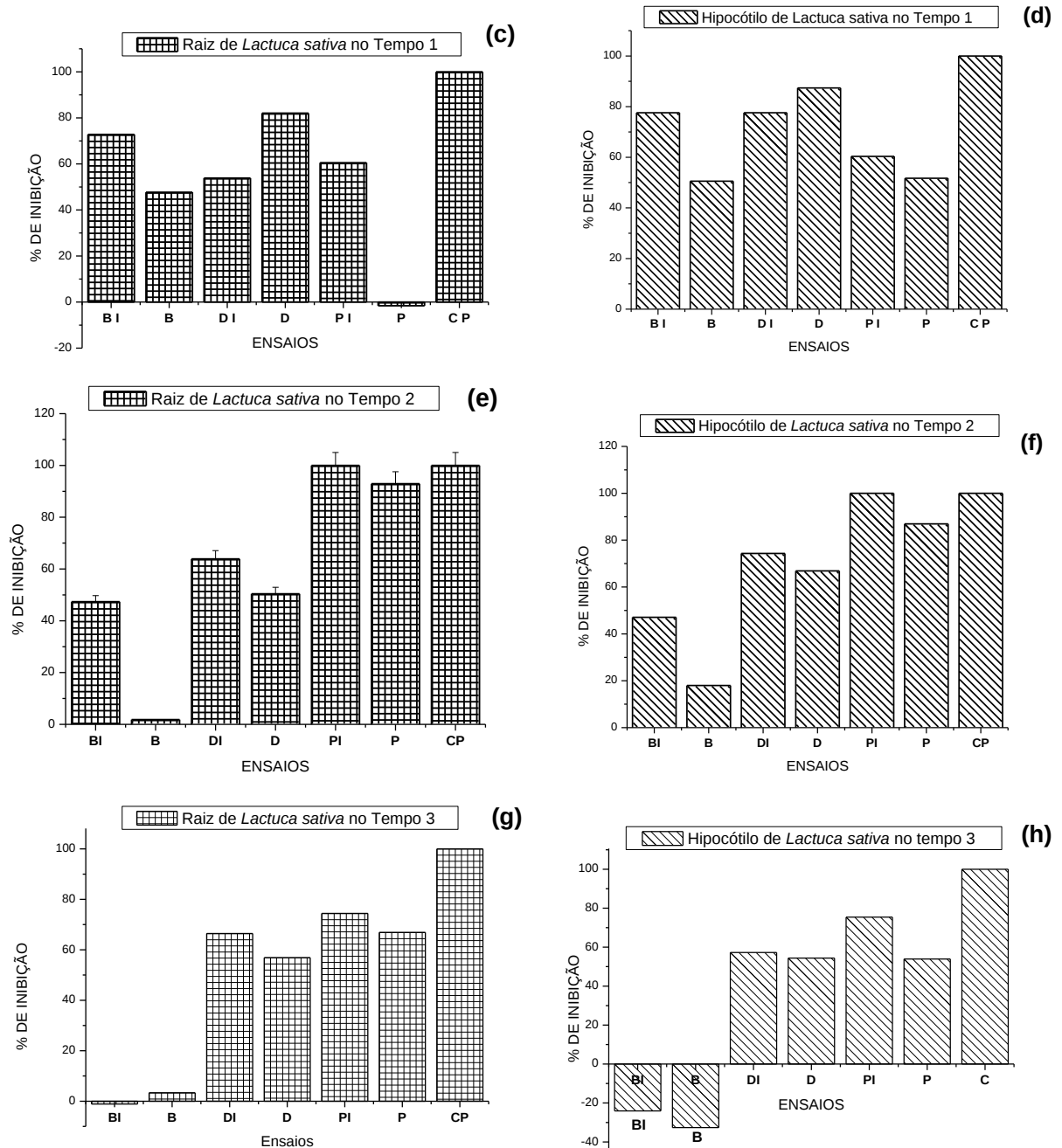
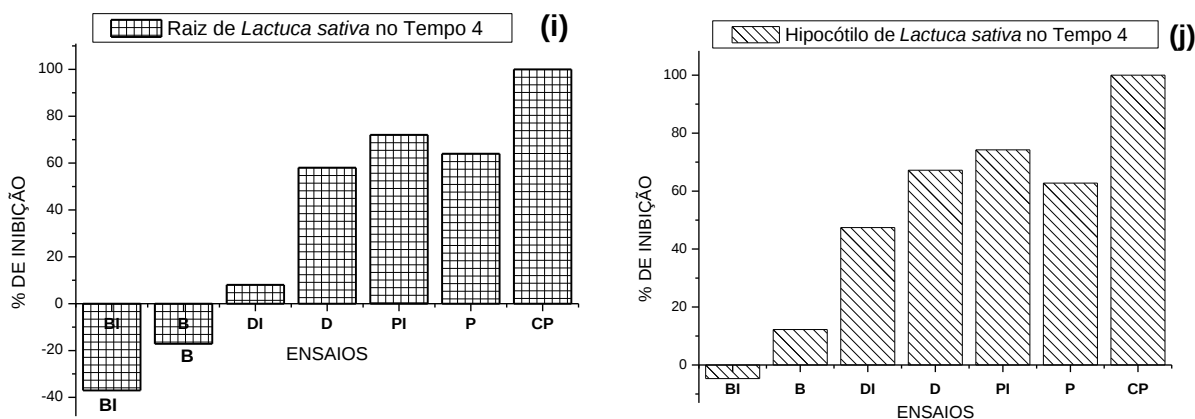


Figura 8 (continuação) - Porcentagem de inibição do alongamento da raiz de *Lactuca sativa* no Tempo 4 (i). Porcentagem de inibição do alongamento do hipocótilo de *Lactuca sativa* no Tempo 4 (j). Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel (D), Diesel e *B. subtilis* (DI), Petróleo (P), Petróleo e *B. subtilis* (PI) e Controle positivo (CP), este tem adição de sulfato de zinco para inibição completa da germinação.



No período inicial (Tempo 0) onde o solo não permaneceu incubado, o alongamento da raiz e do hipocótilo de *L. sativa* apresentou menor toxicidade em solo contaminado com biodiesel quando comparado ao diesel e petróleo. No entanto, a porcentagem de inibição de todos os contaminantes foi acima de 50% (Figura 8a e 8b). O diesel inibiu mais o desenvolvimento da raiz que o petróleo (Figura 8a). Apesar disto, a Tabela 8 mostra que a diferença no alongamento da raiz não foi significativa entre os solos contaminados com petróleo e com diesel, pois o alongamento médio da raiz em solo contaminado com petróleo é $1,02 \pm 0,50$ sendo que para o diesel foi $0,93 \pm 0,49$. Em todos os contaminantes foi possível notar uma maior inibição no alongamento da raiz entre a amostra com inóculo e a amostra sem inóculo (Figura 8a). Porém os dados expressos na Tabela 8 permitem observar que o alongamento da raiz não diferiu significativamente quanto a presença ou ausência do inóculo. Quanto a inibição no alongamento do hipocótilo, o inóculo não teve influência, exceto para o solo contaminado com petróleo (Figura 8b). Todos os contaminantes afetaram o desenvolvimento da raiz e do hipocótilo, apresentando diferenças significativas em relação ao controle.

No Tempo 1 (60 dias), o diesel foi o que provocou maior inibição no desenvolvimento da raiz de *L. sativa* (82%) e também, no hipocótilo (87%). No solo contaminando com biodiesel a inibição no desenvolvimento da plântula apresentou valores de inibição em torno de 50% (Figuras 8c e 8d) e assim o alongamento da raiz e do hipocótilo não apresentou diferença significativa em relação ao controle (Tabelas 8 e 9). Por outro lado, o alongamento da raiz e do hipocótilo na amostra de biodiesel com *B. subtilis* diferiu significativamente do

controle, esta inibição pode ser devido a formação de compostos durante o rápido processo de biodegradação que inibe o crescimento da plântula. O desenvolvimento da raiz de *L. sativa* foi pouco sensível à presença do petróleo, visto que na Tabela 8 a média de crescimento é maior do que no controle e esses ensaios não diferiram significativamente.

O solo contaminado com petróleo incubado durante 120 dias (Tempo 2) foi o mais tóxico para o desenvolvimento da raiz de *L. sativa* como pode ser observado na Figura 8e. A porcentagem de inibição foi acima de 90% (Figura 8e) revelando diferença significativa no teste Kruskal-Wallis em relação aos demais ensaios (Tabela 8). O solo contaminado com petróleo mais inóculo apresentou maior porcentagem de inibição do que o solo apenas com petróleo, nestes dois ensaios o alongamento da raiz e do hipocótilo não diferiram significativamente entre si, como observado nas Tabelas 8 e 9, respectivamente. No solo contaminado com biodiesel e *B. subtilis* a inibição do desenvolvimento da raiz e do hipocótilo de *L. sativa* não chegou a 50% (Figura 8e e 8f).

No Tempo 3, ou seja, após 180 dias de incubação do solo o crescimento da raiz e do hipocótilo no solo com biodiesel foi maior do que no controle (Figura 8g), portanto não houve diferença significativa entre o biodiesel e o controle como observado nas Tabelas 8 e 9. Em solo contaminado com petróleo e com diesel a porcentagem de inibição foi maior que 50% para raiz da *L. sativa*. Apesar disto, apenas as amostras de diesel mais inóculo e petróleo mais inóculo apresentaram diferença significativa no teste Kruskal-Wallis em relação ao controle (Tabela 8). O alongamento do hipocótilo em solo contaminado com petróleo mais inóculo foi o único que diferiu significativamente do controle (Tabela 9), consequentemente, foi o que apresentou maior porcentagem de inibição (Figura 8h). Os ensaios com diesel, diesel mais inóculo e petróleo apresentaram porcentagem de inibição em torno de 55% para o hipocótilo na média e não diferiram significativamente do controle (Figura 8h), ou seja, não pode ser considerado tóxico.

