
ECOLOGIA

CAMILA MATSUDA SHINZATO

**COLUNAS DE WINOGRADSKY COM ÁGUAS
CONTAMINADAS POR PETRÓLEO E DERIVADOS
MONITORADAS POR ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS**



Rio Claro
2014

CAMILA MATSUDA SHINZATO

COLUNAS DE WINOGRADSKY COM ÁGUAS CONTAMINADAS POR PETRÓLEO
E DERIVADOS MONITORADAS POR ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Ecóloga.

Rio Claro

2014

620.1122 Shinzato, Camila Matsuda
S556c Colunas de Winogradsky com águas contaminadas por
petróleo e derivados monitoradas por ensaios
ecotoxicológicos / Camila Matsuda Shinzato. - Rio Claro,
2014

24 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Ecologia) - Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Ederio Dino Bidoia

1. Biodegradação. 2. Petróleo. 3. Ecotoxicologia. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me dado a oportunidade de chegar até aqui.

A toda minha família, minha base, principalmente meus pais Celso e Gizele por todo o esforço e dedicação para que eu tivesse condições de cursar uma faculdade. Aos meus avós Shiguelo e Ivete, aos meus tios Fabio, Gisleine, Daniela e Letícia, minha prima Lê e aos meus priminhos Henrique e Luiza pelo apoio e carinho recebido. Minha sincera e eterna gratidão, amo vocês!!!!

Ao meu orientador Ederio Dino Bidoia por todas as conversas, por sua atenção, paciência, respeito e amizade. Muito obrigada por sempre me incentivar.

A todos os meus professores que ajudaram na minha formação desde o início até hoje, muito obrigada por compartilharem seus conhecimentos comigo.

As minhas amigas Tami, Iris, Bazinha e Vivian e a todos os meus amigos da igreja, do ensino médio, do técnico e do cursinho.

A Dona Thereza, que me acolheu em sua casa durante o meu primeiro ano de faculdade.

As minhas queridas amigas da Reptar: Emi, Pampers e minha irmãzinha Rê. Muito obrigada pelos quatro anos de muitas gargalhadas, baladas, comilanças, faxinas, trabalhos em grupo, discussões, cartazes colados na parede, congressos, “armadilhas” e “bruxarias”. Sem vocês ao meu lado nada disso teria graça.

Aos amigos mais do que especiais que estiveram por perto em quase todos os momentos: Níveis, After, Emily, Kalinka, Xuxa, Marina, Sinu, Sandy, Poly, Tintin e Turco. Obrigada pela amizade, carinho e puxões de orelha.

Agradeço também a oportunidade de ter conhecido ao longo da graduação pessoas maravilhosas: Urucum, Dani Matsuda, Hugo, Bitu, Lilo, Briza, Sky, Matias, Sandália, Monstro, Jamile, Dani Massaro, Isa, Moniquinha, Gu, Júlio, Ximba, Glau e Bianca.

As minhas atuais companheiras de república: Carol, Dani, Poly, Balú (*in memorian*) e Beemo. Queria agradecer por terem me recebido com muito carinho e por estarem ao meu lado nessa reta final.

A toda a Família Ecologia e principalmente a minha sala linda Eco 09 pelas festas, reuniões, semanas do bixo, semanas de estudos, banhos de lama, provas, trabalhos e viagens de campo. “Dedico a Ecologia!”.

A todos os professores, técnicos e funcionários da Biblioteca, Xérox, Cantina, R.U, da limpeza e do SAEPE.

A todos do Coral Uirapuru, onde conheci pessoas muito especiais e aprendi muito.

A todos os alunos e técnicos do Laboratório Multidisciplinar e do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP de Rio Claro em especial ao Beto e à Fátima.

Ao CNPq/PIBic pela ajuda financeira.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida e de alguma forma me ajudaram e me fizeram chegar aqui. Muito obrigada.

“No começo pensei que estivesse lutando para salvar seringueiras, depois pensei que estava lutando para salvar a Floresta Amazônica. Agora, percebo que estou lutando pela humanidade.”

