

Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

Avaliação da toxicidade de solo contaminado com óleo lubrificante usado remediado por
surfactante químico e *Pseudomonas aeruginosa* LBI

Paola Legnaro Volpi Falco

Rio Claro (SP)

2011

PAOLA LEGNARO VOLPI FALCO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE SOLO
CONTAMINADO COM ÓLEO LUBRIFICANTE USADO
REMEDIADO POR SURFACTANTE QUÍMICO E
Pseudomonas aeruginosa
LBI**

*Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto
de Geociências e Ciências Exatas, Campus de Rio
Claro (SP), da Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau
de Engenheiro Ambiental.*

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Rio Claro (SP)
2011

628.55 Falco, Paola Legnaro Volpi
F181a Avaliação da toxicidade de solo contaminado com óleo lubrificante
usado remediado por surfactante químico e *Pseudomonas aeruginosa* LBI /
Paola Legnaro Volpi Falco. - Rio Claro : [s.n.], 2011
48 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Engenharia Ambiental)
- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências
Exatas
Orientador: Jonas Contiero
Co-Orientador: Paulo M. Lopes

1. Solos – Poluição. 2. Desidrogenase. 3. Óleo lubrificante. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha família. Aos meus pais pela educação recebida, por todas as oportunidades que me proporcionaram e ainda proporcionam, pelo carinho e dedicação. Graças ao seu apoio e incentivo pude chegar até aqui e ser quem eu sou. Aos meu irmão e irmã que como dizem, não escolhemos, mas mesmo que pudesse não escolheria outros. Obrigado por todos os momentos que passamos juntos!

Em segundo lugar gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Jonas Contiero por ter aceitado ser meu orientador.

Não menos importante, agradeço também ao Paulo Lopes, co-orientador por todo conhecimento que me passou, pela paciência, ajuda e orientação ao longo da pesquisa, desde o preparo dos experimentos até o último ponto desse texto.

Agradeço também a todos do laboratório de microbiologia do Departamento do Instituto de Biociências que contribuíram de alguma forma para este trabalho. Especialmente agradeço a Roberta e ao Siddharta, pois foi através deles que tive contato com esse tema e ramo de pesquisa.

Agradeço com certeza a turma 007 da Engenharia Ambiental, as “30 almas gêmeas”, que conseguiu estressar até o mais calmo dos docentes, que descobriu seixos caídos, cantou ao som de um violão, que viu a luva do poder e descobriu que bicicletas podem subir árvores! Não foi uma vivência sempre fácil, mas foi sem dúvida única e inesquecível!

Não poderia deixar de demonstrar meu carinho pela República Cafofo e agregadas, meninas que me acompanharam até aqui e com certeza marcaram minha vida! Obrigada por cada momento, risadas, desabafos e conselhos! A minha segunda família nesses últimos 5 anos.

Por fim, agradeço à Rep. Vuco-Vuco, por também ter me acolhido! Agradeço especialmente o Felipe (Mozilla), meu namorado, pelo carinho, companheirismo, muita paciência e apoio em minhas decisões.

RESUMO

Petróleo e seus derivados são considerados uma ameaça à qualidade do meio ambiente devido aos acidentes ambientais ocorridos durante os processos de exploração, transporte, refino e armazenamento. Uma técnica comumente utilizada na remediação de áreas contaminadas é o uso de surfactantes (tensoativos), principalmente os de origem química, utilizados em razão de possuírem baixo custo de produção. Por outro lado, existem também alguns microrganismos que se demonstraram capazes de produzir metabólitos tensoativos que emulsificam a substância e proporcionam maior superfície de contato para a ação degradadora pela microbiota. Estes biosurfactantes se destacam em relação aos surfactantes químicos por possuírem menores valores de concentração micelar crítica (CMC), serem mais tolerantes a alterações de temperatura e pH, pela sua maior biodegradabilidade, baixa toxicidade, alto índice de emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos. Neste contexto, tem-se que, após a aplicação de compostos tensoativos na restauração da qualidade ambiental, faz-se necessária uma avaliação toxicológica do meio. Em solo, a análise da atividade de algumas enzimas microbianas representa uma importante ferramenta para estabelecer o comportamento ambiental perante a substância contaminante sob diferentes condições de tratamento. A desidrogenase é um exemplo de enzima microbiana capaz de representar indiretamente o efeito do poluente nos microrganismos presentes no solo contaminado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do meio, após adição de um surfactante químico e/ou inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI, no tratamento de solo contaminado com óleo lubrificante automotivo usado. A bactéria citada é potencialmente produtora de biosurfactantes (ramnolipídeos). O método de avaliação da toxicidade foi realizado através da determinação da atividade desidrogenásica, no qual o composto trifeniltetrazólio (TTC), utilizado como aceptor de elétrons se transforma em trifênil formazan (TPF), que pode ser quantificado indiretamente a partir de leitura no espectrômetro UV-visível. Assim foi possível medir a atividade da enzima desidrogenase das amostras de solo contaminando em dois tempos: zero e após 134 dias de biodegradação. Os resultados demonstraram que o uso de detergente químico não afetou a atividade dos microrganismos do solo no tempo zero, mas o uso do inóculo de *P. aeruginosa* apresentou maior atividade após 134 dias. Por outro lado, o tratamento com aplicação de ambos (detergente químico e bactérias) não foi vantajoso.

Palavras-chave: desidrogenase, toxicidade, *Pseudomonas aeruginosa* LBI, solo, óleo lubrificante.

ABSTRACT

Petroleum and its subproducts are considered a threat for the environmental quality because of the many environmental accidents that may occur during exploitation, transport and storage. A common remediation technique used in the contaminated areas is based on the use of surfactants, mainly the chemical ones, because they have low production costs. In the other hand, some microorganisms have indicated capacities of producing surfactants that emulsify substances and as result, offer a bigger contact surface for the microbiota degradation. This biosurfactants stand out in comparison with the chemical surfactants because they present lower micellar concentration values, are more tolerant for temperature and pH variation, because they are biodegradable, have low toxicity, higher emulsification and hydrocarbon solubilization index. In this way, after the surfactant application, a toxicity evaluation have to be made to identify the treatment effects. In soil, the activity of some microbial enzymes can show the environmental behavior of the contaminant under different treatment conditions. Dehydrogenase is one example of those enzymes that can demonstrate indirectly the effect of the pollutant on the soil microorganisms. The aim of this paper was to evaluate the toxicity after the addition of a surfactant and/or *Pseudomonas aeruginosa* LBI in soil contaminated by a mineral automotive lubricant. The previous mentioned bacteria are a potential biosurfactant (rhamnolipid) producer. In order to evaluate the toxicity, the dehydrogenase test was run. In this test, trifeniltetrazolium compound (TTC) after utilized as an electron acceptor, turns into trifenil formazan (TPF), that can be indirectly quantified using the absorbance measured by the spectrophotometer UV-visible. In this way, it was possible to quantify the dehydrogenase activity from the contaminated soil samples at zero time and after 134 days of biodegradation. The results indicated that the use of chemical detergent did not affect microbial activity at zero time, but the use of *P. aeruginosa* showed more activity after 134 days. In the other hand, the treatment that used both chemical detergent and bacteria was not beneficial.

Keywords: dehydrogenase, toxicity, *Pseudomonas aeruginosa* LBI, soil, lubricant oil.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes do detergente químico EcoQuímica [®] para o preparo de 1,0 L.....	14
Tabela 2 - Classificação do solo quanto à granulometria.....	15
Tabela 3 – Composição dos ensaios realizados.....	16
Tabela 4 - Valores utilizados para construção da curva padrão da concentração de TPF.....	17
Tabela 5 – Médias da concentração de TPF (mg L ⁻¹) nos ensaios realizados.....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Redução do TTC (trifeniltetrazolium clorídrico) a TPF (trifenil formazam) na análise da atividade da enzima desidrogenase (NANNIPIERI et al., 1990).....	10
Figura 2 - Estrutura química da molécula de ramnolipídeo.....	11
Figura 3 - Atividade desidrogenásica nos diferentes tempos de biodegradação para os ensaios realizados.....	18

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVO.....	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1.	O solo e os microrganismos.....	4
3.2.	O petróleo e seus derivados como fonte de contaminação	5
3.3.	Biorremediação	7
3.4.	Ecotoxicidade.....	8
3.5.	Surfactantes vs. Biossurfactantes	10
4.	MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1.	Material	13
4.1.1.	Solo	13
4.1.2.	Óleo Lubrificante	13
4.1.3.	Meios de cultura.....	13
4.1.4.	Microrganismo	13
4.1.5.	Surfactante Químico	13
5.	Preparo das soluções	15
5.1.	Tampão tris-HCl	15
5.1.1.	TTC - Trifeniltetrazolium clorídrico.....	15
5.1.2.	Detergente Químico	15
5.2.	Análises do solo	15
5.2.1.	Granulometria	15
5.2.2.	pH.....	16
5.3.	Ensaio.....	16
5.3.1.	Enterro dos ensaios	16
5.4.	Atividade desidrogenásica	16

6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6.1.	Análises do solo	18
6.2.	Atividade desidrogenásica	18
7.	CONCLUSÕES	24
8.	RECOMENDAÇÕES	25
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
10.	APÊNDICES	33

1. INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados têm usos recorrentes nas mais diversas atividades e para diversos fins em todas as partes do mundo. Sua produção, centrada em apenas alguns locais, obriga esse bem valioso a ser transportado por grandes distâncias, por terra ou mar, sendo que em algumas vezes acidentes no percurso acontecem, resultando em um grande desastre ecológico e ambiental.

