
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO
COM ÓLEO LUBRIFICANTE PELA APLICAÇÃO DE
DIFERENTES SOLUÇÕES DE SURFACTANTE
QUÍMICO E BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR
Pseudomonas aeruginosa LBI**

PAULO RENATO MATOS LOPES

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

Março - 2014

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM
ÓLEO LUBRIFICANTE PELA APLICAÇÃO DE
DIFERENTES SOLUÇÕES DE SURFACTANTE
QUÍMICO E BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR
Pseudomonas aeruginosa LBI**

PAULO RENATO MATOS LOPES

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Co-Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

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

Rio Claro – SP
Março/2014

Dedico aos pilares de tudo, **minha família**

Pai (Manoel Renato), Mãe (Edna Luisa) e Irmão (João Eduardo)

Não existem carinho, incentivo, amor, abraço e saudade como os seus!

AGRADECIMENTOS

Esta tese não se trata apenas de um esforço individual. Todo o trabalho foi construído com significativas contribuições em diferentes esferas por pessoas que surgiram pelo caminho e deixaram seu nome registrado na minha história. A gratidão, os ensinamentos e os momentos estarão sempre vivos!

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, luz e sabedoria proporcionadas na realização do trabalho e na estruturação pessoal que me capacitou para percorrer esta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia, cuja orientação foi essencial na minha formação profissional. Seu incentivo e confiança em muito contribuíram para o crescimento daquele estagiário de iniciação científica.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Jonas Contiero, pela oportunidade de vislumbrar novas experiências durante a etapa de produção de biossurfactante.

À FAPESP (Processo 2010/07539-4) por todo apoio financeiro e bolsa concedida.

.Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada e ao Instituto de Biociências da UNESP, campus Rio Claro, por me conceder esta oportunidade. Sentirei muito falta e orgulho de passar excelentes momentos (pessoais e acadêmicos) nesta escola!

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia. Em especial aos técnicos de laboratório: Adriano, Beto, Carmen, Fátima, Inês e Luiza. Também, à Ângela, ao Ronaldo e ao Zito.

À Dra. Roberta Lovaglio e ao Me. Vinícius Silva pela paciência e auxílio na produção e caracterização dos ramnolipídeos. Também, à Roberta pelas contribuições no texto!

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, pela cooperação na contagem de UFC, juntamente com Me. Mariane, Dra. Dilza, Lu e Inês.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, pela parceria e permissão em utilizar o Laboratório de Biologia Molecular (Departamento de Solos/Esalq-USP, Piracicaba). Em especial aos doutorandos Thiago Gumiere, Ademir Durrer e Pedro Andrade pela amizade e contribuição na luta das análises moleculares e estatísticas.

Aos membros da banca de defesa que muito contribuíram ao trabalho: Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto, Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos, Dra. Maria Aparecida Marin Morales e Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis.

A todos os amigos do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas em Meio Ambiente (Eduardo Mitter, Érica Almeida, Graziely Santos, Ivo Tamada e Jaqueline Cruz) pelos momentos compartilhados de trabalho, conversas, churrascos e eventos Lab Multi. A alegria do ambiente permitiu que tudo ficasse mais prazeroso!

Ao Renato Montagnolli, parceiro de laboratório, de discussões de dados, revisões de texto e de situações descontraídas no Grande Erro e outros fins. A troca de experiências profissionais e pessoais sempre foi muito valorosa.

Aos muitos amigos pós-graduandos pela amizade, pelos SMAs, pelos cafezinhos diários, pelas discussões ludopédicas, pelos eventos e pela ajuda nos momentos de dificuldade.

Ao grande companheiro Rafael Ferreira pela cumplicidade, pelas vivências indescritíveis, pelas inúmeras situações de diversão e também pelas jornadas de trabalho duro nesses bons anos de amizade sólida e permanente.

Aos amigos que me tornaram minha vida de cidadão “rioclaróide” mais feliz e descontraída: Matheus, Gleí, Nádia, Rogério, Vanessa, Henrique, Tássia, Morales, Dânia, Andriago, João, Otávio Galeano e Filipe Minhoca.

A toda minha família e amigos de José Bonifácio, pela companhia e carinho que, mesmo distantes, estiveram sempre presentes. Em especial, ao meu irmão João, pela amizade e reciprocidade durante todos estes anos! Agradeço como um todo às famílias Matos, Lopes, Pagoto e Bergamini.

A minha namorada Marcela, companhia valiosa e pessoa fundamental no apoio em todas as fases deste trabalho. Meu débito com você pelos finais de semanas no laboratório e pelo ouvido amigo é enorme. Além disso, minha alegria em viver está intrinsicamente ligada à sua presença e ao seu sorriso!