Chico Mendes

RESUMO

O constante uso de petróleo não só na geração de energia, mas também na produção de diversos materiais causam grande impacto ao meio ambiente. Acidentes envolvendo vazamento de petróleo e seus derivados prejudicam a vida de inúmeros organismos que habitam os corpos d'água. Como alternativa para o uso desenfreado do petróleo e seus derivados temos o Biodiesel. O biodiesel é um combustível derivado de fontes renováveis, porém não se sabe quais os possíveis efeitos que um derramamento de biodiesel tem sobre a água. Diversos estudos indicam a biodegradação por *Bacillus subtilis* ideal para despoluir áreas contaminadas por petróleo e derivados. Essa é uma técnica simples e de baixo custo, podendo ser aplicada em áreas remotas e seus produtos finais não apresentam toxicidade. Uma forma eficaz de simular um ecossistema aquático e verificar as mudanças que ocorrem em sua biota frente à contaminação causada por petróleo é a coluna de Winogradsky. Ela consiste num recipiente de vidro contendo amostras de solo, água e nutrientes provenientes do ambiente o qual se pretende reproduzir. O presente trabalho teve por objetivo utilizar a coluna de Winogradsky para representar um ecossistema aquático contaminado por óleo lubrificante mineral usado, biodiesel e petróleo para observar se houve biodegradação nestes ambientes seja por surfactantes naturais produzidos pelos (*Bacillus subtilis*) ou pelos surfactantes sintéticos (Tween 80). Além disso, foram realizados testes ecotoxicológicos utilizando sementes de *Lactuca sativa* (alface), *Eruca sativa* (rúcula) e Identificação de algas a fim de avaliar a qualidade ambiental desse ecossistema.

Palavras-chave: Petróleo. Biodegradação. Ecotoxicologia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVO	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Colunas de Winogradsky.....	11
3.1.1 Coleta da Amostra	11
3.1.2 Coleta dos poluentes	11
3.1.3 Preparação do Inóculo de <i>Bacillus subtilis</i>	12
3.1.4 Montagem das Colunas	13
3.2 Análise do pH nas Colunas de Winogradsky	14
3.3 Ensaios Ecotoxicológicos	14
3.3.1 Experimento 1: Ensaio ecotoxicológico utilizando sementes de <i>Lactuca sativa</i> (alface) e <i>Eruca sativa</i> (rúcula)	14
3.4 Identificação de algas e utilização como bioindicadores	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Ensaios ecotoxicológicos	18
4.2 pH das Colunas	19
4.3 Identificação de algas	20
4.3.1 Algas Bioindicadoras	20
5 CONCLUSÃO	22
6 REFERÊNCIAS.....	23

1 INTRODUÇÃO

O constante uso de petróleo não só na geração de energia, mas também na produção de diversos materiais causam grande impacto ao meio ambiente. O petróleo é utilizado em larga escala para a produção de plásticos, roupas, fertilizantes e medicamentos, criando uma verdadeira “civilização do petróleo” (RIFKIN, 2003). Acidentes envolvendo vazamento de petróleo e seus derivados prejudicam a vida de inúmeros organismos que habitam os corpos d’água. Por ter um caráter hidrófobo, o petróleo se espalha sobre a superfície da água e forma uma película que impede a troca de gases entre a água e o ar causando danos diretos ou indiretos a várias espécies aquáticas como a morte por asfixia e a redução na taxa de fertilidade (CETESB, 1996).

Como alternativa para o uso desenfreado do petróleo e seus derivados temos o Biodiesel. O biodiesel é o combustível biodegradável derivado de fontes renováveis, como óleos vegetais “puros” ou já utilizados e gorduras animais. Pode ser obtido através dos processos de craqueamento, esterificação ou transesterificação. (SILVA & FREITAS, 2008). Comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico. Além disso, reduz em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de óxido de enxofre (HOLANDA, 2004). Porém, ainda não se sabe quais são os reais efeitos em caso de vazamento de biodiesel sobre a qualidade das águas subterrâneas e se o risco ao meio ambiente e à saúde humana é tolerável (GOMES 2008 apud TERAMAE, 2011).

Diversos métodos são utilizados para reduzir os danos ambientais causados pelos derramamentos de óleo e para escolher o melhor método deve-se levar em conta uma porção de fatores tais como o local atingido, o tipo de óleo derramado e o custo de operação (MILANELLI 1994).

Alguns estudos propõem a biodegradação como solução para a despoluição de ambientes contaminados seja através de surfactantes artificiais ou através da inoculação de microrganismos com potencial biodegradador (ATLAS & BARTHA, 1992). A biodegradação consiste numa tecnologia usada para facilitar a redução da toxicidade da água contaminada com petróleo e outros tipos de poluentes (TORTORA et al., 2005). Quando a biodegradação ocorre por meio da produção de

biossurfactantes por microrganismos, ela recebe o nome de biorremediação. Os produtos finais de uma biorremediação efetiva são água e gás carbônico, que não apresentam toxicidade e podem ser incorporados ao ambiente sem prejuízo aos organismos vivos (MARIANO, 2006).