Não apenas grandes acidentes são responsáveis pela poluição e contaminação por hidrocarbonetos. Em uma escala menor, postos de combustível, mecânicas, centros de lubrificação, equipamentos de mecanização agrícola e outros estabelecimentos que utilizam esses produtos e subprodutos podem se tornar uma fonte perigosa de contaminação, com uma contribuição menor, porém contínua, advinda de pequenos vazamentos (MORGAN e WATIKINSON, 1989). Nesses locais o manejo incorreto e de forma não segura e a destinação inadequada das embalagens e utensílios que ainda contêm hidrocarbonetos também são fontes de contaminação (LOPES et al., 2008).

Alternativas de tratamento e recuperação ambiental foram desenvolvidas, sendo que em muitas se utilizam produtos sintetizados quimicamente como emulsificantes e detergentes no processo, os chamados surfactantes químicos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Neste contexto, detectaram-se microrganismos capazes de produzir metabólitos que facilitam a degradação do petróleo e derivados (CHAN, 2011; BENICASA, 2002). Assim, fungos, leveduras e bactérias degradadores de petróleo utilizam os hidrocarbonetos como fonte de energia, transformando-os em subprodutos inofensivos ao meio ambiente. A utilização de organismos vivos no tratamento de ambientes contaminados torna a biorremediação uma alternativa mais barata e sustentável (CHAN, 2011; ROSATO, 1997, p. 313).

A microbiota do solo pode degradar uma ampla gama de hidrocarbonetos, mas sua população e atividade são afetadas quando contaminantes tóxicos estão presentes em altas concentrações (YAOHUI SHU et al., 2010).

Os primeiros organismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de energia foram descobertos por volta de 1903. Recentemente, muitas espécies de microrganismos são conhecidas na degradação de hidrocarbonetos e eles podem ser isolados de águas doces, oceanos e também do solo (MIROSLAV et al., 1996).

Atualmete, destaca-se o uso dos surfactantes e biosurfactantes na contenção de derramamento de petróleo em água, na lavagem de solo contaminado com hidrocarbonetos e derivados (“*soil flushing*” e “*soil washing*”) e também na lavagem de tanques de armazenamento de tais produtos, dentre outras tantas aplicações.

Diante do exposto e dentro do contexto deste trabalho, destaca-se a necessidade de métodos que avaliem a qualidade do solo depois do uso dos surfactantes, a fim de se verificar o efeito nas comunidades microbiológicas presentes.

Para verificar os efeitos desses surfactantes no ambiente contaminado com petróleo e derivados, são realizados bioensaios de ecotoxicidade, os quais se tratam de metodologias analíticas que permitem caracterizar a toxicidade desses contaminantes. A exposição de organismos vivos (bioindicadores) a estas substâncias é uma ferramenta valiosa de análise ambiental.

Neste contexto, a atividade enzimática pode ser utilizada para descrever os efeitos de compostos tóxicos sobre a população microbiológica do solo. As enzimas usadas na atividade microbiológica do solo são as hidrolases (fosfatases e ureases) e as oxidoreduases (desidrogenases) (RATSEP, 1991 apud Millioli et al., 2008).

A determinação da atividade desidrogenásica é o método mais comum utilizado para testes de toxicidade enzimática e é baseado na estimativa da taxa de redução de TTC (trifeniletrazilium clorídrico) a TPF (trifenil formazan) nos solos. O TTC funciona como acceptor final de elétrons, sendo, portanto, um dos métodos mais freqüentemente usado para estimar a respiração dos microrganismos no solo (BITTON e KOOPMAN, 1992).

2. OBJETIVO

Avaliar a toxicidade do óleo lubrificante usado em solo antes e após tratamento biológico com adição de *Pseudomonas aeruginosa* LBI e/ou surfactante químico por meio da análise da atividade desidrogenásica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O solo e os microrganismos

O solo é formado através da ação de agentes físicos, químicos e biológicos na rocha matriz e compreende as fases sólidas, líquida e gasosa. Segundo Sparks (2003, p.43), em um solo típico usado para a agricultura a parte sólida do solo corresponde a 50% do volume, os gases correspondem a 20-30% e a água corresponde os outros 20-30%.

A fase sólida compreende 45% de minerais, que variam segundo as características geológicas do local e cuja granulometria definirá a porosidade do solo e de 5% matéria orgânica o húmus, decorrente da decomposição de vegetais e também animais (SPARKS, 2003, p. 43).

Nos interstícios dos grânulos está a fase gasosa, onde pode-se encontrar o oxigênio, gás carbônico, metano, gás sulfídrico e compostos de enxofre e nitrogênio. Todos esses gases competem com a água nos poros e quanto mais líquido presente, menos oxigenado será o solo. Essa distribuição pode mudar rapidamente, de acordo com as condições climáticas e outra gama de fatores (METTING, 1992, p.4), como a compactação do solo e seu uso e ocupação.

As diferentes composições do solo fazem com que suas propriedades físicas variem muito, afetando a microbiota local e dificultando seu tratamento.

A fração biótica do solo diz respeito aos microrganismos que o habitam. Eles metabolizam a matéria orgânica gerando substrato que fará parte da sucessão trófica no ecossistema, sendo responsáveis pela ciclagem de nutrientes, decomposição de compostos orgânicos e fluxo de energia do solo (TORVIK e ØVREAS, 2002).

Eles também têm papel fundamental na eliminação de poluentes ambientais, destacando-se as bactérias, que segundo Morgan e Watkinson (1989) citam em seu trabalho estão presentes na quantidade de 10^6 a 10^9 células por grama de solo.

Morgan e Watkinson (1989) também estabeleceram que a contaminação por hidrocarbonetos, embora tenha um efeito danoso no ambiente, tem pouco impacto na biota do solo, a não ser que grandes quantidades do derrame estejam envolvidas. No contexto da resiliência ambiental, que seria a capacidade do meio em resistir às mudanças, temos que a microflora e fauna do solo respondem à essas mudanças de forma positiva, ajudando na recuperação do ambiente, embora o tempo requerido seja longo (MORGAN e WATKINSON, 1989).

3.2. O petróleo e seus derivados como fonte de contaminação

Uma das maiores fontes de poluição da atualidade é o petróleo. Seja na prospecção, refino ou transporte, o risco está presente. Ainda pode-se citar as áreas próximas as refinarias, oleodutos e tanques de armazenamento de combustíveis em estabelecimentos comerciais (ROSATO, 1997, p. 308).

O petróleo é formado por hidrocarbonetos de diversas tamanhos de cadeias, sendo que a maioria apresenta também enxofre e nitrogênio na sua composição. Seus diferentes componentes são agrupados por frações, caracterizadas pela composição físico-química. (ROSATO, 1997, p. 309).

Um de seus derivados, o óleo lubrificante, também gera preocupação, pois é classificado como perigoso pela legislação brasileira, segundo a NBR-10004/ABNT 2004, e também em outros países. Logo, seu manuseio, armazenamento e destino final devem ocorrer de forma correta e cuidadosa para preservar a saúde humana, a economia e o meio ambiente (BARTZ, 1998).

A utilização dos lubrificantes em processos industriais é vasta a fim de evitar o desgaste de partes móveis das máquinas e equipamentos, sendo, na maioria das vezes, um óleo de origem mineral formulado a partir do petróleo (CONAMA-GMP, 2005). Acerca disto, sabe-se que os óleos lubrificantes podem ser minerais ou sintéticos, sendo que em aplicações em campo os sintéticos são mais rapidamente degradados do que os minerais (HAIGHT, 1994).