Após 240 dias de incubação do solo, Tempo 4, as raízes de *L. sativa* semeadas em solo contaminado com biodiesel e biodiesel com adição do inóculo estimularam o alongamento da raiz e também não apresentaram toxicidade no alongamento do hipocótilo. Assim, o alongamento da raiz e do hipocótilo em solo contaminado com biodiesel e biodiesel mais inóculo não diferiu significativamente do controle como pode-se observar na Tabela 8 e 9. Em solo contaminado com diesel e inóculo houve baixa inibição para as raízes de *L. sativa*, como é mostrado na Figura 8i. As porcentagens de inibição da raiz e do hipocótilo em solo contaminado com petróleo, petróleo mais inóculo e diesel continuaram acima de 50%. Esses

contaminantes apresentaram diferença significativa em relação ao controle no teste Kruskal-Wallis e também diferiram dos ensaios com biodiesel como observados nas Tabelas 8 e 9. Para o diesel enriquecido com inóculo a inibição foi de 47% (Figura 8j).

Com base nas porcentagens de toxicidade, nas médias de alongamento da raiz e hipocótilo e as diferenças significativas entre os contaminantes pode-se concluir que o biodiesel foi o contaminante menos tóxico que o diesel, petróleo e petróleo mais inóculo para o desenvolvimento da raiz e do hipocótilo de *L. sativa* após 240 dias de incubação do solo (Tempo 4).

Tabela 8 – média e desvio padrão do alongamento da raiz de *L. sativa*

Raiz de <i>L. sativa</i>	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4
Controle negativo	2,90 ±0,60 ^a	1,95 ±0,55 ^a	2,40 ±0,63 ^a	1,50 ±0,89 ^a	0,95 ±0,38 ^a
Biodiesel + In.	1,24 ±0,98 ^b	0,53 ±0,87 ^b	1,26 ±1,01 ^b	1,51 ±0,75 ^a	1,30 ±0,61 ^a
Biodiesel	1,38 ±0,81 ^b	1,02 ±0,85 ^{ab}	2,35 ±0,67 ^a	1,45 ±0,78 ^a	1,11 ±0,50 ^a
Diesel+ In.	0,84 ±0,57 ^b	0,90 ±0,92 ^b	0,86 ±0,33 ^b	0,50 ±0,41 ^b	0,87 ±0,31 ^{ab}
Diesel	0,93 ±0,49 ^b	0,35 ±0,48 ^b	1,19 ±0,47 ^b	0,64 ±0,50 ^{ab}	0,40 ±0,29 ^{bc}
Petróleo + In.	0,93 ±0,60 ^b	0,77 ±0,43 ^b	0,00 ±0,00 ^c	0,38 ±0,71 ^b	0,26 ±0,30 ^c
Petróleo	1,02 ±0,50 ^b	2,26 ±0,84 ^a	0,17 ±0,22 ^c	0,49 ±0,37 ^{ab}	0,34 ±0,23 ^{bc}

Os valores correspondem a média ± desvio padrão. As diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo Tempo são marcados por letras diferentes (p<0,05) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 9 – média e desvio padrão do alongamento do hipocótilo de *L. sativa*

Hipocótilo de <i>L. sativa</i>	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4
Controle negativo	2,23 ±0,73 ^a	1,74 ±0,41 ^a	2,70 ±0,49 ^a	1,28 ±0,39 ^a	1,28 ±0,38 ^a
Biodiesel + In.	0,73 ±0,68 ^b	0,39 ±0,50 ^b	1,44 ±0,75 ^{bc}	1,59 ±0,45 ^a	1,34 ±0,58 ^a
Biodiesel	0,74 ±0,41 ^b	0,86 ±0,37 ^{ac}	2,23 ±0,58 ^{ab}	1,70 ±0,49 ^a	1,12 ±0,36 ^{ab}
Diesel+ In.	0,39 ±0,17 ^b	0,39 ±0,29 ^{bc}	0,70 ±0,23 ^c	0,55 ±0,32 ^a	0,67 ±0,22 ^{bc}
Diesel	0,40 ±0,08 ^b	0,23 ±0,16 ^b	0,90 ±0,21 ^c	0,58 ±0,29 ^a	0,42 ±0,23 ^c
Petróleo + In.	0,44 ±0,23 ^b	0,69 ±0,38 ^{bc}	0,00 ±0,00 ^d	0,31 ±0,27 ^b	0,33 ±0,34 ^c
Petróleo	0,60 ±0,26 ^b	0,84 ±0,36 ^{ac}	0,35 ±0,19 ^{dc}	0,59 ±0,24 ^{ab}	0,47 ±0,24 ^c

Os valores correspondem a média ± desvio padrão. As diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo Tempo são marcados por letras diferentes (p<0,05) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

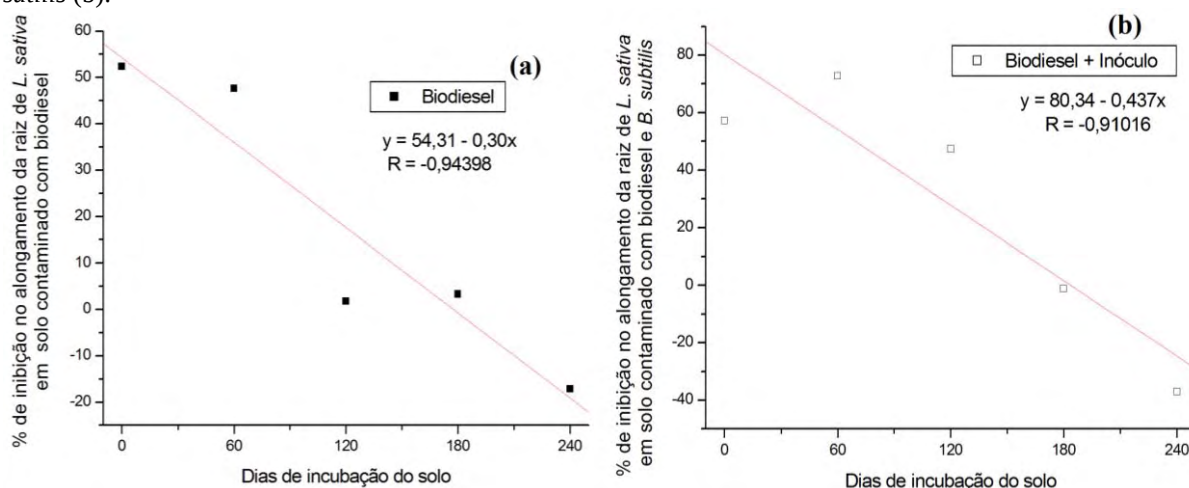
5.1.4 Relação da fitotoxicidade com o tempo de biodegradação

As Figuras 9 e 10 apresentam a regressão linear dos valores de porcentagem de inibição da fitotoxicidade da raiz de *L. sativa* e *C. sativus*, respectivamente. As Figuras 11a e 11b

apresentam a porcentagem de inibição do hipocótilo de *L. sativa* e de *C. sativus* em solo contaminado com diesel enriquecido com *B. subtilis*.

A porcentagem de inibição no alongamento da raiz de *L. sativa* demonstrou correlação negativa com o tempo de biodegradação do biodiesel, ou seja, quanto maior o tempo de incubação, menor a fitotoxicidade, deste modo pode-se inferir que a raiz de *L. sativa* foi sensível a presença do biodiesel e à diminuição desse contaminante durante o processo de biodegradação.

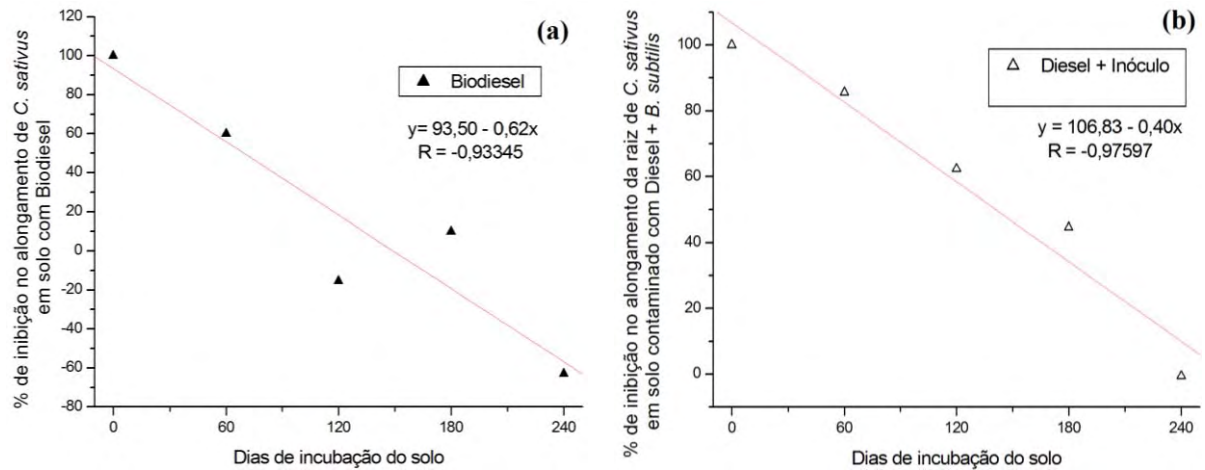
Figura 9 - Análise de regressão da porcentagem de inibição no alongamento da raiz de *L. sativa* em relação aos dias de incubação do solo. No solo contaminado com biodiesel (a) e no solo contaminado com biodiesel e *B. subtilis* (b).



Fonte: autoria própria.

A porcentagem de inibição no alongamento da raiz de *C. sativus* também apresentou correlação negativa com o tempo de incubação do solo com biodiesel (Figura 10a) e no solo com diesel e inóculo (Figura 10b). Neste caso, pode-se relacionar a diminuição da toxicidade com o período de incubação do solo. Assim, a raiz de *C. sativus* foi sensível à presença do biodiesel e através da diminuição da sua fitotoxicidade refletiu uma maior biodegradação do contaminante.