A todos que contribuíram de diferentes formas para a concretização deste sonho, muito obrigado!

Devo minha formação desde os primeiros passos aos meus pais Edna e Renato, cujo amor de família e doação incondicional permitem que eu busque escrever minha história baseada nos exemplos de profissional e de ser humano que ambos são! A saudade sempre foi grande nestes 11 anos de Rio Claro.

*[...] talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito [...]
não sou o que deveria ser,
mas graças a Deus, não sou o que era antes.
(Martin Luther King)*

RESUMO

Acidentes ambientais com petróleo e derivados causam danos consideráveis ao meio ambiente, gerando uma preocupação pública enorme, que pressiona para soluções rápidas e econômicas. No Brasil, os maiores responsáveis por acidentes com hidrocarbonetos de petróleo são os postos de combustíveis devido a vazamentos acidentais e a derrames em tanques de armazenagem, os quais geralmente contêm combustíveis e óleos lubrificantes. Assim, dentre as alternativas de tratamento, a biorremediação emerge como a menos agressiva e a mais adequada para manutenção do equilíbrio ecológico. Uma melhor eficiência no tratamento biológico é conquistada adotando estratégias como a bioaugmentação e a aplicação de surfactantes, cujas propriedades tensoativas aumentam a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos. Neste sentido, os biosurfactantes tornam-se adequados em substituir os produtos de origem sintética uma vez que possuem vantagens, tais como: maior diversidade estrutural, baixa toxicidade e alta biodegradabilidade. Apesar dos inúmeros benefícios apresentados pelos biotensoativos, eles não são comercialmente utilizados devido ao alto custo de produção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biodegradação do óleo lubrificante automotivo usado associado ao solo pela aplicação de diferentes soluções de surfactantes químicos e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI a partir de um resíduo agroindustrial. Também, foi analisada a eficiência do processo de biorremediação quanto: ao metabolismo microbiano, aos parâmetros físico-químicos do solo, à ecotoxicidade do meio e à diversidade da comunidade microbiana. Inicialmente, foi demonstrado que a bactéria *P. aeruginosa* LBI foi capaz de produzir ramnolipídios a partir de borra de soja como única fonte de carbono. No processo de biodegradação do óleo lubrificante usado, a adição de surfactantes melhorou sua eficiência com destaque ao biosurfactante e ao Tween80. Além disso, a bioaugmentação favoreceu a atividade microbiana na degradação do hidrocarboneto. Portanto, o tratamento biológico foi capaz de reduzir os efeitos fitotóxicos da contaminação, assim como diminuir a concentração de metais e indicar um número maior de UFC para bactérias e fungos. Também, a dinâmica da comunidade microbiana durante a biorremediação estabeleceu um perfil diferente ao se comparar com o tempo inicial. Entretanto, os tratamentos realizados com o detergente químico apresentava baixa quantidade de micro-organismos e

demonstrou efeito tóxico elevado mesmo após 180 dias. Assim, os ensaios mais eficazes e ecologicamente viáveis para a descontaminação do solo contaminado com óleo lubrificante usado foram aqueles que combinaram a bioaugmentação e a aplicação do surfactante comercial (Tween80) ou o ramnolipídio. Por fim, os procedimentos moleculares baseados em técnicas independentes de cultivo possibilitaram avaliar a perturbação do impacto do óleo usado no solo e o comportamento dos tratamentos propostos em relação à estrutura de cada comunidade microbiana. Como resultado destas análises, foi demonstrado que o grupo das bactérias atuou como agente principal na biorremediação de solo contaminado com o óleo lubrificante usado.

Palavras-chave: Biodegradação. Borra de soja. DGGE. Ecotoxicidade. Hidrocarbonetos. Ramnolipídios. Tensoativos.

ABSTRACT

Environmental impacts with petroleum and its derivatives cause considerable damage and a huge public concern pressing for quick and economic solutions. According to alternatives treatment for hydrocarbons contamination, bioremediation represents a viable process to maintain the ecological balance. Also, a better efficiency in biological treatment is achieved by adopting strategies such as bioaugmentation and application of surfactants, whose properties increase the hydrophobic compounds bioavailability. Thereby, biosurfactants become appropriated to substitute synthetic since their advantages: high structural diversity, low toxicity and high biodegradability. Despite the many benefits presented by biosurfactants, they are not commercially used due to the high production cost. The purpose of this study was to evaluate the biodegradation of waste automotive lubricant oil in soil by application of different surfactants solutions (chemical and biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from an agroindustrial residue). Besides, the efficiency of bioremediation process was analyzed as: microbial metabolism, physico-chemical parameters, ecotoxicity and diversity of microbial community. Initially, the results showed that *P. aeruginosa* LBI was able to produce rhamnolipids from soybean soapstock. In biodegradation process, surfactants and bioaugmentation improved the microbial activity. Therefore, the biological treatment increased CFU number for bacteria and fungi and it was able to reduce phytotoxic effects and heavy metals concentration in relation to original contamination. Likewise, microbial community dynamics during bioremediation set a different profile when it was compared with the initial time. However, treatments with chemical detergent had low microbial amount and high phytotoxicity even after 180 days. Thus, the combination of bioaugmentation and Tween80 or rhamnolipid applications were effective and environmentally viable strategies for remediation of contaminated soil with waste lubricant oil. Finally, molecular procedures based on independent cultive techniques enabled asses the waste lubricant oil impact and the treatments behavior according to each microbial community structure. These results demonstrated that bacteria were the principal group in bioremediation of soil contaminated with lubricant oil.