Vale ainda ressaltar que o óleo lubrificante torna-se mais tóxico após sua utilização na refrigeração e limpeza de equipamentos automotivos. Posteriormente a este processo, o lubrificante apresenta em sua composição alta concentração de moléculas oxidadas (ácidos orgânicos, cetonas; dioxinas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de viscosidade elevada) e de metais pesados (cromo, cádmio, chumbo e arsênio); portanto, o óleo usado possui risco à saúde e ao meio ambiente devido ao seu potencial carcinogênico (CONAMA-APROMAC, 2005). Além disso, eles são um dos poucos derivados do petróleo que não são totalmente consumidos durante seu uso (GUEDES et al., 2005).

Silveira et al. (2006) detectaram um aumento nas concentrações de cobre, chumbo, ferro, enxofre e níquel no óleo lubrificante após sua utilização. Desses compostos, o enxofre quando em contato com o oxigênio forma óxidos de enxofre que, em contato com a água em altas temperaturas e sob pressão reage com SO_3 , origina o H_2SO_4 , o qual se trata de um ácido altamente corrosivo. Os autores ainda citam que a presença de aditivos ainda não consumidos

soma-se aos outros compostos, tornando difícil a degradação desse contaminante no meio ambiente.

Vazamentos acidentais, falta de manutenção em tanques de armazenamento ou mesmo descartes inadequados do próprio óleo e das embalagens que o continha se qualificam como meio de entrada do óleo no solo, onde este tenderá a se acumular entre as partículas, nos poros, reduzindo a quantidade de oxigênio e permeabilidade da água. A água encontrando obstáculos à sua passagem, tenderá a seguir caminhos menos resistentes, em regiões localizadas, levando à erosão. Misturas de hidrocarbonetos viscosos podem cobrir a superfície das partículas de solo, alterar significativamente as propriedades das ligações entre minerais argilosos presentes e a capacidade de reter água do solo (MORGAN E WATKINSON, 1989).

Depois de lançado no solo, esse óleo infiltra juntamente com a água pluvial, atingindo o lençol freático, poços e corpos d'água. Já nas redes de drenagem de águas residuárias, chegam às estações de tratamento, causando danos nos processos de tratamento e encarecendo o processo (SILVEIRA et al., 2005).

Outros componentes presentes no óleo lubrificante que devem ser ressaltados são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, os HPAs (AVATEC, 2011). Eles apresentam natureza carcinogênica e recalcitrante por serem difíceis de degradar, visto que seus compostos têm maior número de anéis. Assim, tornam-se muito persistentes e inibem a ação dos microrganismos (ATLAS, 1991; MULLIGAN, 2004).

Hidrocarbonetos alifáticos também estão presentes no óleo cru e em outros subprodutos do petróleo. Dentre as generalidades sobre estes compostos têm-se longas cadeias de n-alcanos que são transformadas de forma mais lenta do que compostos de cadeia curta; hidrocarbonetos saturados que são degradados mais rapidamente do que seus análogos insaturados; o grau de ramificações inversamente proporcional a taxa de degradação e, por fim, a recalcitrância comum para compostos alifáticos metilados (WATKINSON, 1989).

Para prevenir maiores danos ambientais, o Conselho Nacional do Meio Ambiente publicou a resolução CONAMA nº 362/2005, que regula as atividades de coleta e recolhimento dos óleos lubrificantes, estabelecendo obrigações e ações coordenadas para evitar ainda mais contaminações. Para que a resolução seja cumprida, o órgão também criou o Grupo de Monitoramento Permanente (GMP), coordenado pelo Ministério do Meio Ambiente (GUSMÃO, 2011).

3.3. Biorremediação

Diante dos problemas advindos da contaminação por hidrocarbonetos e devido a formas de tratamento caras e ineficientes, estudos foram realizados tendo em vista a geração de alternativas físicas, químicas e biológicas mais seguras e que alcançassem melhores resultados (ROCHA et al., 2007).

A biorremediação, que corresponde a um tratamento biológico, vem ganhando destaque dentre as outras, por ser ambientalmente adequada e mais eficiente, possibilitando em alguns casos, a total mineralização do composto contaminante (MARGESIN et al., 2000). Sua utilização pode ser realizada *in situ*, ou seja, no próprio local da contaminação, o que torna o tratamento economicamente viável, pois diminui custos com escavação e disposição *off-site*. Este método possibilita ainda que a remediação seja implantada em áreas construídas, sem grandes desordens. (SKLADANY E METTING, 1992, p.486)

Entretanto, o sucesso da remediação depende da presença de organismos degradadores, do bom uso de suas capacidades e de um ambiente que favoreça seu crescimento. Ademais, a possibilidade dos subprodutos gerados na degradação serem persistentes ou perigosos exige um estudo que verifique quão perigoso este é. Por fim, a crescente demanda técnica no tratamento de ambientes contaminados torna a biorremediação uma importante ferramenta, sendo necessário, estudos prévios para posterior implantação em grande escala. (SKLADANY E METTING, 1992, p.486)

O processo de biorremediação parte do princípio da capacidade dos microrganismos em utilizar os hidrocarbonetos e outros compostos do óleo cru como fonte de energia, reduzindo a concentração destas substâncias no ambiente (ROSATO, 1997, p. 308).

Atualmente, vários gêneros de microrganismos são conhecidos como potenciais degradadores de hidrocarbonetos, tais como: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia* (ROSATO, 1997, p.313).

Como aponta Rosato (1997, p.315), fatores físicos e químicos afetam a biodegradação destes compostos, tais como: a temperatura, que altera a viscosidade do óleo e provoca a volatilização dos componentes; os nutrientes, que são necessários para o crescimento microbiano, destacando-se o nitrogênio, o fósforo e o potássio; o oxigênio, que é necessário na oxidação do substrato; e outros fatores limitantes como a água e o pH.

A microbiota indígena, ou seja, os microrganismos naturalmente presentes no ambiente podem sofrer influência da contaminação com aumento ou diminuição em

biomassa, de acordo com as características do poluente. Quando os microrganismos são positivamente afetados e se adaptam às condições do ambiente, há o crescimento da população e, conseqüentemente, aumento da capacidade degradativa (ROSATO, 1997, p.318).

Essa propriedade, denominada atenuação natural, é de extrema importância, sendo tema de pesquisas em diversas partes do mundo como na organização alemã KORA. Estes cientistas alemães alegam que outras formas de remediação tradicionais apenas transferem o problema (“dig and pump”) ou não são tão efetivas num período de tempo razoável (“pump and treat”), além de apresentar um valor muito alto. Seus novos estudos mostraram que a degradação intrínseca e processos de detenção no local são mais efetivos do que tratamentos induzidos por medidas técnicas (KORA, 2011).

Partindo da lógica da atenuação natural, podemos citar métodos que catalisam o processo, como exemplo: a bioaumentação, quando microrganismos selecionados são adicionados, aumentando a eficiência de degradação intrínseca em um período curto de tempo (SKLADANY e METTING, 1992, p.504); a biosolubilização que solubiliza o contaminante pela adição de surfactantes, aumentando sua área efetiva e favorecendo a ação dos microrganismos (MILLIOLI, 2009); e a bioestimulação, quando nutrientes são utilizados a fim de disponibilizar melhores condições para os organismos já presentes no local (FRANKENBERGER et al., 2004).

Vale ainda ressaltar que o tema já é abordado pela agência americana de proteção ambiental (EPA) na sua legislação (USEPA, 1999).

3.4. Ecotoxicidade

O desenvolvimento de critérios ecotoxicológicos para a avaliação da qualidade do solo é uma importante alternativa, tanto para determinação dos níveis aceitáveis de compostos químicos tóxicos, assim como, para o planejamento e execução de estratégias de processos de biorremediação. A necessidade de remediação de locais contaminados por hidrocarbonetos de petróleo tem aumentado consideravelmente e, associado a este fato, métodos toxicológicos são empregados na análise da eficiência desse tratamento em restabelecer o equilíbrio do ecossistema (CHAPMAN, 1991, apud BARROS, 2007).

A biorremediação de ambientes contaminados com derivados de petróleo geralmente se utiliza de microrganismos na sua decomposição, como demonstrado por Montagnolli et al. (2009). Logo, eles podem ser utilizados como indicadores ambientalmente relevantes da poluição. Assim, investigações biológicas do solo podem dar informações dos efeitos dos

poluentes na sua atividade metabólica e na atividade dos microrganismos, servindo de medida ao impacto da poluição na saúde do solo (VAN BEELEN e DOELMAN, 1996).

Para avaliar os resultados da descontaminação é preciso além de medir os hidrocarbonetos remanescentes no solo, observar também os processos microbiológicos, já que nem todos os contaminantes são mineralizados no curso da biodegradação (JOERGENSEN et al., 1995).