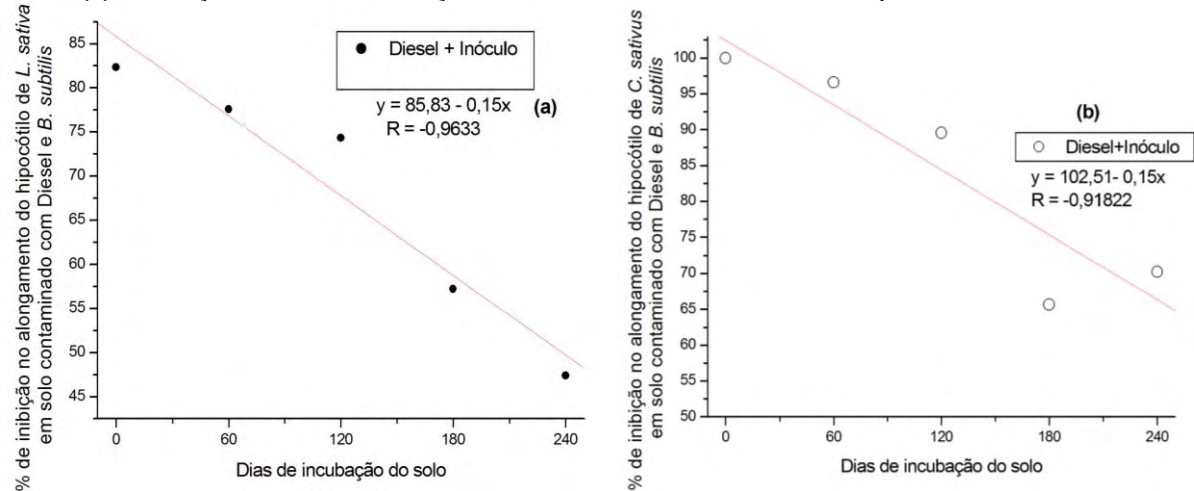
Figura 10 - Análise de regressão da porcentagem de inibição no alongamento da raiz de *C. sativus* em relação aos dias de incubação do solo. No solo contaminado com biodiesel (a) e no solo contaminado com diesel e *B. subtilis* (b).



Fonte: autoria própria.

O hipocótilo de *L. sativa* apresentou uma correlação entre a porcentagem de inibição e os dias de incubação do solo como observado na Figura 11. No entanto, pode-se notar que apesar da diminuição da fitotoxicidade, o diesel enriquecido com *B. subtilis* ainda apresenta 47% de inibição (Figura 11a). O hipocótilo de *C. sativus* também demonstrou relação linear da diminuição da toxicidade em solo contaminado com diesel mais inóculo como observado na Figura 11b. No entanto, foi possível observar que a toxicidade em 240 dias apresentou-se alta. Por outro lado, nesse mesmo contaminante a raiz de *C. sativus* não apresentou inibição em relação ao controle (Figura 10 b).

Figura 11 - Análise de regressão da porcentagem de inibição no alongamento do hipocótilo de *L. sativa* (a) e *C. sativus* (b) em relação aos dias de incubação do solo contaminado com diesel enriquecido com *B. subtilis*.



Fonte: autoria própria.

Apesar dos outros bioensaios (Tabela 10) demonstrarem redução da toxicidade durante o processo de biodegradação, não foi possível obter uma correlação linear ($R \geq 0,90$), entre a diminuição da fitotoxicidade e os dias de incubação do solo.

As sementes de *E. sativa* não apresentaram esta relação linear de diminuição da toxicidade em relação ao período de incubação para nenhum contaminante. Assim não foi possível observar uma tendência quanto a diminuição ou aumento da toxicidade.

Com base nos resultados pode-se observar que a raiz de *L. sativa* e *C. sativus* apresentaram, em alguns casos como nas Figuras 9 e 10, uma relação linear da porcentagem de fitotoxicidade e os dias de incubação do solo. Por outro lado, o hipocótilo de *L. sativa* e *C. sativus* apresentou esta relação apenas no solo contaminado com diesel mais inóculo.

Tabela 10 – Coeficiente de correlação linear entre a fitotoxicidade e os dias de biodegradação do contaminante

Coeficiente de correlação (r)						
	RAIZ DE PEPINO	HIPOCÓTILO DE PEPINO	RAIZ DE RUCULA	HIPOCÓTILO DE RUCULA	RAIZ DE ALFACE	HIPOCÓTILO DE ALFACE
biodiesel	-0,93	-0,51	-0,22	-0,33	-0,94	-0,79
biodiesel + I	-0,88	-0,42	-0,68	-0,31	-0,91	-0,86
diesel	-0,72	-0,58	0,56	0,46	-0,57	-0,75
Diesel + I	-0,97	-0,91	0,76	0,41	-0,69	-0,96
petróleo	-0,5	0,73	0,45	0,5	0,31	-0,19
petróleo + I	-0,32	-0,26	0,32	0,46	0,23	0,03

Fonte: autoria própria.

Na literatura, a raiz de *C. sativus* foi descrita como um bom indicador de toxicidade (WANG et al., 2001; MUNZUROGLU e GECKIL, 2002; USEPA, 1996). Do mesmo modo a *L. sativa* foi utilizada em muitos estudos para monitoramento da toxicidade (HUBÁLEK et al., 2007; BANKS e SCHULTZ, 2005; USEPA, 1996).

5.2 O pH do solo no tempo inicial e final do período de incubação

O pH do solo foi monitorado nos primeiros dias e no final, sendo os valores registrados na Tabela 11. A adição de biodiesel ao solo diminuiu o pH em relação à amostra de solo controle. No entanto, no tempo final, que foi o Tempo 4, todas as amostras apresentaram pH em torno de 6 (Tabela 11). Leung et al. (2006) relataram em seu trabalho a elevação da acidez devido a degradação do biodiesel de origem vegetal ao final de 52 semanas, diferentes dos resultados obtidos neste trabalho que utilizou um biodiesel que era produto da mistura de biodiesel vegetal e animal (item 4.2.) e que o pH não variou consideravelmente, ou seja, entre 4,996 e 6,306.

A diminuição do pH do solo com biodiesel no início da contaminação pode ter contribuído para as porcentagens de inibição acima de 50% no alongamento da raiz e do hipocótilo de pepino e alface nos primeiros meses de biodegradação. Porém, no final do experimento o solo contaminado com biodiesel apresentou um valor de pH de 6,3, sendo possível notar também que neste mesmo período, Tempo 4, não há mais inibição, mas um crescimento maior das plântulas em solo com biodiesel em comparação ao controle.

Tabela 11 – O pH do solo durante o início e final do experimento

<i>pH do solo</i>	<i>Tempo 0</i>	<i>Tempo 1</i>	<i>Tempo 4</i>
Controle	6,183 $\pm$ 0,097	6,756 $\pm$ 0,012	6,813 $\pm$ 0,074
Biodiesel	4,996 $\pm$ 0,020	5,156 $\pm$ 0,012	6,306 $\pm$ 0,093
Petróleo	5,876 $\pm$ 0,016	5,626 $\pm$ 0,071	6,130 $\pm$ 0,016
Diesel	5,920 $\pm$ 0,032	5,903 $\pm$ 0,122	6,263 $\pm$ 0,117

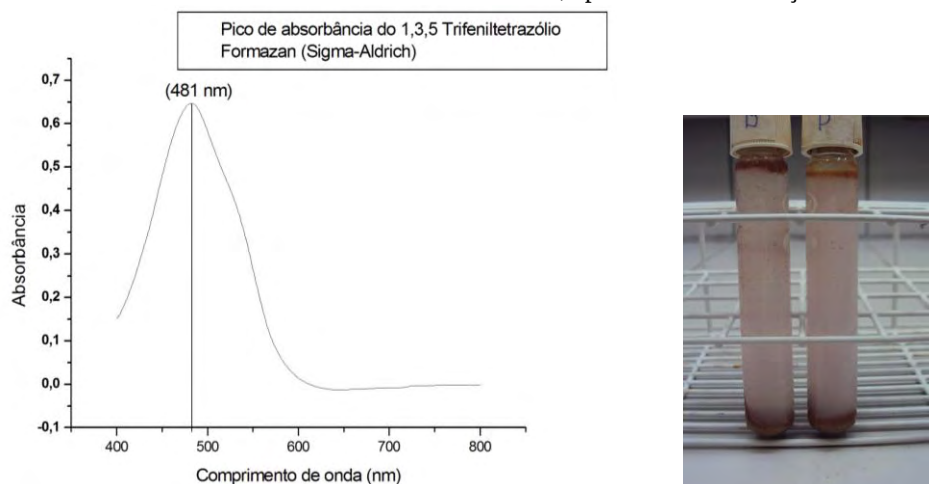
Fonte: autoria própria.

O solo contaminado com derivados do petróleo apresentou valores de pH próximos do solo da amostra controle. Portanto, as porcentagens de inibição das plântulas em solo contaminado com diesel e petróleo não apresentaram relação com o pH.

5.3 Uso do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) para estimar atividade microbiana

A metodologia para estimar a atividade microbiana através do TTC foi inviabilizada devido à ocorrência de vários problemas, pois ao misturar metanol com a amostra de solo contaminada com biodiesel, a amostra muda a coloração apresentando uma coloração branca leitosa, alterando totalmente a leitura no espectrofotômetro, além disso, a metodologia recomenda a leitura em 546 nm. No entanto, ao realizar a varredura do TPF (vide item 4.4), o pico ocorre em 481 nm como visto na Figura 12. Foi feita a tentativa de não utilizar o metanol, no entanto o pico de absorção muda novamente. Assim, o TTC foi substituído pelo DCPIP, que tem o mesmo princípio de visualizar através de colorimetria a atividade de biodegradação dos micro-organismos no solo.

Figura 12 - Pico de absorbância do 1,3,5-trifeniltetrazólio formazan (Sigma-Aldrich) e ao lado tubo contendo solo contaminado com biodiesel adicionado metanol, apresentando coloração leitosa.



Fonte: autoria própria.

5.4 Uso do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) para detectar a atividade microbiana no solo contaminado em diferentes tempos de biodegradação

Os testes colorimétricos descritos a seguir relacionam a atividade dos micro-organismos do solo com a biodegradação, bem como a influência do inóculo adicionado ao solo com biodiesel, diesel e petróleo.