Keywords: Biodegradation. Soybean soapstock. DGGE. Ecotoxicity. Hydrocarbons. Rhamnolipids. Surfactants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Produção mundial de soja 1935-2001 (Fonte: Embrapa, 2004).	22
Figura 2 - Culturas agrícolas por área plantada nos EUA em 2010 (Fonte: ASA, 2012).....	23
Figura 3 - Produção brasileira de soja 1990-2010 (Fonte: FAO, 2012).....	25
Figura 4 - Estruturas dos quatro principais homólogos de ramnolipídios. RL1 e RL2 – 2 e 1 moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas à duas moléculas de ácido graxo; RL3 e RL4 - 2 e 1 moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas à uma molécula de ácido graxo (LOVAGLIO, 2011).	35
Figura 5 - Esquema experimental do processo de produção de biossurfactante (ramnolipídio) por <i>P. aeruginosa</i> LBI.....	53
Figura 6 - Tensiômetro de bancada Krüss – modelo K6 e detalhe do anel de platina-irídio utilizados nas análises de tensiometria.	56
Figura 7 - Montagem dos testes para medida do índice de emulsificação (E_{24}) na sequência: Bs, Dq e SqC. (a) OLU; (b) óleo lubrificante novo; (c) petróleo.	57
Figura 8 - Determinação da biomassa e do pH no processo de produção de ramnolipídios.	58
Figura 9 - Quantificação de espécies homólogas (RL1 e RL3) e do total de ramnolipídios (RL total) produzidos por <i>P. aeruginosa</i> LBI.	59
Figura 10 - Valores da tensão superficial no caldo livre de células durante o processo produtivo.....	61
Figura 11 - Índice de emulsificação (E_{24}) para: OLU, óleo lubrificante novo e petróleo; utilizando biossurfactante (Bs), detergente químico (Dq) e surfactante químico comercial – Tween80 (SqC).....	63
Figura 12 - Preparo do inóculo de solo a partir de contaminação com OLU (Contaminação 1 – C1).....	73
Figura 13 - Amostras C1 sendo enterrado no Jardim Experimental – IB/UNESP, campus Rio Claro.....	73
Figura 14 - Esquema de um respirômetro de Bartha (CETESB, 1990; ABNT, 1999). A: Tampa da cânula; B: Cânula (diâmetro 1-2 mm); C: Rolha de borracha; D: Braço lateral (diâmetro 40 mm; altura 100 mm); E: Solução alcalina de KOH; F: Amostra de solo; G: Frasco Erlenmeyer (250 mL); H: Válvula; I: Suporte (lã de vidro ou algodão); J: Filtro de cal sodada (diâmetro 15 mm; altura 40 mm).	75
Figura 15 - Montagem dos sistemas respirométricos para o monitoramento da biodegradação. (a) pesagem das amostras de solo; (b) montagem dos frascos de Bartha; (c)	