Desde a década de 1950, bactérias degradadoras de compostos do petróleo vêm sendo isoladas, dentre os principais gêneros estão *Bacillus*, *Comomonas*, *Pseudomonas* entre outras (TONINI, REZENDE & GRATIVOL 2010). Os tratamentos de biorremediação podem ser “in situ”, ou seja, realizados no próprio local contaminado ou “ex situ”, quando há remoção do contaminante para tratamento em outro ambiente.

Em casos de biorremediação do tipo “ex situ” pode se utilizar a coluna de Winogradsky. Esta consiste num recipiente de vidro contendo amostras de solo, água e nutrientes retiradas do ambiente a ser reproduzido. Se a coluna for colocada num local onde receba luz solar ou artificial, ao fim de algumas semanas desenvolver-se-á ao longo dessa, de forma estratificada, uma comunidade de microrganismos de acordo com as condições ambientais que naquela se estabeleceram (GAMAZO et al., 2005). A análise das comunidades de microrganismos nestas colunas permite o monitoramento biológico, ou seja, uma avaliação das mudanças e transformações no ambiente através do desenvolvimento dessas comunidades. O estudo e conhecimento das espécies fitoplanctônicas é muito importante, pois contribuem para o controle da produtividade biológica, auxiliando na melhoria da qualidade da água (SANT’ANNA et al., 1997).

Outra forma de monitorar a qualidade ambiental são os testes ecotoxicológicos. A ecotoxicologia pressupõe o uso de testes de toxicidade com organismos, também chamados bioensaios, os quais buscam avaliar a contaminação ambiental permitindo saber em que medida as substâncias são nocivas, como e onde se manifestam os efeitos (MAGALHÃES & FILHO, 2008). Os testes utilizando sementes são rápidos, de baixo custo e apresentam sensibilidades a ambientes que apresentam toxicidade. Experimentos utilizando sementes de hortaliças como a *Lactuca sativa* (alface) e *Eruca sativa* (rúcula) são bastante utilizados em estudos de ecotoxicologia.

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo reproduzir um ambiente aquático contaminado por petróleo, óleo lubrificante usado e o biodiesel utilizando as Colunas de Winogradsky. Avaliar as modificações que estes ambientes sofrem através da realização de testes ecotoxicológicos com as sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Eruca sativa* (rúcula). Observar as espécies de algas encontradas nas colunas e classificá-las através de suas características. Monitorar as condições físico-químicas da água a fim de classificar a qualidade ambiental desse ecossistema. Analisar e comparar o efeito do *Bacillus subtilis* no processo de biorremediação ao do surfactante Tween 80.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Colunas de Winogradsky

3.1.1 Coleta da Amostra

Foram coletados para a montagem das colunas, água e solo do Ribeirão Claro, num trecho localizado na ETA 1 do Departamento de água e esgoto (DAAE) de Rio Claro (Figura 01). Este rio é um afluente do Rio Corumbataí e tem boa qualidade verificada pela alta diversidade de organismos, comparando-se a outros ambientes impactados por atividades antrópicas (BARBOSA & CALLISTO, 2000). Os experimentos e a montagem das colunas foram realizados no laboratório multidisciplinar do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Unesp de Rio Claro.

Figura 01: Local da coleta de água e solo, no Ribeirão Claro.



Fonte: Imagem captada pelo Google Earth

3.1.2 Coleta dos Poluentes

O óleo lubrificado usado foi coletado em locais de troca e o Biodiesel foi obtido na Caramuru alimentos S.A. (GO), empresa produtora de biodiesel. O petróleo foi obtido da Refinaria do Planalto (REPLAN-Petrobrás) em Paulínia, SP.

3.1.3 Preparação do Inóculo de *Bacillus subtilis*

Para tratar o ambiente poluído foram utilizados inóculos do *Bacillus subtilis*. O *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi mantido sob refrigeração a uma temperatura de 4°C em meio de caldo nutriente ágar de acordo com o manual da Difco (1984). Depois foi reativado em meio caldo nutriente (3,0 g L⁻¹ de extrato de carne, 5,0 g L⁻¹ de peptona e 8,0 g L⁻¹ de NaCl). Posteriormente, cresceu em incubadora Shaker da marca Solab sob agitação de 180 rpm durante 24 horas. O inóculo líquido obtido apresentou segundo a escala de Mc Farland 10³ colônias por mL (Figura 02) e foi guardado em refrigeração para uso posterior.