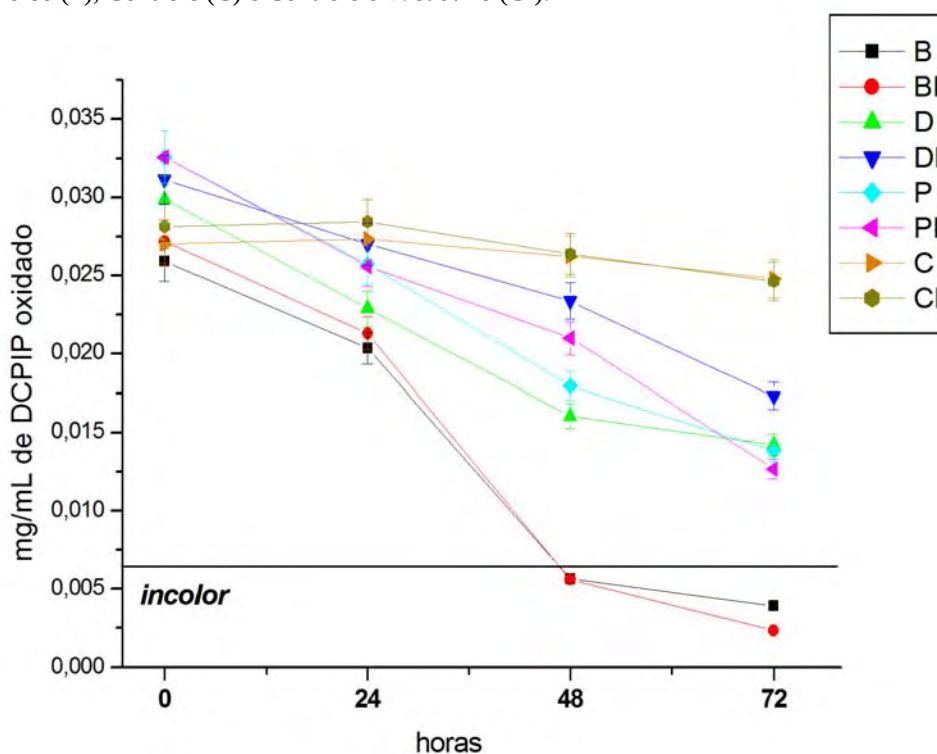
5.4.1 Atividade microbiana no Tempo zero

A Figura 13 mostra a evolução da descoloração do DCPIP nas amostras de solo recém-contaminado, incubados durante 72 h. Os solos contaminados com biodiesel e biodiesel com *B. subtilis* tornaram-se incolores após 48 h, essa descoloração foi visual como visto na Figura 14b. Assim também, Demirbaş (2008) descreveu em seu estudo maior biodegradabilidade do biodiesel em relação aos derivados do petróleo.

As amostras enriquecidas com *B. subtilis* não apresentaram eficiência maior do que as amostras sem o inóculo como visto na Figura 13. Este resultado sugere que as amostras com micro-organismos autóctones foram capazes de degradar o poluente tanto quanto as amostras enriquecidas com *B. subtilis*. A eficiência dos micro-organismos autóctones pode ser devido à compatibilidade fisiológicas dos micro-organismos com seu habitat comparados com aqueles micro-organismos introduzidos artificialmente (ATLAS e BARTHA, 1998; BENTO et al., 2005). Além disso, o inóculo quando no ambiente estará sujeito a diversas interações

ecológicas com outros micro-organismos do solo, cruciais para indicar se o inóculo se estabelecerá ou desaparecerá (LIU e SUFLITA, 1993).

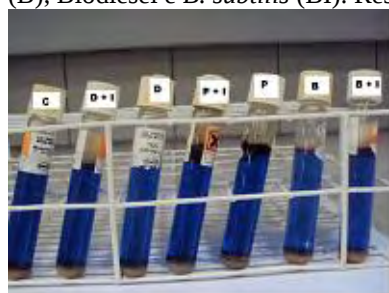
Figura 13 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo recém-contaminado (Tempo zero) nos tratamentos Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel e *B. subtilis* (DI), Diesel (D), Petróleo e *B. subtilis* (PI), Petróleo (P), Controle (C) e Controle e *B. subtilis* (CI).



Fonte: autoria própria.

Apesar do solo contaminado com biodiesel ser o único a descolorir totalmente o DCPIP colocado nos tubos, pode se observar uma queda de DCPIP oxidado nas amostras de solo com diesel e petróleo. No entanto, nenhuma delas ficou totalmente incolor no intervalo de 72 h (Figuras 13 e 14). Esta pequena atividade no diesel e petróleo pode estar relacionada com a biodegradação das frações menos tóxicas do diesel e petróleo. De acordo com Das e Mukherjee (2006) linhagens de *Bacillus subtilis* degradaram, preferencialmente, n-alcanos comparados aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), pois quanto maior o número de anéis aromáticos dos HAP, maior sua resistência a biodegradação.

Figura 14 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo recém-contaminado (Tempo zero), nos tratamentos Controle (C), Diesel e *B. subtilis* (DI), Diesel (D), Petróleo e *B. subtilis* (PI), Petróleo (P), Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI). Resultados após 24 h (a) após 48 h (b) e após 72 h (c).

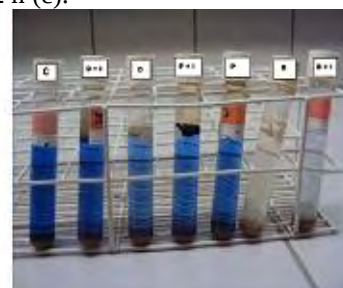


24 h (a)

Fonte: autoria própria.



48 h (b)

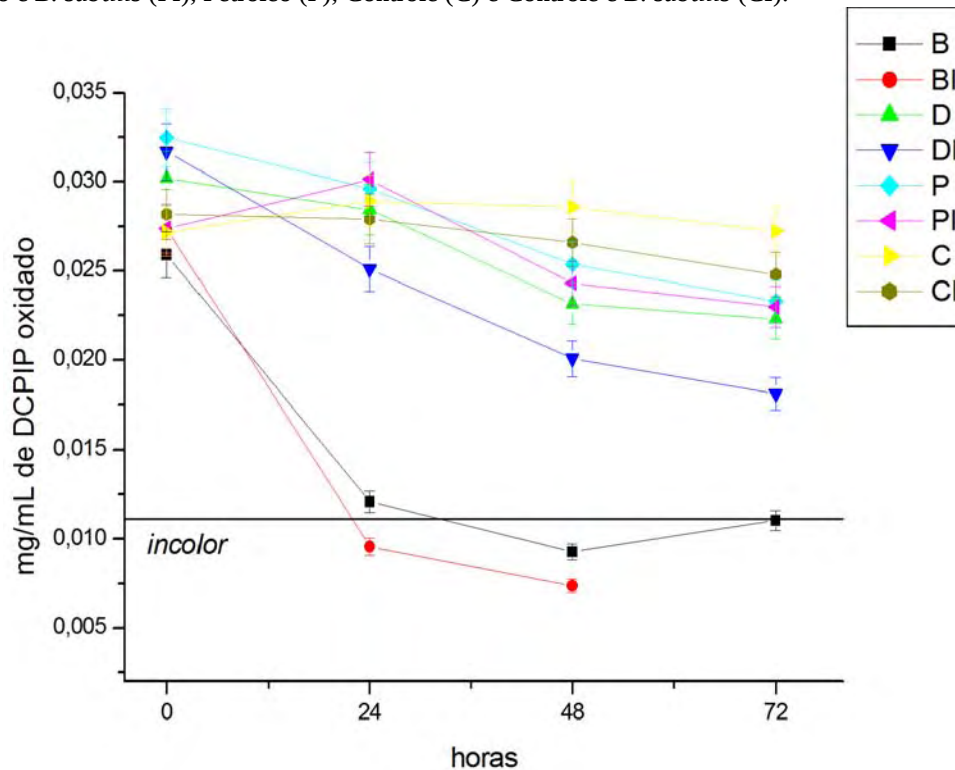


72 h (c)

5.4.2 Atividade microbiana no Tempo 1

A Figura 15 mostra a descoloração do DCPIP em solo contaminado enterrado durante 60 dias. Pode-se perceber que a amostra de solo com biodiesel começa a ficar incolor com apenas 24 h de incubação. Comparado com o Tempo 0, o biodiesel tem mais atividade em 24 h no Tempo 1, onde o solo permaneceu enterrado durante 60 dias. Deste modo, foi possível sugerir que o contato dos micro-organismos do solo com o contaminante durante 60 dias permitiu uma seleção de micro-organismos capazes de metabolizar o contaminante e, conseqüentemente, aumentar essa população microbiana melhorando a biodegradação do biodiesel. Somente as amostras com biodiesel ficaram incolores, no entanto há uma pequena descoloração do DCPIP no solo com diesel e *B. subtilis* (Figura 16).

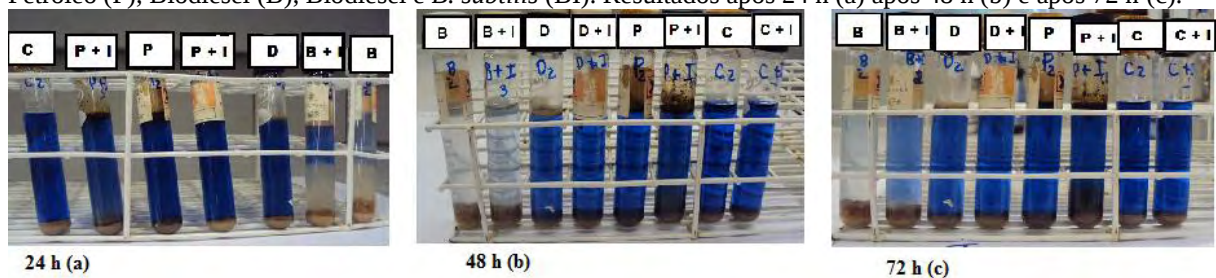
Figura 15 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 60 dias (Tempo 1), nos tratamentos Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel e *B. subtilis* (DI), Diesel (D), Petróleo e *B. subtilis* (PI), Petróleo (P), Controle (C) e Controle e *B. subtilis* (CI).



Fonte: autoria própria.

No solo com biodiesel e *B. subtilis* a amostra ficou totalmente incolor voltando a ficar azulada novamente (Figura 16c). O ensaio com diesel mais *B. subtilis* apresentou menor concentração de DCPIP oxidado do que em solo com diesel, mas não tornou o meio incolor. Assim também, Margesin e Schinner (1997) relataram que a adição do inóculo não ajudou na biodegradação do diesel em solos alpinos. Por outro lado, Márquez-Rocha et al. (2000) descreveram que um consórcio microbiano obteve sucesso na biodegradação do diesel em solo.

Figura 16 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 60 dias (Tempo 1), nos tratamentos Controle (C), Diesel e *B. subtilis* (DI), Diesel (D), Petróleo e *B. subtilis* (PI), Petróleo (P), Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI). Resultados após 24 h (a) após 48 h (b) e após 72 h (c).