A taxa de degradação do contaminante pode ser estimada por diversos métodos, como medição de aumento de CO₂ ou absorção de O₂, determinação da diminuição da matéria orgânica por perda de peso e aumento da atividade metabólica dos microrganismos (NANNIPIERI et al., 1990). Também, a determinação de efeitos tóxicos pode ser conduzida em relação à microbiota, pela alteração na atividade biológica do solo (ALEF, 1995).

Os testes de toxicidade microbiológicos normalmente aplicados podem ser categorizados como testes de espécies individuais, medidas da biomassa, transformação de carbono e nitrogênio, testes enzimáticos e testes medindo mudanças na diversidade microbiológica (VAN BEELEN e P. DOELMAN, 1996).

Estudos da atividade das enzimas indicam o potencial do solo de realizar processos bioquímicos que são importantes para manter sua fertilidade. O conhecimento da atividade enzimática dá uma idéia das mudanças sofridas pelos substratos e microrganismos durante a evolução da matéria orgânica, segundo Dick e Tabatabai (1993 apud GARCIA, HERNANDEZ, COSTA, 1997).

Enzimas são proteínas que catalisam reações biológicas em animais, plantas e células microbianas já que diminuem a energia de ativação das reações. A relação entre atividade microbiológica e a atividade das enzimas pode ser usada para indicar o efeito tóxico de contaminantes. (BITTON e KOOPMAN, 1992)

O conceito de determinação da atividade metabólica de microrganismos em solo e outros habitats utilizando a atividade desidrogenásica foi introduzido por Lenhard, em 1956 (Garcia et al., 1997). Resultados de estudos posteriores validaram o conceito, como os citados por Jones e Prasad (1969). Seus resultados mostraram que medidas da atividade de uma ou mais enzimas da cadeia respiratória seriam representativas da taxa de energia transferida.

Sistemas desidrogenásicos possuem um nível de especificidade pelo substrato muito característico e parte integrante dos microrganismos, por essa razão eles foram propostos como indicadores da atividade microbiológica do solo (GARCIA et al., 1997).

A maioria dos testes enzimáticos é artificial e se refere ao potencial das enzimas do solo. Estes métodos são realizados através de uma quantidade definida de solo incubado em ambiente aquoso com substrato específico e algumas vezes com uma solução tampão. A enzima converte o substrato específico em outro composto que possa ser extraído e quantificado por espectroscopia, por exemplo (VAN BEELEN E P. DOELMAN, 1996).

A atividade desidrogenásica pode ser estimada pela taxa de redução de TTC (trifeniltetrazolium clorídrico) a TPF (trifenil formazam), como demonstrado na **Figura 1**. O TTC funciona comoceptor de elétrons e, assim, é utilizada para mensurar a atividade da enzima desidrogenase no solo, através da quantificação do composto TPF (BARROS, 2007).

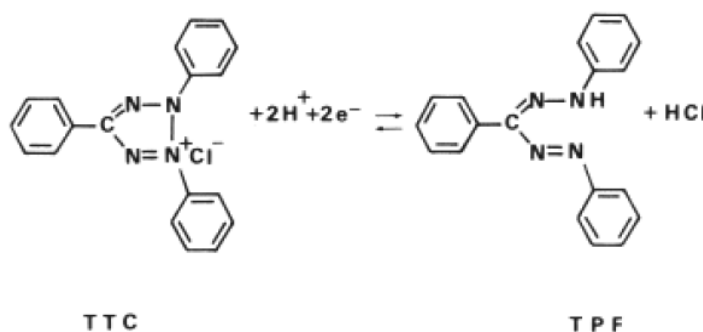


Figura 1 - Redução do TTC (trifeniltetrazolium clorídrico) a TPF (trifenil formazam) na análise da atividade da enzima desidrogenase (NANNIPIERI et al., 1990).

Enfatiza-se que a determinação dessa atividade é simples, econômica e sensível quando comparada a outros indicadores da atividade microbiológica, segundo Garcia et al. (1993 apud GARCIA,HERNANDEZ, COSTA 1997).

3.5. Surfactantes vs. Biosurfactantes

Os surfactantes são compostos anfipáticos, já que são constituídos por um grupo polar (hidrofílico) e um grupo não polar (hidrofóbico). São usados como agentes emulsificantes e floclulantes por diminuírem a tensão superficial, aumentarem a solubilidade, devido ao seu poder detergente e capacidade de formação de espuma. Eles tendem a se distribuir nas interfaces (sólido-líquido, líquido-líquido ou vapor-líquido), concentrando sua parte hidrofóbica na superfície enquanto orientam a hidrofílica em direção a solução (MULLIGAN, 2004). Portanto, em mistura água-substância hidrofóbica, como hidrocarbonetos de petróleo, os (bio)surfactantes promovem a redução da tensão interfacial da mistura, facilitando a ação dos microrganismos na decomposição destes compostos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Alguns exemplos de surfactantes iônicos usados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Já os biosurfactantes são produtos do metabolismo de microrganismos, como bactérias e fungos, e suas principais classificações bioquímicas incluem: glicolipídios, lipossacarídeos, lipoproteínas, lipopeptídios, fosfolipídios e ácidos graxos. A maioria dos biosurfactantes são neutros ou aniônicos variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Entre os glicolipídeos podemos citar os ramnolipídeos (**Figura 2**), que são os biosurfactantes produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas* (MULLIGAN, 2004).

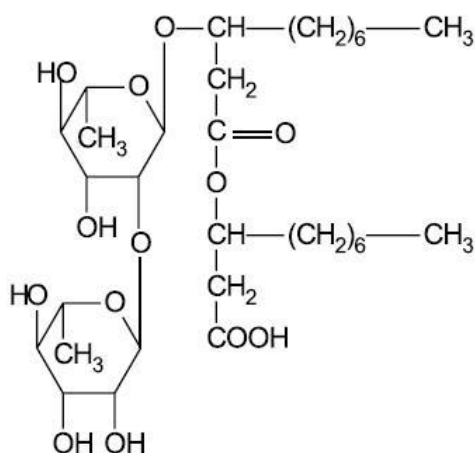


Figura 2 - Estrutura química da molécula de ramnolipídeo (MULLIGAN, 2004)

A espécie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* é comumente encontrada no meio ambiente e pode ser isolada da água, solo e plantas. Além disso, *P. aeruginosa* pode ser um patógeno oportunista do homem ocasionando infecções. Esta espécie foi inicialmente estudada como produtoras de ramnolipídeos por Jarvis e Johnson em 1949 (CHAVÉZ et al., 2005), produzindo o biosurfactante a partir de substratos como C11, C12, alcanos, succinatos, piruvatos, citratos, frutose, glicerol, óleo de oliva e glicose (MULLIGAN, 2004).

As funções naturais dos ramnolipídeos ainda não são bem entendidas, mas Chávez-Soberón et al. (2005), especulam que eles se relacionam com a toxicidade a outros organismos como atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e algumas gram-negativas e outras atividades antivirais, antifúngicas, micoplasmacida, algicida e antiameba.

Os biossurfactantes se destacam em relação aos surfactantes químicos por terem valores mais baixos de concentração micelar crítica (CMC), serem mais tolerantes a alterações de temperatura e pH, pela sua alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e alto índice de emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Urum et al. (2004) ainda citam como vantagens dos biossurfactantes sua biodegradabilidade, a facilidade de serem produzidos por fontes renováveis, sua possível regeneração, alta especificidade e menor toxicidade. Portanto, ao serem utilizados no tratamento de ambientes contaminados, não há a necessidade de remoção posterior ao uso devido a duas importantes características: baixa toxicidade e alta biodegradabilidade.

Os processos de remediação de solo contaminado com petróleo e derivados com surfactantes químicos são relativamente rápidos e vem sendo utilizado há muito tempo. Entretanto, a utilização de biossurfactantes é uma prática relativamente nova (URUM, 2004).

Neste contexto, foi observada uma grande eficácia no processo de remoção de petróleo em solo utilizando os ramnolipídeos. (URUM *et al.*, 2003; URUM e PEKDEMIR, 2004 apud MILLIOLI et al., 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Solo

O solo foi comprado em um estabelecimento comercial de materiais de construção no município de Rio Claro-SP. Todo o solo foi peneirado com uma peneira de malha 1,41 mm, para que o material ficasse homogêneo durante os ensaios.

Assim, foram preparados cinco sacos plásticos, cada um contendo 500 g de solo.

4.1.2. Óleo Lubrificante

O óleo lubrificante automotivo usado foi coletado em um centro de lubrificação no município de José Bonifácio-SP e tratava-se de um óleo lubrificante de origem mineral, marca Helix Shell® (**Apêndice I- Foto 3**).

4.1.3. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram caldo nutriente e ágar nutriente.