Figura 02: Comparação do Inóculo com a Escala de McFarland.



Fonte: tirada pelo próprio autor.

3.1.4 Montagem das Colunas

As colunas de Winogradsky foram preparadas com água e o solo do Ribeirão Claro, inóculo de *Bacillus subtilis*, Biodiesel, óleo lubrificante usado e Tween 80 (surfactante) e colocadas em provetas de vidro de 500 mL. Para a pesagem das substâncias, foi utilizada uma balança semi-analítica da Marte modelo AS5500. As colunas foram preparadas da seguinte maneira:

- Coluna I controle ambiental contendo somente 100 g de solo e 500 mL de água do Ribeirão Claro;
- Coluna II contaminada contendo 100 g de solo e 500 mL de água, 5 mL de biodiesel e 5 mL do surfactante Tween 80;
- Coluna III contaminada contendo o 100 g de solo, 500 mL de água, 5 mL do óleo lubrificante usado e 5 mL do surfactante Tween 80;
- Coluna IV contaminada contendo 100 g de solo, 500 mL de água, 5 mL de biodiesel e 5 mL do inóculo líquido do *Bacillus subtilis*;
- Coluna V contaminada contendo o 100 g de solo, 500 mL de água, 5 mL do óleo lubrificante usado e 5 mL do inóculo líquido do *Bacillus subtilis*.

Após seis meses foi feita mais uma coluna contendo petróleo para comparar a biodegradação de petróleo através do surfactante Tween 80 aos outros ambientes contaminados:

- Coluna VI contaminada contendo 100 g de solo, 500 mL de água, 5 mL de petróleo e 5 mL do surfactante Tween 80.

As colunas foram todas identificadas, tampadas com papel filme com micro furos e foram colocadas próximas a janela para receber a luminosidade natural do sol. Representando da maneira mais fiel possível as condições naturais do ambiente (Figura 03).

Figura 03: Colunas de Winogradsky após a montagem.



Fonte: Tirada pelo próprio autor.

3.2 Análise do pH nas Colunas de Winogradsky

Após a montagem das colunas de Winogradsky, o pH de todas as colunas foi medido mensalmente, utilizando tiras de papel de pH da Macherey-Nagel. Foram também realizados testes ecotoxicológicos para avaliar a qualidade da água das colunas.

3.3 Ensaios Ecotoxicológicos

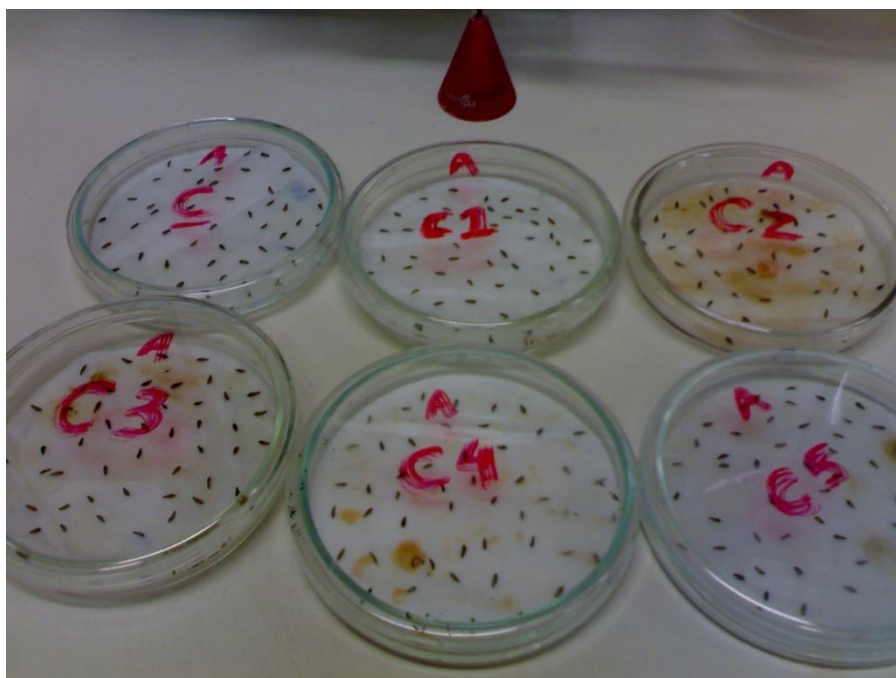
Nos ensaios foram realizados experimentos com sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Eruca sativa* (rúcula) baseado nos experimentos de INAZAKI *et al.*, 2001.