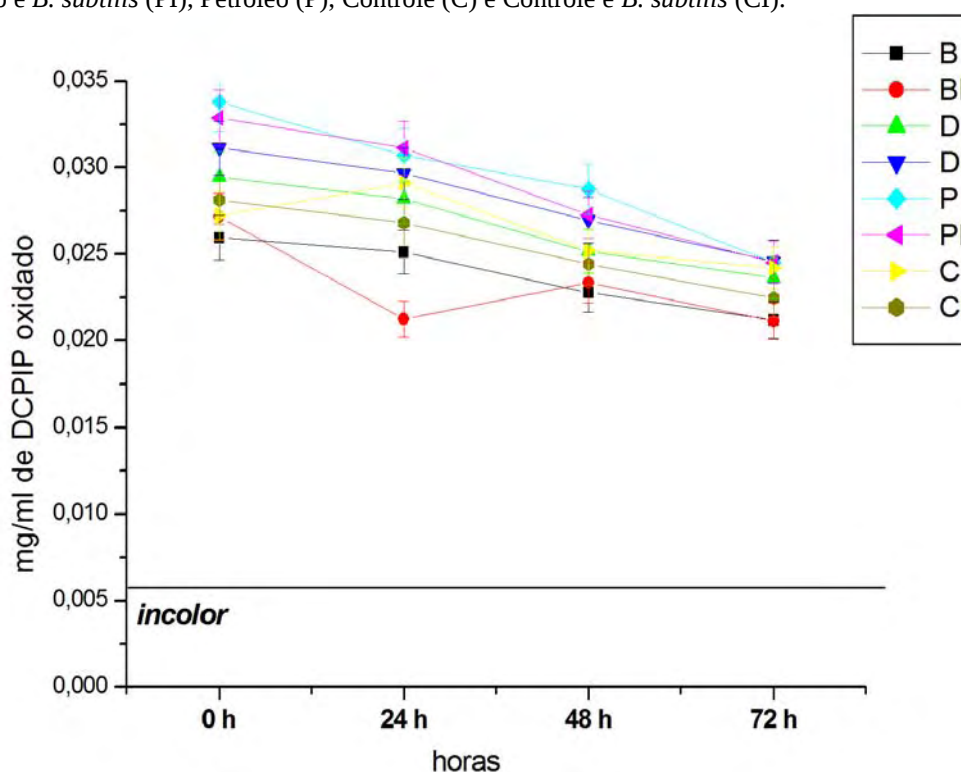


Fonte: autoria própria.

5.4.3 Atividade microbiana no Tempo 2

A concentração de DCPIP oxidado nos ensaios com solo que permaneceu enterrado durante 120 dias está expressa na Figura 17. Todos os contaminantes têm uma pequena descoloração. Nenhuma das amostras se tornou incolor no período de 72 h. Devido à alta atividade do biodiesel apresentada nos Tempos 0 e 1, acredita-se que todo o biodiesel já foi biodegradado e assim no Tempo 2 a amostra de solo com biodiesel não alterou a coloração do DCPIP.

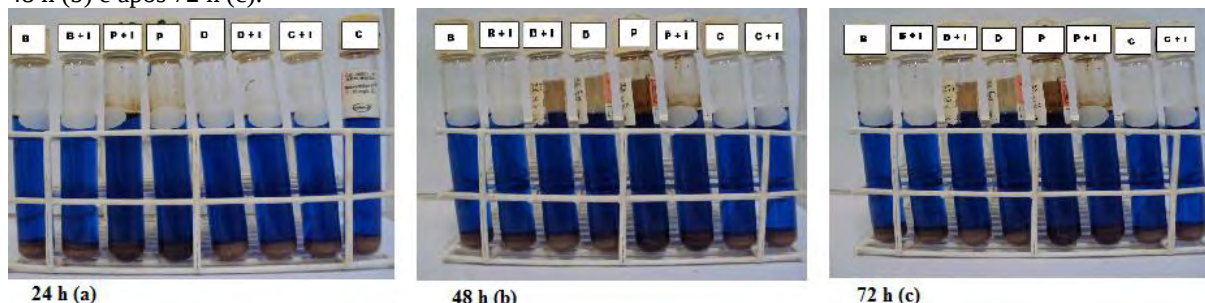
Figura 17 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 120 dias (Tempo 2), nos tratamentos Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel e *B. subtilis* (DI), Diesel (D), Petróleo e *B. subtilis* (PI), Petróleo (P), Controle (C) e Controle e *B. subtilis* (CI).



Fonte: autoria própria.

Na Figura 18 pode-se observar que nenhuma amostra tornou-se incolor no período de 72 h. Se por um lado o biodiesel já foi todo biodegradado e não tem atividade, por outro lado as frações do diesel e petróleo de difícil biodegradação ainda não são assimiladas pelos micro-organismos.

Figura 18 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 120 dias (Tempo 2), nos tratamentos Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel e *B. subtilis* (DI), Diesel (D), Petróleo e *B. subtilis* (PI), Petróleo (P), Controle (C) e Controle e *B. subtilis* (CI). Resultados após 24 h (a) após 48 h (b) e após 72 h (c).



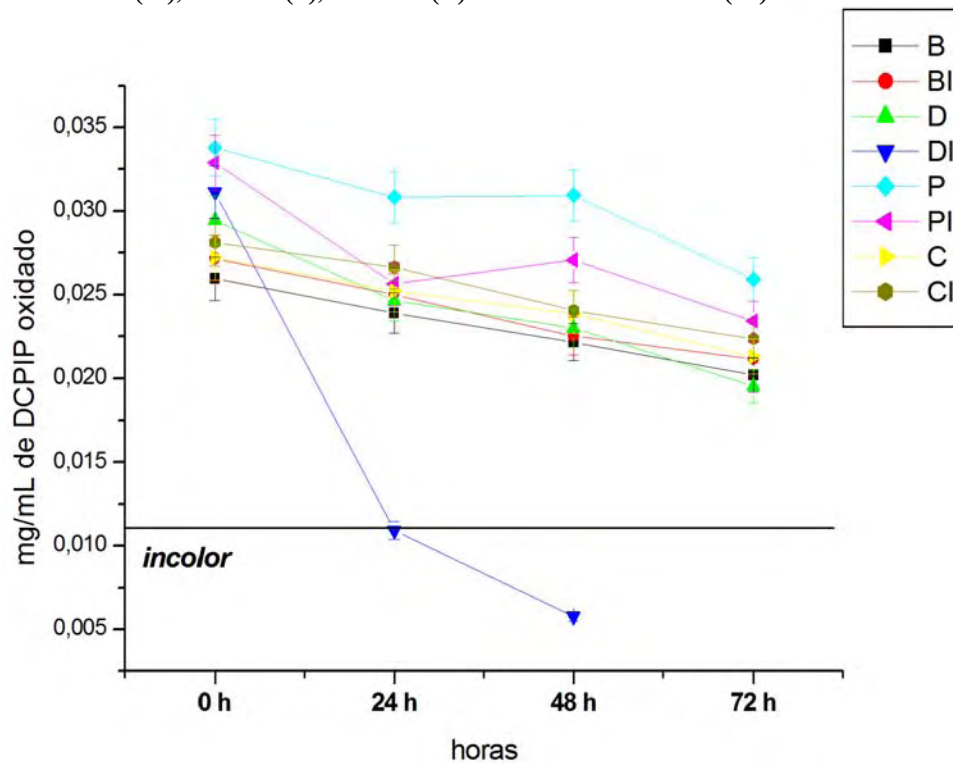
Fonte: autoria própria.

5.4.4 Atividade microbiana no Tempo 3

A Figura 19 apresenta a descoloração do DCPIP no solo que permaneceu enterrado durante 180 dias. A Figura 20b mostra que em 48 h o solo com diesel e *B. subtilis* reduziu o DCPIP do tubo restando menos de 0,005 mg/mL de DCPIP oxidado. O solo contaminado com diesel apresentou uma pequena atividade, porém não foi capaz de tornar o meio totalmente incolor, deste modo pode-se sugerir que o *B. subtilis* e a microbiota autóctone foi mais ativa na biodegradação do óleo diesel. No entanto, isso não significa que todo o óleo foi biodegradado, visto que o diesel apresenta compostos de difícil biodegradação. Este resultado corrobora com os dados de Nwaogu et al. (2008), que concluíram que o *B. subtilis* foi eficiente na biodegradação de hidrocarbonetos como o diesel.

Como já descrito na metodologia, depois de totalmente incolor o DCPIP começou a ser oxidado novamente voltando à coloração azul como visto na Figura 20c, por este motivo os dados da Figura 19 para o solo diesel e *B. subtilis* terminaram em 48 h. Esta reversibilidade pode estar relacionada ao crescimento dos micro-organismos aeróbios que estão degradando o contaminante e, conseqüentemente, utilizando todo o oxigênio no interior do tubo e reduzindo o DCPIP, com o constante consumo de oxigênio do interior do tubo. Assim há a formação de um ambiente anóxico, possibilitando o crescimento dos micro-organismos anaeróbios, tornando o DCPIP azul novamente.

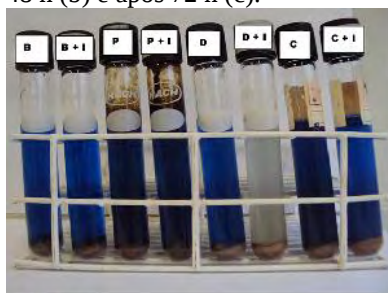
Figura 19 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 180 dias (Tempo 3), nos tratamentos Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel e *B. subtilis* (DI), Diesel (D), Petróleo e *B. subtilis* (PI), Petróleo (P), Controle (C) e Controle e *B. subtilis* (CI).



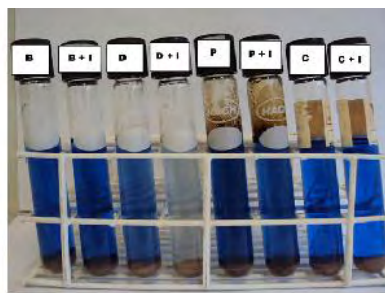
Fonte: autoria própria

Foi possível notar que na amostra diesel e *B. subtilis*, apesar do meio estar incolor, o crescimento da biomassa microbiana capaz de biodegradar o diesel provocou a turbidez do meio. O solo com biodiesel e também sua amostra bioaumentada continuou sem nenhuma atividade, assim como no Tempo 2, confirmando a ausência do contaminante no solo.