Ambos foram preparados dissolvendo 3,0 g de extrato de carne e 5,0 g de peptona em 1 L de água destilada. Entretanto, na composição do meio ágar nutriente foi acrescido ainda 17,0 g L⁻¹ de ágar.

No experimento foram utilizados 50 mL de caldo nutriente para inoculação das bactérias.

4.1.4. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *Pseudomonas aeruginosa* LBI previamente isolada de ambiente contaminado por petróleo (Benicasa et al, 2002).

A bactéria estava estocada em meio ágar nutriente (**Apêndice I- Fotos 1 e 2**) e refrigeradas a aproximadamente 4 °C. A reativação da cultura foi realizada por meio da inoculação de duas alçadas do meio estoque em 50 mL de caldo nutriente estéril, que permaneceu sob agitação de 150 rpm por 24 horas a 30 °C.

4.1.5. Surfactante Químico

O surfactante químico utilizado foi o detergente comercial EcoQuímica® (**Apêndice I- Foto 4**). A composição do surfactante está apresentada abaixo (**Tabela 1**):

Tabela 1 - Componentes do detergente químico EcoQuímica[®] para o preparo de 1,0 L

Composto	Quantidade
Ácido sulfônico 90%	0,060 g
Água Milli-Q	0,885 L
Amida 60%	0,020 g
Cloreto de sódio	0,003 g
Formol inibido	0,006 L
Lauril éter sulfato de sódio	0,015 g
Soda cáustica	0,016 g
Trietanolamina	0,003 g
Uréia técnica	0,010 g

5. Preparo das soluções

5.1. Tampão tris-HCl

O preparo da solução tampão de tris-HCl (tris-[hidroximetil]-aminometano) foi realizado na concentração de 100 mM.

Dissolveu-se 12,1 g de tris-HCl em 700 mL de água destilada. Posteriormente, o pH da solução foi mantido em 7,8 devido ao caráter ácido do solo (ALEF, 1995).

Inicialmente o pH apresentou-se alcalino (10,33), sendo o controle feito através da adição de ácido clorídrico (1,0 M), até a concentração ideal de 7,8 (ALEF, 1995).

5.1.1. TTC - Trifeniltetrazolium clorídrico

A solução de TTC foi preparada diluindo-se 2,0 g de TTC em 200 mL da solução tampão tris-HCl (ALEF, 1995).

5.1.2. Detergente Químico

A concentração de detergente químico comercial utilizado foi de 1,0% p/v. Assim, 0,500 g do detergente EcoQuímica® foi adicionado a 50 mL de água destilada e homogeneizado lentamente.

5.2. Análises do solo

5.2.1. Granulometria

O solo foi analisado no Laboratório de Geotécnica do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE-UNESP, Rio Claro).

A análise granulométrica iniciou-se com o solo permanecendo por 19 h a 25 °C em estufa, sendo macerado após seco para que os grãos ficassem mais soltos. Foram pesados 200 g e colocados no agitador de peneiras por 10 minutos.

As peneiras usadas tinham malhas de #30 (diâmetro de 0,59 mm); de #70 (diâmetro de 0,210 mm) e de #230 (diâmetro de 0,062 mm).

A seguir estão apresentados os intervalos de diâmetros em que os grânulos são classificados, segundo as normas da ABNT NBR 6502/95.

Tabela 2 - Classificação do solo quanto à granulometria

Areia	Intervalo de diâmetros (mm)
Grossa	0,600 – 2,000
Média	0,200 – 0,600
Fina	0,060 - 0,200

5.2.2. pH

Foram pesados 10,0 g de solo e misturados com 25,0 mL de água destilada. A mistura ficou em agitação por 10 minutos, a fim de se obter o pH real do solo (BARROS, 2007).

5.3. Ensaios

Foram preparados cinco ensaios (**Apêndice I- Foto 6**), segundo Lopes e Bidoia (2009) com adaptações. Todos os ensaios continham 500 g de solo e foram realizados em sacos plásticos de 1,0 L. Na **Tabela 3** estão especificados os componentes de cada ensaio.

Tabela 3 – Composição dos ensaios realizados

Ensaio	Água Destilada	Óleo Lubrificante Usado	Surfactante Químico Comercial	Inóculo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	Descrição
E1	50,0	-	-	-	Controle 0
E2	25,0	25,0	-	-	Controle 1
E3	12,5	25,0	12,5	-	Biossolubilização
E4	12,5	25,0	-	12,5	Bioaugmentação
E5	-	25,0	12,5	12,5	Biossolubilização e Bioaugmentação

*quantidades em mL

Foram realizados dois tempos de tratamento para os diferentes ensaios: tempo zero (t_0) e tempo final (t_f), após 134 dias de biodegradação.

5.3.1. Enterro dos ensaios

Os sacos plásticos ficaram enterrados a aproximadamente 15 cm de profundidade do dia 24 de abril de 2011 ate o dia 5 de setembro de 2011 no Jardim Experimental do Instituto de Biociências (IB-UNESP, Rio Claro), por um período total de 134 dias (**Apêndice I- Foto 7**).

5.4. Atividade desidrogenásica

A análise da atividade desidrogenásica foi realizada segundo o método descrito por Alef (1995), e foram realizados para todos os ensaios (E1, E2, E3, E4 e E5) nos dois tempos de biodegradação (inicial e final), totalizando 10 testes em triplicatas.

Para cada teste, foram pesados 5,0 g da amostra de solo, transferidos para frascos de vidro âmbar e adicionados 5,0 mL de solução de TTC (**Apêndice I- Foto 8**). Os testes permaneceram durante 24 h a 30 °C em câmara de germinação B.O.D.

Transcorrido este período de 24 h, foram adicionados 40 mL de metanol em cada frasco e os testes permaneceram sob agitação a 150 rpm durante duas horas a 30 °C.

As amostras foram filtradas a vácuo utilizando papel filtro (**Apêndice I- Foto 9**), separando o solo em suspensão da solução de extração. As amostras de solo filtradas foram descartadas e suas respectivas soluções contendo o TPF extraído com metanol foram transferidas para béqueres para posterior leitura em espectrofotômetro UV-Vis (**Apêndice I- Foto 10**).

Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda de 485 nm para todos os extratos de metanol (testes em triplicatas). Os resultados de concentração de TPF, em g L⁻¹, foram calculados segundo a curva padrão estabelecida por BARROS (2007, pg 43):

$$[TPF] = 0,0229x - 0,00006 \quad \text{com} \quad R^2 = 0,9999$$

Os valores utilizados para a confecção da curva padrão de Barros (2007) podem ser visualizados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Valores utilizados para construção da curva padrão da concentração de TPF

TPF (g/L)	Abs (nm)
0	0
0,01	0,436
0,02	0,887
0,03	1,301
0,04	1,746

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Análises do solo

O solo analisado apresentou as seguintes granulometrias: 10,83% de areia grossa, 68,68% de areia média, 19,17% de areia fina e 1,32% de areia muito fina.

Em relação ao pH, o resultado encontrado foi de 5,4, tratando-se de um solo levemente ácido.

6.2. Atividade desidrogenásica

Na **Figura 3** abaixo estão apresentadas as concentrações de TPF a partir de valores de absorbância lidos no espectrofotômetro UV-Vis para os diferentes ensaios nos tempos inicial (zero) e final (134 dias de biodegradação). Observa-se que os valores foram calculados de acordo com a média dos testes em triplicata (**Tabela 5**) junto ao desvio padrão para cada ensaio realizado. Os valores obtidos dos 15 experimentos realizados, em t_0 e após 134 dias, que foram utilizados para o cálculo da média das triplicatas encontram-se no **Apêndice II**.