3.3.1 Experimento 1: Ensaio ecotoxicológico utilizando sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Eruca sativa* (rúcula)

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

Foram utilizadas para os testes de toxicidade aguda, 6 placas de petri de 100 x 20 mm. Cada placa continha um papel filtro da marca Qualy e 50 sementes de *Lactuca sativa* dispostas de maneira homogênea e com o máximo de espaçamento entre elas, para evitar a competição por nutriente e água (Figura 04).

Figura 04: Sementes de *Lactuca sativa*.



Fonte: Tirada pelo próprio autor.

Em cada placa foi acrescentada a água da coluna correspondente, com auxílio de uma pipeta graduada. O controle negativo (CN) foi feito acrescentando-se 1,5 mL de água destilada. Nas outras placas foram colocados 1,5 mL de água das colunas I, II, III, IV, V e VI.

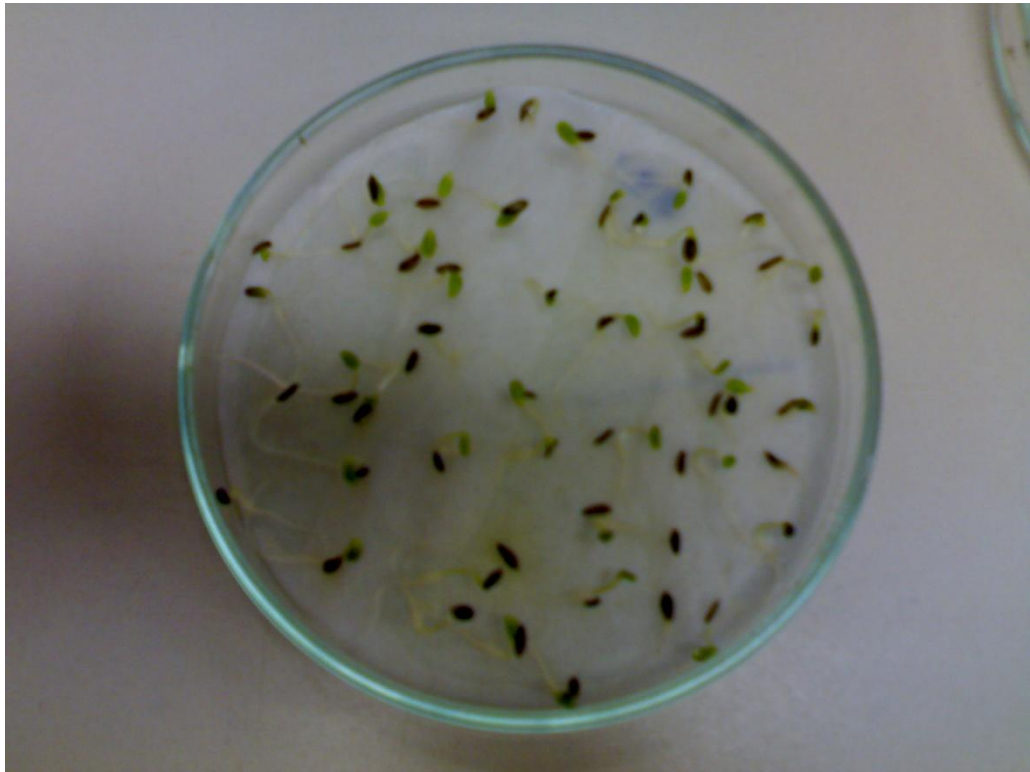
As placas foram deixadas em temperatura ambiente, próximas à janela para receber luminosidade solar. As placas de petri foram tampadas com o propósito de evitar a perda de água para o ambiente externo.

Após 24 horas, 1,0 mL de água destilada foi novamente acrescentado na placa controle negativo (CN) e 1,0 mL da água de cada coluna foi injetado em sua respectiva placa.

Todas as placas foram novamente tampadas e deixadas em temperatura ambiente, com acesso à luz solar por mais 48 horas. Após esse período, as

sementes germinadas (Figura 05) de cada placa foram contadas, para a determinação do grau de toxicidade das águas de cada coluna.