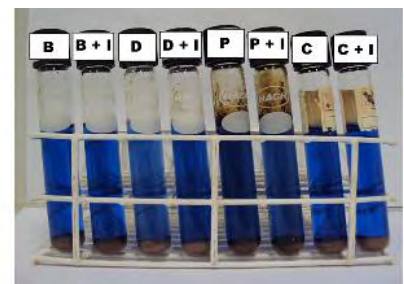
Figura 20 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 180 dias (Tempo 3), nos tratamentos Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel e *B. subtilis* (DI), Diesel (D), Petróleo e *B. subtilis* (PI), Petróleo (P), Controle (C) e Controle e *B. subtilis* (CI). Resultados após 24 h (a) após 48 h (b) e após 72 h (c).



24 h (a)



48 h (b)



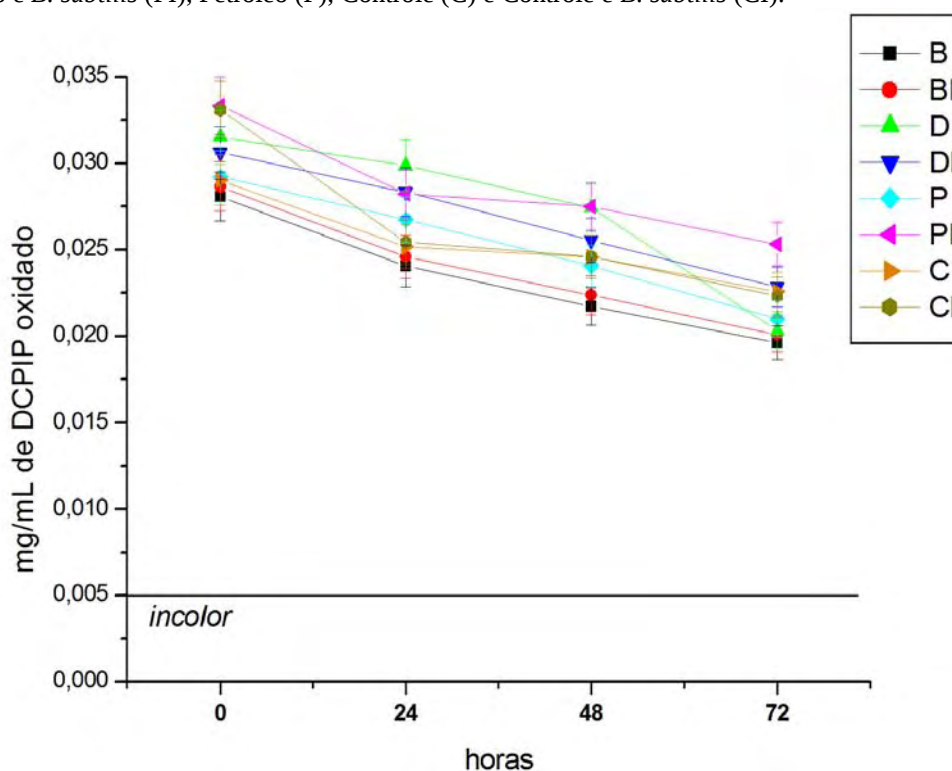
72 h (c)

Fonte: autoria própria.

5.4.5 Atividade microbiana no Tempo 4

Após 240 dias de incubação do solo nenhum tratamento se tornou incolor no teste colorimétrico, como observado na Figura 21. No Tempo 4, a amostra de biodiesel e sua amostra enriquecida com *B. subtilis* não apresentaram atividade detectada pelo método colorimétrico. No entanto, nos Tempos anteriores o biodiesel também não apresentou atividade nos ensaios com DCPIP, sugerindo que todo o óleo foi consumido nos 60 primeiros dias de incubação do solo, ou seja, Tempo 0 e 1.

Figura 21 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 240 dias (Tempo 4), nos tratamentos Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (BI), Diesel e *B. subtilis* (DI), Diesel (D), Petróleo e *B. subtilis* (PI), Petróleo (P), Controle (C) e Controle e *B. subtilis* (CI).

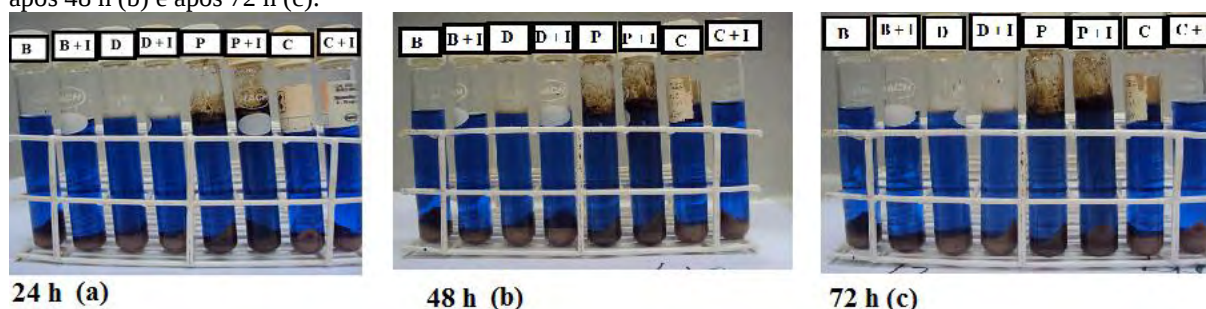


Fonte: autoria própria

Para o petróleo e o diesel após 240 dias de incubação não foi possível detectar atividade através dos ensaios com DCPIP. Neste caso é possível que apenas os compostos recalcitrantes do petróleo e diesel estejam presentes na amostra de solo devido à dificuldade dos micro-organismos em degradá-los. Os estudos de Das e Mukherjee (2006) também relatam a pequena biodegradação do petróleo por micro-organismos nativos, por outro lado a linhagem de *B. subtilis* adicionada ao solo foi muito eficiente na biodegradação dos hidrocarbonetos, ao contrário dos resultados deste estudo.

Na Figura 22 nenhuma amostra tornou-se incolor e mesmo após 240 dias de incubação grande parte do petróleo ainda estava presente nas amostras de solo como pode ser observado na parte superficial no meio líquido dentro dos tubos utilizados no ensaio.

Figura 22 - Descoloração do DCPIP no intervalo de 72 horas em solo contaminado enterrados durante 240 dias (Tempo 4), nos tratamentos Biodiesel (B), Biodiesel e *B. subtilis* (B+I), Diesel e *B. subtilis* (D+I), Diesel (D), Petróleo e *B. subtilis* (P+I), Petróleo (P), Controle (C) e Controle e *B. subtilis* (C+I). Resultados após 24 h (a) após 48 h (b) e após 72 h (c).



Fonte: autoria própria

Os estudos colorimétricos com DCPIP de Hanson et al. (1993), Mac Cormack e Fraile, (1997), Van Hamme et al. (2000), Roy et al. (2002), Kubota et al. (2008) e Bidoia et al. (2010) relataram a atividade de biodegradação de culturas ou consórcios microbianos. No entanto, é necessário saber qual o comportamento da microbiota autóctone frente à contaminação com micro-organismos, pois há de se considerar que a inoculação de micro-organismos com potencial para biodegradação de hidrocarbonetos pode não apresentar êxito devido a diversas interações as quais o inóculo estará sujeito no ambiente.

Neste contexto, a metodologia adaptada utilizadas neste estudo foi capaz de detectar a atividade dos micro-organismos no solo contaminado principalmente do biodiesel nos primeiros dias de incubação. No solo contaminado com diesel e diesel mais inóculo, também, foi possível detectar uma pequena atividade.

5.5 Óleo residual nas amostras de solo contaminado

A Figura 23 ilustra a remoção do óleo após 6 h no refluxo do extrator de gorduras, bem como, a amostra de solo contaminado com petróleo e ao lado o solo que passou pelo processo de extração de gordura. Foi possível notar que o solo está totalmente livre de óleo.

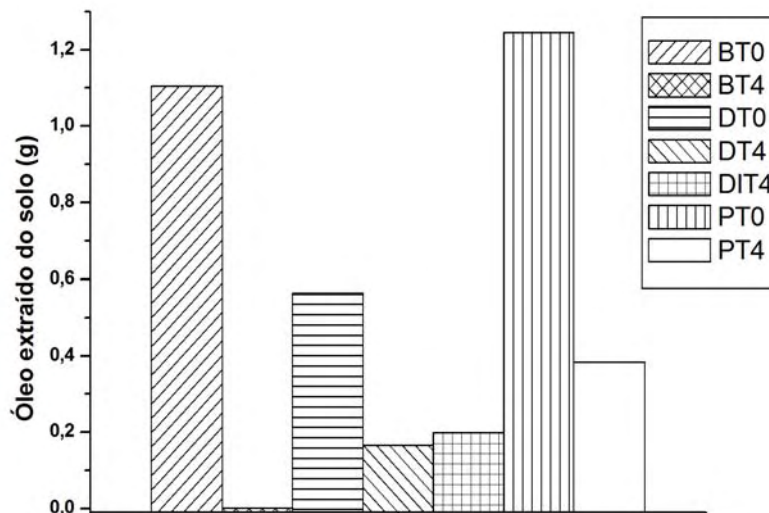
Figura 23 - Solo contaminado com petróleo antes do processo de extração de gordura e o mesmo solo após processo de extração.



Fonte: autoria própria.

O óleo residual que estava presente no solo contaminado no tempo inicial e após 240 dias está representado na Figura 24. O petróleo foi o contaminante em maior quantidade no solo mesmo após 240 dias de incubação do solo contaminado. O diesel apresentou uma pequena quantidade de óleo, após o período de incubação. Como o diesel mais inóculo apresentou mais atividade no teste com DCPIP no Tempo 3. Ao final do experimento (Tempo 4), uma amostra desse contaminante também foi submetida ao teste; no entanto pode-se observar na Figura 24 que a quantidade de óleo extraída foi próxima do diesel sem adição do inóculo. Por fim, apenas 0,001 g de biodiesel foi extraído do solo após o processo de biodegradação.

Figura 24 – Óleo residual do biodiesel, diesel e petróleo no tempo inicial (T0) e no tempo final (T4). O óleo residual do diesel com inóculo no tempo final (T4) também foi extraído. Biodiesel no Tempo 0 (BT0), biodiesel no Tempo 4 (BT4), diesel no Tempo 0 (DT0), diesel no Tempo 4 (DT4), diesel mais *B. subtilis* no Tempo 4 (DIT4), petróleo no Tempo 0 (PT0), petróleo no Tempo 4 (PT4).