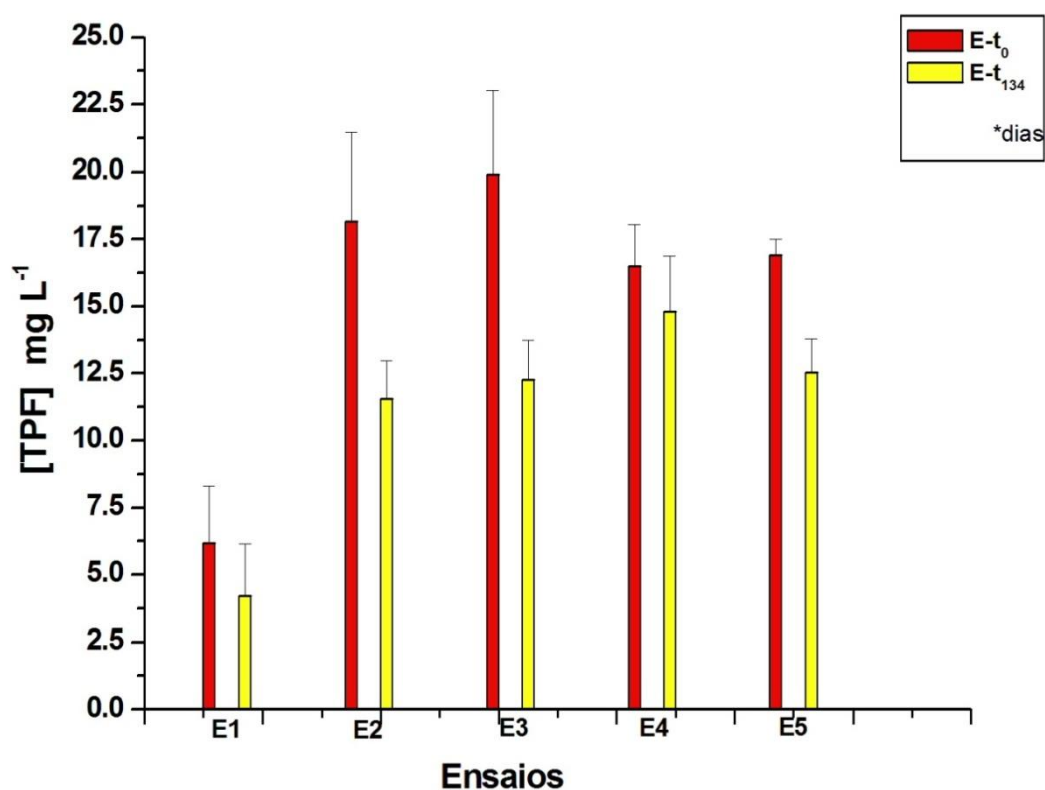


Figura 3 – Atividade desidrogenásica nos diferentes tempos de biodegradação para os ensaios realizados.

Tabela 5 – Médias da concentração de TPF (mg L^{-1}) nos ensaios realizados

ENSAIOS	T ₀	T _{134 dias}
E1	6,12	4,23
E2	18,1	11,56
E3	18,3	12,29
E4	16,45	14,80
E5	16,81	12,48

Em E1 (controle), que continha apenas o solo, o resultado apresentou baixa atividade desidrogenásica tanto inicial, quanto final quando comparadas às atividades dos outros ensaios, mostrando a atividade natural dos microrganismos presentes normalmente no solo (**Tabela 5**).

Na literatura encontram-se dados semelhantes, como o estudo de Millioli (2009) que apresenta um valor de $6,5 \text{ mg L}^{-1}$ de TPF em 24 h para solo virgem.

A diferença de leitura dos valores inicial e final pode indicar o consumo de matéria orgânica do microcosmo do ensaio, já que as amostras foram enterradas em sacos plásticos contendo pequenos furos. Assim, a assimilação das substâncias pelos microrganismos, fez com que elas se tornassem limitadas, impedindo que estes continuassem crescendo.

Em E2 (solo e óleo lubrificante) também foi obtido uma menor atividade desidrogenásica final, quando comparado com o tempo inicial (**Tabela 5**).

Neste caso, como o óleo lubrificante é composto por diferentes moléculas e cada organismo tem a capacidade específica em degradar certas substâncias, o resultado pode ser baseado na capacidade da microbiota presente no solo em metabolizar inicialmente os compostos de fácil assimilação. Assim, as moléculas de difícil biodegradação permaneceram no solo e possivelmente inibiram o posterior crescimento da comunidade microbiana (SATHISHKUMAR et al., 2007; ATLAS, 1995).

Além disso, os subprodutos da biodegradação gerados podem se tornar mais tóxicos que os compostos de origem, afetando a atividade dos microrganismos. Estudos recentes mostram que em alguns casos, o metabolismo microbiano de hidrocarbonetos de petróleo pode produzir metabolitos tóxicos como ácidos naftênicos, que podem dificultar subseqüentes biodegradações devido a sua toxicidade (YAOHUI SHU e MANG LU, 2010). Isso também pode explicar a redução da atividade desidrogenásica encontrada em E2 após 134 dias.

Neste contexto, tem-se que o grau no qual o composto resiste à degradação é chamado de recalcitrância. Essa propriedade é dependente da característica de cada molécula e das condições ambientais (SKLADANY E METTING, 1992, p.487).

Nos ensaios realizados por Frankenberger et al. (2004), utilizando solo contaminado com óleo diesel de duas regiões (China e EUA), foi analisada a atividade desidrogenásica após adição de consórcio microbiano isolado de um dos solos. As análises foram realizadas em 0, 1, 2, 6, 8 e 12 semanas e mostraram aumento das atividades com o passar das semanas. Pequenas flutuações na atividade aconteceram por volta da 6ª semana com posterior aumento e manutenção do valor da atividade. Os resultados não sofreram variação significativa com o aumento do tempo de incubação. Uma hipótese que explica a atividade desidrogenásica ter se mantido crescente vem do fato de que semanalmente as amostras do solo foram umedecidas com água destilada, procedimento não realizado no presente trabalho. Assim, foi possível concluir que houve baixa oxigenação e quantidade de água disponível para que os microrganismos obtivessem condições ótimas. Outro fator de destaque foi o tempo de duração do experimento de 12 semanas, pois a flutuação da atividade desidrogenásica encontrada pode ter representado o início de uma tendência, como observado no estudo de Pereira (2005).

A biodisponibilidade do poluente, ou seja, o grau em que o componente em questão pode ser obtido e utilizado pelos microrganismos (SKLADANY E METTING, 1992, p.494) também se tornou uma hipótese em relação aos resultados obtidos. A biodisponibilidade é restrita quando taxa de consumo pelos organismos é limitada por barreiras físico-químicas entre este e os organismos. Deste modo, se o poluente está dissolvido da água dos poros, adsorvido ou absorvido nas partículas do solo a biodegradação se torna mais difícil (VOLKERING, 1998).

Li et al. (2007) avaliaram a adição de diferentes concentrações de óleo diesel em solo e verificou a atividade desidrogenásica relacionada. Apenas em concentrações mais baixas (500 e 10.000 mg kg⁻¹) e após 110 dias de experimento a atividade final apresentou-se maior que o valor encontrado no tempo inicial. Portanto, os resultados encontrados em E2, com menor atividade desidrogenásica após 134 dias, são corroborados pelos dados por Li et al. (2007).

Igualmente em E3 (solo e surfactante químico), o valor inicial da atividade desidrogenásica foi mais alto que o final, sendo valores muito próximos aos obtidos no ensaio E2 (**Tabela 5**). Desta forma, concluiu-se que a adição do surfactante químico 1,0% p/v, não

obteve efeito na comunidade microbiana, ou seja, não proporcionou maior atividade e nem apresentou toxicidade.

Ainda, a menor atividade final em E3 pode ser explicada em função da pequena biodisponibilidade do óleo sorvido nos interstícios do solo, dificultando sua remoção. Na contaminação inicial (t_0), não houve tempo suficiente para que o óleo fosse sorvido, sendo mais disponível para a ação dos microrganismos (VOLKERING, 1998). Portanto, concluiu-se que a concentração de surfactante químico utilizada não possibilitou a solubilização do lubrificante para maior biodisponibilidade à comunidade microbiana.

Ademais, o óleo lubrificante pode ter sido intemperizado e, com a perda de compostos voláteis, tornou-o com maior peso molecular, maior densidade e maior viscosidade. Desta forma, ocorreu aumento na ligação óleo-solo e nas concentrações de enxofre e metais pesados (URUM et al., 2004). Assim, mesmo com o efeito de solubilização do óleo realizado pelo surfactante, as condições não possibilitaram um resultado positivo na atividade microbiana.

Quanto à atividade inicial, temos que, Millioli (2009) avaliou a variação da atividade desidrogenásica através da adição de diferentes concentrações do surfactante químico SDS (dodecil sulfato de sódio). A autora obteve uma concentração de TPF de 17 mg L^{-1} após 24 h quando utilizado $1,0 \text{ mg g}^{-1}$ de SDS. Para a mesma concentração de surfactante químico, neste trabalho obteve-se valor semelhante (18 mg L^{-1}). Millioli (2009) também concluiu que para concentrações maiores, entre 10 e 15 mg L^{-1} , houve maior atividade desidrogenásica. Logo, uma maior concentração de SDS contribuiu com maior atividade desidrogenásica da comunidade microbiana do solo.

O padrão encontrado de maior atividade desidrogenásica no tempo inicial em relação ao final se manteve nos ensaios com a adição do inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI (E4 e E5). Porém, o valor encontrado após 134 dias em E4 (solo e inóculo de *P. aeruginosa* LBI) foi maior que nos outros ensaios (**Tabela 5**).