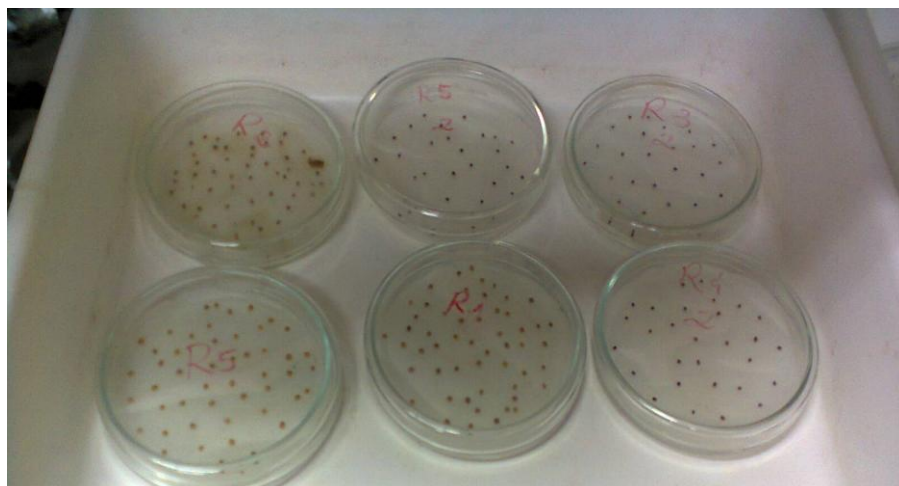
Figura 05: Sementes de alface germinadas.



Fonte: Tirada pelo próprio autor.

Para determinação de toxicidade com sementes de *Eruca sativa* repetiu-se a mesma metodologia, porém agora utilizando 30 sementes em cada placa.

Figura 06: Placas com sementes de *Eruca sativa*.



Fonte: Tirada pelo próprio autor.

Após a contagem das sementes germinadas foi calculado o grau de inibição de germinação seguindo o cálculo de Abbott. (Equação 1). A fórmula de Abbott é aplicada para verificar a porcentagem de inibição da germinação (%I) a partir do número de sementes germinadas no controle negativo (CN) e do número de sementes germinadas no tratamento (T):

Equação 1: Fórmula de Abbott.

$$\%I = \frac{CN - T}{CN} \times 100$$

Fonte: Adaptado de NAKANO, NETO & ZUCCHI, 1981

3.4 Identificação de algas e utilização como bioindicadores

Ao longo dos experimentos foi realizada a identificação de algas presentes nas colunas. Foram coletados 5,0 mL de água de cada zona, de todas as colunas, com o auxílio de uma pipeta volumétrica de 5,0 mL. Lembrando que deve-se usar uma pipeta diferente para cada coluna, para que não haja contaminação das amostras. As amostras foram identificadas, colocadas em tubos de ensaio e agitadas para homogeneizá-las. Com o auxílio de uma pipeta de ponta fina foi colocada uma gota de amostra na lâmina. Para a identificação das algas foram utilizados o microscópio óptico da marca Nikon e a chave de identificação (BICUDO & MENEZES, 2006).

Depois de identificadas foi realizada uma pesquisa com a finalidade de descobrir quais gêneros encontrados nas colunas podiam ser considerados como bioindicadores da qualidade da água.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios Ecotoxicológicos

Os testes de toxicidade aguda com sementes de *Lactuca sativa* e *Eruca sativa* apresentaram germinação em todos os experimentos como podemos ver na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1: porcentagem de inibição (I%) no experimento 1, segundo a fórmula de Abbott (equação 1)

Coluna	I%	
	<i>L. sativa</i>	<i>E. sativa</i>
C1	-7,69	11,5
C2	25	11,5
C3	20,83	19,2
C4	0	3,8
C5	16,67	11,5
C6	20,83	3,8

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 2: Classificação da água, de acordo com o valor obtido na porcentagem de inibição

%I	Classificação
> 40%	Tóxica
$10\% \leq x \leq 40\%$	Baixa toxicidade
< 10%	Não tóxica

Fonte: Nakano, Neto & Zucchi (2001).