Fonte: autoria própria.

Através desse resultado foi possível concluir que o biodiesel foi mais biodegradável que o diesel e petróleo. No entanto, houve uma pequena biodegradação do diesel e do petróleo após o período de incubação. O diesel enriquecido com *B. subtilis* apesar de ter apresentado atividade no teste com DCPIP superior a amostra sem inóculo, ao final do experimento as duas amostras de solo contém quantidades de óleo aproximadas.

No Tempo 4 não havia biodiesel no solo como pode ser observado na Figura 24. Aliado a este resultado, os ensaios com DCPIP também não apresentaram atividade para o solo contaminado com biodiesel no Tempo 4, baseado nesses dados foi possível concluir que o biodiesel foi biodegradado.

5.6 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no solo no T4 (240 dias)

Após o período de incubação, as placas foram analisadas e observadas quanto ao número de UFC em cada uma das réplicas para obter a média de UFC levando em consideração o fator de diluição. Os dados obtidos no plaqueamento estão registrados na Tabela 12. O solo contaminado com biodiesel foi o que apresentou a maior quantidade de UFC para fungos.

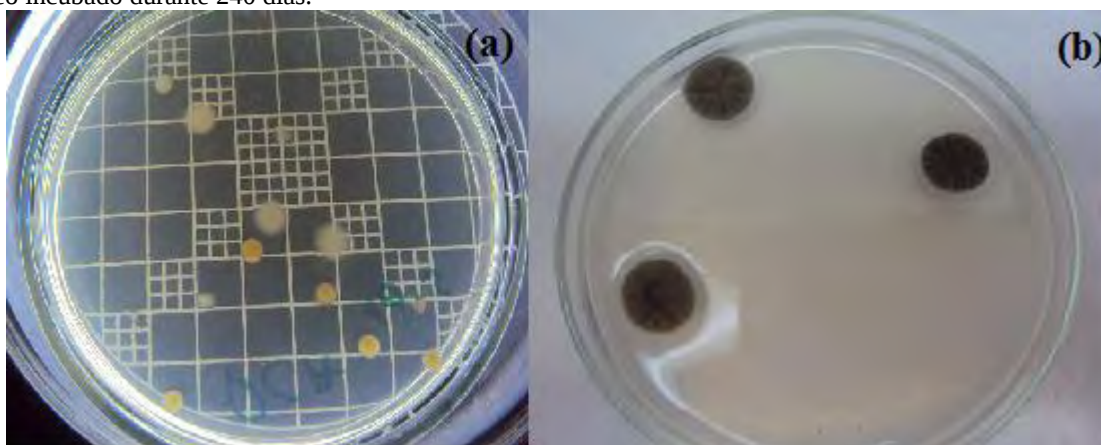
Tabela 12 - Contagem de micro-organismos do solo controle e contaminado após 240 dias de incubação

Meios	Controle	Biodiesel	Diesel	Petróleo
PCA	4×10^5	$14,5 \times 10^5$	10×10^5	$11,5 \times 10^6$
PDA	1×10^3	$24,4 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$

Fonte: autoria própria

Pelo plaqueamento pode-se notar que o número de UFC no controle foi menor do que no solo com o contaminante, pois a areia é um solo com pouca matéria orgânica, assim o contaminante foi uma fonte de carbono para que os micro-organismos se desenvolvessem e aumentasse a biomassa microbiana no solo. A Figura 25 (a) e 25(b) ilustra as colônias de bactérias e fungos, respectivamente, encontradas no solo contaminado com petróleo.

Figura 25 - Colônias de bactérias (a) e fungos (b) observadas na contagem de UFC no solo contaminado com petróleo incubado durante 240 dias.



Fonte: autoria própria

Os contaminantes utilizados neste estudo afetaram o desenvolvimento da plântula, porém nem sempre a resposta frente ao contaminante foi igual para as três espécies de sementes submetidas aos ensaios, possivelmente, devido às diferenças entre essas sementes, como por exemplo, a reserva energética que garante o desenvolvimento da plântula até que ela possa obter recursos do ambiente, a casca da semente que confere proteção contra condições ambientais desfavoráveis e as diferenças quanto à absorção e translocação dos contaminantes nas plântulas (ADAM e DUNCAN, 2002; BELL, 1992; BEWLEY, 1997).

O solo contaminado com diesel no Tempo 1 evidencia a diferença entre a sensibilidade das três espécies submetidas ao ensaio (Figuras 5c e 5d; 7c e 7d; 8c e 8d). O pepino apresentou maior inibição no desenvolvimento da raiz (97%) e hipocótilo (99%), seguido pela

alface com inibição da raiz de 82% e do hipocótilo de 87%. No entanto, o desenvolvimento da raiz de rúcula no solo com diesel não foi influenciado apresentando apenas 4% de inibição e o hipocótilo apenas 48% de inibição. Essa diferença de sensibilidade entre as sementes também foi descrito por Tang et al. (2011), segundo esses autores essa diferença na sensibilidade pode estar relacionada com as diferentes formas que o contaminante é absorvido pelas raízes. No entanto, no solo contaminado com biodiesel todas as sementes submetidas ao ensaio tiveram respostas similares, apresentando inibição do desenvolvimento em solo recém-contaminado, porém essa inibição diminuiu após 240 dias de biodegradação e em alguns casos passou a estimular o crescimento da raiz ou do hipocótilo das espécies submetidas ao bioensaio.

O solo do Tempo 1 contaminado com biodiesel foi tóxico para o desenvolvimento das sementes e altamente ativo nos testes colorimétricos devido a biodegradação. Neste caso um dos fatores relacionados a inibição pode ser devido à acidez do biodiesel quando adicionado ao solo (pH = 4,99). No entanto, após o período de biodegradação o pH do solo contaminado com biodiesel foi 6,3 e neste período não houve toxicidade que interferisse no desenvolvimento das sementes.

Os resultados dos testes com DCPIP nos Tempos 2, 3 e 4 não apresentaram alta atividade no solo contaminado com biodiesel. Deste modo, pode-se inferir que o biodiesel foi totalmente biodegradado em 120 dias e, portanto, não houve nenhuma atividade nos tempos subsequentes. Diante dos resultados obtidos nos ensaios de fitotoxicidade, óleo residual, teste colorimétrico e contagem de UFC, permitiram concluir que o biodiesel foi biodegradado e consequentemente a diminuição da toxicidade foi alcançada.

Quanto à biodegradação pode-se perceber que o solo contaminado com diesel e diesel mais *B. subtilis* nos Tempos 0 e 1 tiveram uma pequena atividade de biodegradação. Este resultado pode estar relacionado à biodegradação de frações do diesel de fácil biodegradação, como os alcanos (ATLAS, 1995).

No Tempo 3 foi observado alta atividade do solo diesel enriquecido com *B. subtilis* (Figura 19). Este foi o único ensaio no qual pode-se perceber evidentemente a diferença da atividade entre as amostras com e sem inóculo. Deste modo, pode-se inferir que o inóculo de *B. subtilis* levou 180 dias para se ajustar as diversas interações com outros micro-organismos do ambiente e assim apresentar maior atividade em relação à amostra sem inóculo. Contudo, após 240 dias pouca atividade foi detectada no teste com DCPIP para os solos com diesel. Além disso, os resultados do óleo residual revelaram que parte do óleo ainda estava no solo,

sugerindo que os micro-organismos não foram capazes de biodegradar totalmente o óleo diesel.

O solo contaminado com petróleo teve uma pequena atividade, no entanto em nenhum dos ensaios, a atividade microbiana foi suficiente para tornar o meio incolor. Assim, o teste de óleo residual revelou que dentre os contaminantes o petróleo foi aquele com maior quantidade no solo mesmo depois de 240 dias em contato com micro-organismos do solo (Figura 24). A dificuldade dos micro-organismos em biodegradar o petróleo pode estar relacionada à presença de HAP com vários anéis aromáticos que compõem o petróleo, como anteriormente descrito por Atlas (1995) e Nwaogu et al. (2008). Portanto, fatores como alta porcentagem de inibição das sementes, ausência de atividade nos testes colorimétricos e grande quantidade de óleo presente no solo após o período de incubação permitiram concluir que o petróleo não foi biodegradado consideravelmente e a toxicidade continuou alta para a maioria das sementes.

A raiz de *L. sativa* foi o bioindicador que apresentou relação da toxicidade com o período de incubação do solo contaminado com biodiesel e biodiesel enriquecido com *B. subtilis*, evidenciados pela redução gradativa na toxicidade (Figura 9). Por outro lado, esta relação foi encontrada para a raiz de *C. sativus* em solo contaminado com diesel mais *B. subtilis* e também no solo contaminado com biodiesel (Figura 10). Para os dois parâmetros pode-se observar que a toxicidade do diesel e do biodiesel diminui, demonstrada pela baixa ou nenhuma inibição da raiz. Deste modo as raízes de *L. sativa* e *C. sativus* podem ser aplicadas em ensaios de fitotoxicidade em solo contaminado com biodiesel e apresentar resultados melhores para monitorar o processo de biorremediação.

6 CONCLUSÃO

A adaptação do método colorimétrico com o DCPIP foi adequada para estimar a atividade de biodegradação no solo na presença do biodiesel, diesel e petróleo, principalmente o biodiesel.

O biodiesel apresentou maior biodegradação quando comparado com óleo diesel e petróleo e menor toxicidade depois de 240 dias.

O diesel e o petróleo não foram totalmente biodegradados em comparação ao biodiesel.

A adição do *B. subtilis* não alterou a biodegradação dos contaminantes nem a toxicidade em relação à amostra sem o inóculo.

O solo contaminado com petróleo foi fitotóxico para *E. sativa* e *L. sativa* e apresentou baixa atividade na descoloração do teste colorimétrico com o DCPIP.

As raízes e hipocótilos de *E. sativa* apresentaram respostas não conclusivas de fitotoxicidade em relação ao diesel, biodiesel e petróleo.

As raízes de *L. sativa* e de *C. sativus* foram os melhores bioindicadores para monitorar a fitotoxicidade do solo contaminado com biodiesel.