De acordo com Yaohui Shu e Mang Lu (2010), a população microbiana pode ter reduzido no decorrer do tempo, pois fatores como nutrição e aeração são mais importantes do que a quantidade de biomassa. Assim, a oxigenação e a disponibilidade de nutrientes foram fatores limitantes na degradação contínua do óleo lubrificante.

Noordman et al. (2002) revelaram que, em solos com poros pequenos e contaminados com hexadecano, o ramnolípídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de disponibilizar o contaminante sorvido. O mesmo pode ter ocorrido com o óleo lubrificante no presente estudo, pois a bactéria *P. aeruginosa* LBI adicionado possivelmente produziu

ramnolipídeos que tornaram o óleo mais disponível para a ação microbiana. Assim, obteve-se maior atividade dos microrganismos no tempo final em E4 em comparação aos outros quatro ensaios realizados.

Millioli (2009) avaliou a variação da atividade desidrogenásica através da adição de diferentes concentrações de dois surfactantes: SDS (químico) e JBR 210 (biosurfactantes). Na concentração de $1,0 \text{ mg g}^{-1}$ de surfactante, a atividade desidrogenásica nos testes com o JBR 210 foi maior. Para a mesma concentração de surfactante químico neste trabalho, foram obtidos valores diferentes, pois não houve a adição de ramnolipídeos e sim do inóculo bacteriano. Desta forma, a baixa atividade encontrada em E4 demonstrou que não houve produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* no tempo inicial devido ao pequeno tempo de contato bactéria-hidrocarboneto.

A atividade desidrogenásica final em E5 (solo, surfactante químico e inóculo de *P. aeruginosa* LBI) se assemelha a atividade final em E3, onde foi usado apenas o surfactante químico (**Tabela 5**). Logo, concluiu-se que o surfactante químico interferiu no crescimento da bactéria adicionada. Estudos de Volkering (1998) evidenciaram diversos surfactantes que causaram inibição no crescimento das bactérias isoladas, confirmando a toxicidade de alguns surfactantes em relação a diferentes espécies microbianas.

Os efeitos tóxicos dos surfactantes nas bactérias se devem ao rompimento da membrana celular, resultado da interação do surfactante com os lipídeos e devido à reação do surfactante com moléculas de proteína essenciais ao funcionamento da célula (JENSEN, 1999 apud LIMA et al., 2011).

Além disso, Volkering (1998) demonstrou que em pH 7,0 ou maior, surfactantes catiônicos são os mais tóxicos para as bactérias, enquanto que os aniônicos tem comportamento mais tóxico em valores de pH mais baixos. Os surfactantes não-iônicos são em geral os menos ativos contra bactérias do que os iônicos.

Em relação ao presente estudo, o detergente químico EcoQuímica[®] utilizado possui em sua composição o lauril éter sulfato de sódio, de caráter aniônico. Assim, pelo solo apresentar-se de caráter ácido, este surfactante pode ter gerado efeito tóxico específico no inóculo de *P. aeruginosa* LBI em E5.

Os resultados referentes ao tempo inicial de E4 e E5 foram semelhantes. Deste modo, a atividade desidrogenásica encontrada nestes ensaios foi resultante da adição do inóculo de *P. aeruginosa* LBI, pois a presença do detergente químico em E5 não proporcionou nenhum efeito.

O mesmo resultado foi encontrado por Auger et al. (1995) utilizando naftaleno e um surfactante não-iônico (octaetilglicol mono n-dodecil éter). Os autores realizaram experimentos com estes compostos na presença de uma cultura de *Pseudomonas*. Seus resultados mostraram que não houve efeito do surfactante no crescimento das bactérias, indicando que a toxicidade está relacionada com a biodisponibilidade do naftaleno.

Em suma, tem-se que os resultados de atividade desidrogenásica para todos os ensaios foram menores no tempo final. Esta redução na atividade dos microrganismos em solo após certo período da contaminação inicial também foi encontrada por Yaohui Shu e Mang Lu, (2010) e Débora Sanchez Pereira (2005).

7. CONCLUSÕES

Concluiu-se por meio dos resultados apresentados que:

- em todos os ensaios a atividade desidrogenásica diminuiu no tempo final após de 134 dias;
- a mistura de inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI e detergente químico na concentração utilizada não mostrou maior eficiência quando comparado ao uso dos dois isoladamente;
- a adição do surfactante químico proporcionou maior atividade desidrogenásica dos microrganismos no tempo inicial quando comparada à adição do inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Contudo, após 134 dias a atividade foi maior no ensaio contendo o inóculo;
- a análise da atividade da comunidade microbiana é um instrumento importante para avaliar o resultado da biorremediação, pois além de se obter a remoção do poluente é importante também que o tratamento não torne as condições ambientais menos favoráveis para que se mantenha a biota do local.

8. RECOMENDAÇÕES

Sugere-se que sejam feitas análises em intervalos menores e também estender o tempo final para que se possa melhor avaliar a taxa de variação da atividade microbiológica e compreender suas limitações.

O estudo de Yaohui Shu e Mang Lu (2010) demonstrou que a adição de microrganismos imobilizados aumentou a eficiência da degradação dos contaminantes. Assim, a utilização de substratos orgânicos na imobilização de células microbianas torna-se uma importante ferramenta para obter maior eficiência de degradação, pois a matriz aumenta a resistência da cultura em condições extremas.

Recomenda-se o uso de culturas isoladas do próprio local contaminado, pois estas já se encontram adaptadas às condições e, assim, podem ser mais eficientes na remoção do contaminante (FRANKENBERGER et al., 2004).

Além da bioaugmentação e biossolubilização, a bioestimulação também pode ser realizada a fim de avaliar especificamente os fatores limitantes à atividade da comunidade microbiana presente no local onde os ensaios serão enterrados. Segundo MARGESIN et al. (2000), a bioestimulação do solo usando fósforo e nitrogênio melhorou a eficiência na degradação de hidrocarbonetos quando a falta de nutrientes foi o fator limitante da atividade dos microrganismos.

A inoculação de um consórcio microbiano torna-se um procedimento a ser explorado devido a maior eficiência de biodegradação, pois a associação de diferentes culturas proporciona uma gama maior de enzimas. Logo, os microrganismos são beneficiados no sentido de que o subproduto de uma reação torna-se substrato para outra, reduzindo os contaminantes residuais. (SATHISHKUMAR et al., 2008)

Outra sugestão é o uso de microrganismos associados à fitorremediação. Tang et al (2010) demonstraram que o uso de microrganismos associados a uma gramínea aumentam a eficiência de remoção de hidrocarbonetos em 58%. O uso de plantas ajudaria a degradação dos compostos mais resistentes, como os hidrocarbonetos saturados, pois ocorreu de forma mais eficiente na presença dos microrganismos junto ao vegetal.

Diferentes concentrações e tipos de surfactantes devem ser avaliados, já que estes compostos interferem na atividade microbiológica e na remoção dos contaminantes. Millioli (2009) realizou experimentos com surfactantes químico e biológico e demonstrou que a aplicação do biossurfactante JBR 210 resultou em maior atividade enzimática em relação ao

SDS (químico) em concentrações de até 8,0 mg L⁻¹. Em concentrações maiores, os valores da atividade desidrogenásica encontrados foram maiores utilizando SDS.

Ressalta-se que um estudo ecotoxicológico mais detalhado se faz necessário para detectar possíveis compostos tóxicos resultantes da degradação, ainda mais perigosos que sua molécula inicial. Deste modo, ensaios de toxicidade com minhocas e germinação de sementes (BARROS, 2007; LOPES et al., 2010; MILLIOLI, 2009) são indicados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEF, K. Soil Respiration. In: ALEF, K; NANNIPIERE, P. (Ed). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press. 576p. 1995

ATLAS R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, Great Britain, v. 31, n. 4-12, p.178-182, 1995.

AUGER, R. L.; JACOBSON, A. M.; DOMACH, M. M. Effect of nonionic surfactant addition on bacterial metabolism of naphthalene: Assessment of toxicity and overflow metabolism potential. **Journal of Hazardous Materials**, v. 43, p. 263-272, 1995.

AVATEC. Óleos minerais: aspectos toxicológico. [2010]. Disponível em: <http://www.avatec.com.br/v3/visualiza_boletim.asp?id=54> . Acesso em: 18 out. 2011.

BARROS, D. Avaliação da ecotoxicidade de solos contaminados por hidrocarbonetos. Trabalho de conclusão de curso (Programa de Recursos Humanos- Prh). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 62p, 2007.

BARTZ, W. J. Lubricants and the environment. **Tribology International**, Great Britain, v. 31, n. 1-3, p. 35-47, 1998.

van BEELEN, P.; DOELMAN, P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. **Chemosphere**, v. 34, n. 3, p. 455-499, 1997.