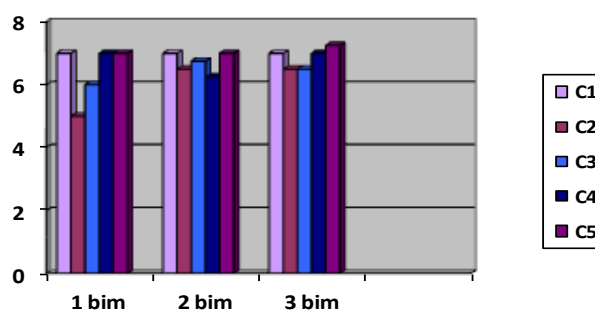
A maioria das colunas foi considerada como de baixa toxicidade, visto que o grau de inibição mais alto foi de 25%. Algumas colunas apresentaram resultados menores que 10% de inibição, ou seja, foram considerados como não tóxicas.

As sementes de alface se mostraram mais sensíveis a presença de petróleo do que as de rúcula. O valor negativo apresentado na Coluna I se deve ao fato desta ter apresentado maior germinação do que a coluna controle negativo (CN).

4.2 pH das colunas

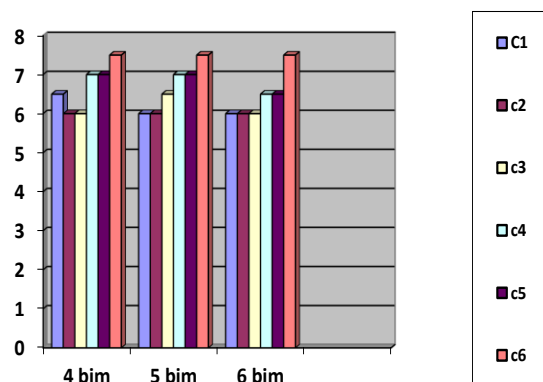
Foram realizadas medições do pH de cada coluna mensalmente e depois foi calculada a média por bimestre como mostram as Figuras 7 e 8 a seguir. Os valores apresentaram oscilação entre 5,0 e 7,5.

Figura 07: Representação das médias bimestrais do pH das 5 colunas.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 08: Médias bimestrais do valor de pH das 6 colunas.



Fonte: elaborada pelo autor.

Durante o período do experimento o pH manteve-se próximo da neutralidade o que pode ter facilitado a ação da surfactina. A surfactina é um componente produzido pelo *Bacillus subtilis* que ajuda na degradação de hidrocarbonetos, transformando-os em substâncias com menor toxicidade (MONTAGNOLLI, 2011).

4.3 Identificação de Algas

4.3.1 Algas Bioindicadoras

Os gêneros mais observados nas colunas foram: *Aulacoseira*, *Aphanizomenon*, *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Chlorella*, *Closteriopsis*, *Cyanoarbor*, *Cyanomonas*, *Cylindrospermopsis*, *Euglena*, *Koliella*, *Gloetilla*, *Myxosarcina*, *Nostoc*, *Trebouxia* e *Scenedesmus*. A distribuição destes gêneros está representada na Tabela 3 a seguir. A observação de algas na coluna VI foi mais difícil por essa ter sido montada a menos tempo.

Tabela 3: Distribuição dos gêneros de algas observadas nas colunas.

Gênero	I	II	III	IV	V	VI
<i>Aulacoseira</i>	X	x	x	x	x	
<i>Aphanizomenon</i>	X	x	x	x	x	X
<i>Aphanocapsa</i>		x	x	x	x	
<i>Aphanothece</i>		x	x	x	x	
<i>Chlorella</i>		x	x	x	x	
<i>Closteriopsis</i>	x		x	x	x	
<i>Cyanoarbor</i>	x	x	x	x	x	
<i>Cyanomonas</i>	x	x	x	x		
<i>Cylindrospermopsis</i>	x	x		x	x	
<i>Euglena</i>	x	x	x	x		
<i>Koliella</i>	x	x	x	x	x	
<i>Myxosarcina</i>	x		x	x	x	
<i>Nostoc</i>		x	x	x	x	

<i>Scenedesmus</i>	x	x		x	x	
<i>Trebouxia</i>		x	x	x	x	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dentre estes destacamos os seguintes gêneros de algas bioindicadoras: *Scenedesmus*, *Aphanizomenon*, *Aphanocapsa*, *Chlorella* e *Cylindrospermopsis*. Os gêneros *Scenedesmus*, *Aphanocapsa* e *Chlorella* encontrados nas colunas são característicos de ambientes com poluição moderada. As cianobactérias como o *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis*, principalmente a primeira, podem produzir toxinas, apresentando riscos a outros organismos da biota (HIMBERG *et al.*, 1989).