A análise de óleo residual mostrou que o petróleo foi o menos biodegradável seguido do diesel. E o biodiesel sendo, consideravelmente, o mais biodegradável.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC, **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 18 edição, 2006. Maryland, Gaithersburg.

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

ALEF, K. Dehydrogenase activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. Michigan : Academic Press, 1995. p. 228-230.

ALEXANDER, R. R.; CHUNG, N.; ALEXANDER, M. Solid-phase genotoxicity assay for organic compounds in soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, p. 420–425, 1999.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. **Scientia Agricola**, v.62, p. 286-290, 2005.

ATLAS, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 178-182, 1995.

ATLAS, R. M., BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. 4ed. Benjamin/Cummings Publishing, Menlo Park, 1998.

BAKER, J. M. The effects of oils on plants. **Environmental Pollution**, v. 1, p. 27-44, 1970.

BANKS, M. K.; SCHULTZ, K. E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 167, p. 211–219, 2005.

BENTO, D. M. **Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS**. 2005. 112f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) – Universidade Federal do Rio Grande – Rio Grande do sul.

BELL, R. M. Higher plant accumulation of organic pollutants from soils. USEPA, 1992.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, v. 9, p 1055-1066, 1997.

BIDOIA, E. D.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. In: **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 2, A. Méndez-Vilas, p. 1277-1288, 2010.

BRASIL, MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, Resolução nº 2, de 13 de março de 2008.

CARAVACA, F.; ROLDÁN, A. Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. **Geoderma**, v. 17, p. 53-61, 2003.

CAO, B.; NAGARAJAN, K.; LOH, K. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85 p. 207-228, 2009.

COOPER, D. G. MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. v. 42, p. 408-412, 1981.

CRUZ, J. M.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Atividade microbiana como bioindicadores de toxicidade ambiental. **Microbiologia in Foco**, v. 17, p. 25-28, 2011.

CRUZ, J. M. **Avaliação dos parâmetros ecotoxicológicos em areia contaminada com derivados de petróleo e biodiesel**. 2010. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Norte do Paraná: [s.n.].

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

DAS, K.; MUKHERJEE, A. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1339-1345, 2006.

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

DIFCO. **Difco Manual**. Difco Laboratories, Detroit, 1984.

DORN, P. B.; VIPOND, T. E.; SALANITRO, J. P.; WISNIEWSKI, H.L. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox[®], and plants. **Chemosphere**, v.37, n.5, p. 845-860, 1998.

DORN, P. B.; SALANITRO, J. P.; Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. **Chemosphere**, v.40, p. 419-426, 2000.

ESSIEN, O. E. JOHN, I. A. Impact of crude-oil spillage pollution and chemical remediation on agricultural soil properties and crop growth. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 14, p. 147-154, 2010.

FANGRUI, M.; MILFORD, A. H. Biodiesel production: a review. **Bioresource Tecnology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

FOSTER, J. Determination of soil pH. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. Michigan : Academic Press, 1995. p. 228-230.

FUENTES, A.; LLORÉNS, M.; SÁEZ, J.; AGUILAR, M. I.; ORTUÑO, J. F.; MESEGUER, V. F. Phytotoxicity and heavy metals speciation of stabilised sewage sludges. **Journal of Hazardous Materials**, v. A108, p. 161-169, 2004.

GERBERG, R. M.; CARROQUINO, M. J.; FICHER, D. E.; DAWSEY, J. Biomonitoring of toxicity reduction during in situ bioremediation of monoaromatic compounds in groundwater. **Water Research**, v. 29, n. 2, p. 545-550, 1995.

GYURICZA, V.; FODOR, F.; SZIGETI, Z. Phytotoxic effects of heavy metal contaminated soil reveal limitations of extract-based ecotoxicological tests. **Water Air Soil Pollution**, v. 210, p. 113-122, 2010.

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.

HUBÁLEK, T.; VOSÁHLOVÁ, S.; MATĚJŮ, V.; KOVÁČOVÁ, N.; NOVOTNÝ, C. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: a case study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, p. 1-7 2007.

HUTCHINS, S. R.; SEWELL, G.; KOVACS, D.; SMITH, G. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. **Environmental Science Tecthonology**, v. 25, p. 68-76, 1991.

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

JENNINGS, E. M.; TANNER, R. S. Biosurfactant-producing bacteria found in contaminated and uncontaminated soils. In: **Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research**, p. 299-306, 2000.

JUVONEN, R.; MARTIKAINEN, E.; SCHULTZ, E.; JOUTTI, A.; AHTIAINEN, J.; LEHTOKARI, M. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 156-66, 2000.

KAPLAN, C. W; KITTS, C. L. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1777-1786, 2004.

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.

KUBOTA, K.; KOMA, D.; MATSUMIYA, Y.; CHUNG, S.; KUBO, M. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. **Biodegradation**, v. 19, p. 749-757, 2008.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

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

LI, X.; FENG, X.; SAWATSKY, N. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. **Plant and Soil**, v. 192, p. 219–226, 1997.

LIU, S.; SUFLITA, J. M. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. **Trends in Biotechnology**, v. 11, p. 344-352, 1993.

LOBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. da. Biodiesel: quality parameters and analytical methods. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, 2009.

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

LYNCH, J. M.; WISEMAN, A.; DE LEIJ, F. A. A. M. Ecotoxicology. In: **Encyclopedia of Biodiversity**. San Diego: Academic Press, p. 363-373, 2011.

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

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MARGESIN, R.; SHINNER, F. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2660-2664, 1997.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162 f. Tese (doutorado em Microbiologia Aplicada) – Rio Claro– Universidade Estadual : [s.n.].

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

MÁRQUEZ-ROCHA, F. J.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, V.; LAMELA, M. T. Biodegradation of diesel oil in soil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 128, p. 313-320, 2000.

MARWOOD, T. M.; KNOKE, K.; YAU, K.; LEE, H.; TREVORS, J. T.; SUCHORSKI-TREMBLAY, A.; FLEMMING, C. A.; HODGE, V.; LIU, D. L.; SEECH, A. G. Comparison of toxicity detected by five bioassays during bioremediation of diesel fuel-spiked soils. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 13, p.117-126, 1998.

MEIER J. R.; CHANG, L. W.; JACOBS, S.; TORSELLA, J.; MECKES, M. C.; SMITH, M. Use of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of soil from a site contaminated with polychlorinated biphenyls. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 928-938, 1997.

MIHELICIC, J. R.; LUTHY, R. G. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1182-1187, 1988.

MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, L. G. S.; SÉRVULO, E. F. C.; CARVALHO, D. D. **Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização surfatantes**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

MORALES, G. C. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. México: IMTA, 2004. 189 p.

MONTAGNOLI, R. N. **Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 2011. 245 f. dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Rio Claro – Universidade Estadual : [s.n.].

MUNZUROGLU, O.; GECKIL, H. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 203-13, 2002.

NWAOGU, L. A.; ONYEZE, G. O. C.; NWABUEZE, R. N. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1939-1943, 2008.

NUNES-HALLDORSON, V. S.; STEINER, R. L.; SMITH, G. B. Residual toxicity after biodegradation: interactions among benzene, toluene, and chloroform. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, 162–167, 2004.

OGBO, E. M.; TABUANU, A.; UBEBE, R. Phytotoxicity assay of diesel fuel-spiked substrates remediated with *Pleurotus tuberregium* using *Zea mays*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v.3, n. 2, p. 12-16, 2010.

PLAZA, G.; NALEEZ-JAWEKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R. L. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**, v. 59, p. 289-296, 2005.

PLAZA, G. A.; JANGID, K.; LUKASIK, K.; NALECZ-JAWECKI, G.; BERRY, C. J.; BRIGMON, R. L. Reduction of petroleum hydrocarbons and toxicity in refinery wastewater by bioremediation. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, p. 329-333, 2008.

RONCO, A.; BAEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Conceptos Generales. In: MORALES, G. C. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. Mexico: IMTA, 2004. p. 71-79.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo. In: SILVA, C. M. S.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; SANHUEZA, R. M. V.; FRIGHETTO, R. T. S. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariuna: Embrapa, 1997. p. 307-328.

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

SANCHES, R. J. **Seleção de micro-organismos com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos e biodiesel**. 2009. 66f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro: [s.n.].

SESSITSCH, A.; WEILHARTER, A.; GERZABEK, M. H.; KIRCHMANN, H.; KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.9, 2001.

SIDDIQUI, S.; ADAMS, W. A.; SCHOLLION, J. The phytotoxicity and degradation of diesel hydrocarbons in soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 164, p. 631-635, 2001.

SISINNO, C. L. S.; RIZZO, A. C. L.; BULUS, M. R. M.; ROCHA, D. A.; SORIANO, U. A.; VITAL, R. L.; MOREIRA, J. C. Application of ecotoxicological tests in a preliminary evaluation of soils treated on bioreactor. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n.2, p. 157-161, 2007.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: MORALES, G.C. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. Mexico: IMTA, 2004. p.142.

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, p. 951-956, 2012.

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

US ARMY CORPS OF ENGINEERS, Environmentally Acceptable Lubricants. In: **Engineering and Design - Lubricants and Hydraulic Fluids**, 1999.

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

VAAJASAARI, K.; JOUTTI, A.; SCHULTZ, E.; SELONEN, S.; WESTERHOLM, H. Comparisons of terrestrial and aquatic bioassays for oil-contaminated soil toxicity. **Journal of Soils and Sediments**, v. 2,n. 4, p. 194-202, 2002.

VAN GESTEL, C. A. M.; VAN DER WAARDE, J. J., DERKSEN, J. G. M.; VAN DER HOEK, E. E., VEUL, MARTIN, F. X. W., BOUWENS, S.; RUSCH, B.; KRONENBURG, R.; STOKMAN, G. N. M. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1438-1449, 2001.

VAN HAMME, J. D.; ODUMERU, J. A.; WARD, O. P. Community dynamics of a mixed-bacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46: p.441–450, 2000.

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

ZHANG, X.; PETERSON, C. L.; REECE, D.; HAWS, R.; MOLLER, G. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of the ASAE**, v. 41, p.1423-1430, 1998.

ZÍLIO, E. L.; PINTO, U. B. Identificação e distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos petróleos brasileiros. **Boletim Técnico Petrobras**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 21-25, 2002.

WANG, X. SUN, C.; GAO, S.; WANG, L.; SHUOKUI, H. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. **Chemosphere**, v. 44, p. 1711-21, 2001.