BENICASA, M.; et al. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v.54, p. 283-288.

BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR-10004/ABNT 2004

BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR- 6502/ABNT 1995

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente- CONAMA. Associação de Proteção ao Meio Ambiente de Cianorte- APROMAC. Gerenciamento de Óleos Lubrificantes Usados ou Contaminados, 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente- CONAMA. Grupo de Monitoramento Permanente- GMP. Diretrizes para licenciamento ambiental de atividades ligadas aos óleos lubrificantes usados ou contaminados, 2005.

BITTON, G.; KOOPMAN, B. Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in the environment. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 125, n. 1-22, 1992.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil). Resolução nº 362, de 23 de Junho de 2005

CHAN, H. Biodegradation of petroleum oil achieved by bacteria and nematodes in contaminated water. **Separation and Purification Technology**, Hong Kong, v. 80, p. 459-466, 2011.

CHÁVEZ-SOBERÓN, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 68, p. 718-725, 2005.

FRANKENBERGER, W. T. et al., Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2004.

GARCIA, C.; HERNANDEZ, T.; COSTA, F. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 27, n. 1-2, p. 37-41, 1997.

GUEDES, C. L. B. et al. Avaliação da degradação fotoquímica e eletroquímica de aromáticos no resíduo de óleo lubrificante. Universidade Estadual de Londrina, 2005.

GUSMÃO, S. **Logística reversa já recolhe 36% do óleo lubrificante usado no Brasil**. 17 jan. 2011. Disponível em <<http://www.frenteambientalista.com/noticias-home/item/230-log%C3%ADstica-reversa-j%C3%A1-recolhe-36-do-%C3%B3leo-lubrificante-usado-no-brasil>>. Acesso em: 28 de set. 2011.

HAIGH, S. D. Fate and effects of synthetic lubricants in soil: biodegradation and effect on crops in field studies. **The Science of the Total Environment**, v. 168, p. 71-83, 1994.

JOERGENSEN, R. G.; SCHMAEDEKE, F.; WINDHORST, K.; MEYER, B. Biomass and activity of microorganisms in a fuel oil contaminated soil. **Soil Biol. Biochem**, Great Britain, v. 9, p. 1137-1143, 1995.

JONES, P. H.; PRASAD, D. The use of tetrazolium salts as a measure of sludge activity. **Water Environment Federation**, v. 41, n. 11, p. 441-449, 1969.

KORA. Kontrollierter natürlicher Rückhalt und Abbau von Schadstoffen bei der Sanierung kontaminierter Grundwässer um Böden. Disponível em <<http://www.natural-attenuation.de>> . Acesso em 25 set. 2011.

LI, H. et al. Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 1003-1013, 2007.

LIMA, T. M. S. et al., Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2957-2964, 2011.

LOPES, P. R. M.; DOMINGUES, R. F.; BIDOIA, E. D. Descarte de embalagens e quantificação do volume de óleo lubrificante residual no município de Rio Claro-SP. **HOLOS Environment**, v. 8, n. 2, p. 166-178, 2008.

LOPES, P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; DOMINGUES, R. F.; BIDOIA, E. D. Toxicity and Biodegradation in Sandy Soil Contaminated by Lubricant Oils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 84, n. 4, p. 454-458, 2010.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, v. 40, p. 393-346, 2000.

MILIOLLI, V. L. et al. Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes. **Série Tecnologia Ambiental**, Rio de Janeiro: CETEM/MCT, v. 50, 95p., 2008.

MILLIOLI, V. L. Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: avaliação da adição de ramnolipídio quanto à toxicidade e a eficiência de biodegradação. In: Congresso Brasileiro de P & D em Petróleo e Gás, 4º, Campinas. **Anais...** CETEM/MCT- Centro de Tecnolohia Mineral, 2007, 12p.

MIROSLAV, N.; HORAKOVA, D. Mixture of microorganisms, its use for the biodegradations of hydrocarbons, as well as process for its application. Patent Number: US 5575998, 1996.

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

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

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NANNIPIERE, P.; GREGO, S. Ecological significance of the biological activity in soil. Capítulo 6.

NOORDMAN, W. et al. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 195-212, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

PEREIRA, D. S. Efeito da adição de ramnolipídeo em solo contaminado com óleo cru: Avaliação da concentração ótima quanto à toxicidade e biodegradabilidade. XVII Jornada de Iniciação Científica- CETEM, p.283-289, 2005.

ROCHA, M. V. P. Et al. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju. 4º PDPETRO 6.3.0232-1, Campinas, 2007, 10p.

ROSATO, Y. B. **Biodegradação do Petróleo**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. De, eds. Microbiological Ambiental. Jaguariúna: Empraba-CNPMA, 1997. Cap. 14, p. 307-334.

SATHISHKUMAR, M.; BINUPRIYA, A. R.; BAIK, S.; YUN, S. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. **Clean**, v. 36, n.1, p. 92-96, 2008.

SPARKS, D. L. **Environmental Soil Chemistry**. Department of Plant and Soil Science, University of Delaware. Second Edition, 2003.

SILVEIRA E. L.C. et al. Determinação de contaminantes em óleos lubrificantes usados e em esgotos contaminados por esses lubrificantes. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1193-1197, 2006.

SKLADANY; METTING, F. B. Jr. (Ed.) **Soil microbial ecology**. In: METTING, F. B. Jr. New York: Marcel Dekker, cap 1, p.3-25; cap 17, p.483-513, 1993.

TANG, J.; WANG, R.; NIU, X.; Z, Q. Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms. **Soil & Tillage Research**, v. 110, p. 87-93, 2010.

TORSVIK V.; Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystem. **Current Opinion in Microbiol**, v. 5, p. 240-245, 2002.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; ÇOPUR, M. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, p. 456-464, 2004.

U.S. EPA. United States Remedial Technology Factual Sheet. **Monitored natural attenuation of petroleum hydrocarbons**, Washington, 1999.

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

YAOHUI, X.; MANG L. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, p. 395-401, 2010.

10. APÊNDICES

APÊNDICE I

Relatório Fotográfico



Foto 01 - *Pseudomonas aeruginosa* LBI em meio ágar nutriente.



Foto 02 - *P. aeruginosa* LBI ativadas em meio líquido caldo nutriente.



Foto 03 - Óleo lubrificante automotivo usado.



Foto 04 - Solução de surfactante químico comercial Ecoquímica®.

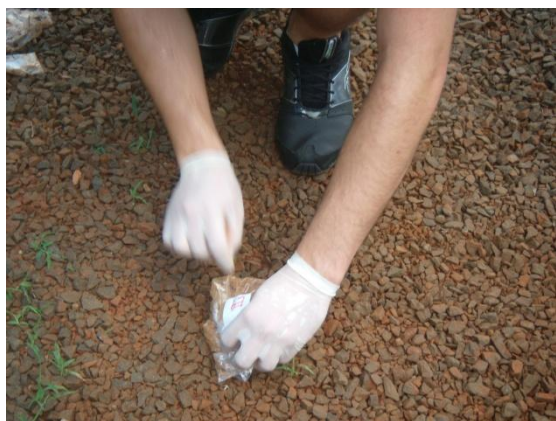


Foto 05 - Perfurações realizadas nos sacos plásticos com aos ensaios.



Foto 06 - Ensaios prontos para serem enterrados.



Foto 07 - Disposição dos ensaios na valeta do Jardim Experimental do Instituto de Biociências (IB-UNESP, Rio Claro).



Foto 08 - Amostras de solos dos diferentes ensaios em vidro âmbar para realização da análise da atividade desidrogenásica.



Foto 09 - Metodologia experimental utilizada na avaliação da atividade da enzima desidrogenase nas amostras de solo.



Foto 10 - Espectrofotômetro
UV-Visível

APÊNDICE II

Dados dos Ensaio em Triplicata Obtidos no Espectrofotômetro UV-Visível.

Ensaio	Concentração de TPF (mg L ⁻¹)					
	Tempo Inicial			Tempo Final		
E1	8,62	4,90	5,01	2,88	3,32	6,44
E2	14,41	19,32	20,73	9,97	9,97	11,84
E3	21,68	21,72	16,31	13,67	13,67	12,40
E4	17,99	16,90	14,92	13,29	13,29	13,98
E5	16,27	17,49	16,94	11,83	11,83	13,98

Avaliação do efeito do tratamento com surfactante químico e *Pseudomonas aeruginosa* LBI na toxicidade de solo contaminado com óleo lubrificante usado

Paola Legnaro Volpi Falco
(discente)

Paulo Renato Matos Lopes
(co-orientador)

Jonas Contiero
(orientador)

Rio Claro
Novembro de 2011.