5 CONCLUSÃO

Ao observar as mudanças que ocorreram ao longo do experimento pode-se inferir que houve a degradação do óleo lubrificante usado, do biodiesel nas colunas, tanto pela ação do surfactante Tween 80 quanto pelo *Bacillus subtilis* evidenciadas pelo valor do pH que manteve-se perto da neutralidade. Isso facilitou o desenvolvimento e atividade de degradação do óleo e biodiesel.

Os aspectos físicos como a cor da água apresentaram diferença desde a montagem das colunas, com exceção da coluna VI, até o presente momento o que pode ter sido resultado da atividade microbiana.

A Coluna VI não sofreu muitas alterações, mesmo apresentando pH ideal para a degradação. A leitura das algas nesta coluna ainda é bastante difícil em decorrência da quantidade de óleo ainda presente e também pelo fato de ter menos tempo para se recuperar.

Os testes de toxicidade mostraram que o óleo presente nas colunas poluídas não inibiu a germinação de sementes da maioria das placas. Porém a análise das algas bioindicadoras demonstraram ecossistemas ainda poluídos, com a presença de cianobactérias tóxicas como a *Aphanizomenon* encontrada em todas as colunas, inclusive na coluna I controle ambiental.

Portanto conclui-se que houve a diminuição da toxicidade dos poluentes pelos biossurfactantes e surfactantes, porém ainda não foi o suficiente para despoluir esses locais contaminados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS, R. M. & BARTHA, R. Hydrocarbon biodegradation and oil-spill bioremediation. *Advances in Microbial Ecology*, v.12, p. 287-338, 1992.
- BARBOSA, F. A. R. & CALLISTO, M. Rapid assessment of water quality and diversity of benthic macroinvertebrates in the upper and middle Paraguay river using the Aqua-RAP approach. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27, 2000.
- BICUDO, C. E. M. & MENEZES, M. Gêneros de algas continentais do Brasil – Chave para identificações e descrições. Editora Rima. São Carlos, 2006. 2ª Edição.
- CETESB, São Paulo. Avaliação preliminar de acidentes e monitoramento. Helvio Aventurato. Derrames de Óleo e os Ecossistemas Costeiros. Apostila de Curso. CETESB, São Paulo. 1996.
- DIFCO. Difco Manual. Difco Laboratories, Detroit, 1984.
- GAMAZO, C., LÓPEZ-GOÑI, I. & DÍAZ, R. Manual Práctico de Microbiología. 3ª edição, Masson, Barcelona, 2005.
- HIMBERG, K.; KEIJOLA, A-M.; HUSVIRTA, L.; PYYSALO, H.; SIVONEN, K. (1989). The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: a laboratory study. *Wat. Res.* 23, 979-984.
- HOLANDA, A. Biodiesel e inclusão social / Ariosto Holanda. — Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, 2004.
- INAZAKI, T. H.; PIAO, A. C. S.; BIDOIA, E. D.; RÉGIS, G.; ANGELIS, D. F. Teste de toxicidade utilizando sementes de *Eruca sativa*. *Arquivo Instituto Biológico*, v. 68, 2001.
- KENNISH, M. L. Practical handbook of estuarine and marine pollution. CRC Press – Marine Science Series, New York. 1997.
- MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* v.12, n.3, p. 355-381, 2008.
- MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo. 2006.
- MILANELLI, J. C. C. Efeitos do petróleo e da limpeza por jateamento em um costão rochoso da praia de Barequeçaba, São Sebastião, São Paulo. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo 1994.

MONTAGNOLLI, R. N. Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. 2011. 245 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro 2011.

NAKANO, O; NETO, S. S.; ZUCCHI, R. A. 1981. Entomologia econômica. Piracicaba, Livroceres, 314 p.

RIFKIN, J. A Economia do Hidrogênio. São Paulo: M. Books do Brasil Editora Ltda., 2003.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.3, p.843-851, 2008.

SANT'ANNA, C. L.; SORMUS, L.; TUCCI, A.; AZEVEDO, M. T. P. Variação Sazonal do fitoplâncton do lago das Garças, São Paulo, SP. Hoehnea, v. 24, n. 1, p. 67-86, 1997.

TERAMAE, K. H. Análise ecotoxicológica utilizando colunas de Winogradsky contaminadas por óleo lubrificante usado e biodiesel. 2011. 98 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2011.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8ª. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

TONINI, R. M. C. W; REZENDE, C. E; GRATIVOL A. D. - Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. Revista Oecologia Australis 14(4): 1010-1020, Dezembro 2010.