preparo dos sistemas; (d) sistema respirométrico; e (e) incubação dos respirômetros em câmara BOD a 28 °C.	77
Figura 16 - Reação do indicador 2,6-diclorofenol-indofenol como aceptor de elétrons. A mudança na ligação dupla entre o nitrogênio e carbono altera a estrutura da molécula (BIDOIA et al., 2010).	81
Figura 17 - Espectro de absorção UV-Vis do indicador redox DCPIP.	83
Figura 18 - Produção de CO ₂ semanal pelo tempo de incubação - respirometria.	85
Figura 19 - Produção de CO ₂ acumulada pelo tempo de incubação - respirometria.	89
Figura 20 - Produção de CO ₂ semanal pelo tempo de incubação de cada sistema respirométrico ajustada ao modelo de Membré et al. (1996) e Montagnolli et al. (2009).	91
Figura 21 - Produção de CO ₂ acumulada pelo tempo de incubação de cada sistema respirométrico ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) e Montagnolli et al. (2009).	95
Figura 22 - Comparação entre os valores de tempo final de biodegradação previsto pelos dois modelos para os dados de produção de CO ₂ . BRminT – semanal (MEMBRÉ et al., 1996); BmaxT – acumulada (SCHMIDT et al., 1985).	99
Figura 23 - Redução na concentração do indicador DCPIP _{ox} em função do tempo.	101
Figura 24 - Espécies vegetais utilizadas como organismos-teste nos bioensaios de toxicidade (tempo zero).	113
Figura 25 - Contagem de UFC de bactérias para as amostras de solo nos tempos zero e final de tratamento.	121
Figura 26 - Contagem de UFC de fungos totais para as amostras de solo nos tempos zero e final de tratamento.	121
Figura 27 - Bioensaios de toxicidade. (a) Amostras de solo em triplicata. (b) Sementes germinadas após 120 h de incubação.	123
Figura 28 - Medição do hipocótilo e da raiz para os dois organismos-teste utilizados.	124
Figura 29 - Desenvolvimento das plântulas nas sementes de alface germinadas (tempo zero).	125
Figura 30 - Desenvolvimento das plântulas nas sementes de alface germinadas (tempo final).	125
Figura 31 - Germinação e desenvolvimento das sementes de alface germinadas em relação ao controle negativo (tempo zero).	126
Figura 32 - Germinação e desenvolvimento das sementes de alface germinadas em relação ao controle negativo (tempo final).	126
Figura 33 - Desenvolvimento das plântulas nas sementes de rúcula germinadas (tempo zero).	129
Figura 34 - Desenvolvimento das plântulas nas sementes de rúcula germinadas (tempo final).	129

Figura 35 - Germinação e desenvolvimento das sementes de rúcula germinadas em relação ao controle negativo (tempo zero).....	130
Figura 36 - Germinação e desenvolvimento das sementes de rúcula germinadas em relação ao controle negativo (tempo final).....	130
Figura 37 - Amplicons do gene 16S DNAr de Bactéria, após separação por DGGE. Bactérias. (1) t0 CS; (2) t0 C1; (3) t0 C2; (4) CS; (5) C1; (6) C2; (7) C2 Dq; (8) C2 Bs; (9) C2 SqC; (10) C2-Ps; (11) C2 Dq-Ps; (12) C2 Bs-Ps; (13) C2 SqC-Ps. Poliacrilamida 6,0%; gradiente desnaturante 45-65%; TAE 0,5 x; 60° C; 90 volts; 16 h.....	143
Figura 38 - Amplicons da região interespaçadora ITS de Fungo, após separação por DGGE. (1) t0 CS; (2) t0 C1; (3) t0 C2; (4) CS; (5) C1; (6) C2; (7) C2 Dq; (8) C2 Bs; (9) C2 SqC; (10) C2-Ps; (11) C2 Dq-Ps; (12) C2 Bs-Ps; (13) C2 SqC-Ps. Poliacrilamida 8,0%; gradiente desnaturante 35-65%; TAE 0,5 x; 60° C; 90 volts; 16 h	144
Figura 39 - Análise de coordenadas principais (PCoA) dos grupos formados com base na análise de DGGE para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA). Software PAST 1.90.	145
Figura 40 - Análise de similaridade dos grupos formados com base na análise de DGGE para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA). Software PAST 1.90.....	150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ranking dos países produtores de soja nos anos de 2000 e 2010	23
Tabela 2 - Ranking de commodities produzidos pelo Brasil nos anos 2000 e 2010.....	24
Tabela 3 - Projeções 2008/09 a 2018/19 na produção, consumo e exportação de soja, óleo de soja e farelo de soja no Brasil	26
Tabela 4 - Valores de tensão superficial na produção de ramnolipídios por <i>P. aeruginosa</i> .	62
Tabela 5 - Composição do detergente químico EcoQuímica®	68
Tabela 6 - Composição de sais no preparo de 1,0 L do meio Bushnell-Haas	69
Tabela 7 - Composição dos sistemas respirométricos.....	77
Tabela 8 - Composição dos ensaios colorimétricos.....	82
Tabela 9 - Composição dos tubos, concentração de DCPIP e valores de absorbância obtidos na elaboração da reta padrão.....	83
Tabela 10 - Produção acumulada de CO ₂ nos ensaios respirométricos, após 181 dias.....	88
Tabela 11 - BRminT, Bmax, BmaxT e R ² dos modelos matemáticos ajustados às produções semanal e acumulada de CO ₂ – respirometria.....	98
Tabela 12 - Porcentagem de descoloração pela concentração de DCPIP _{ox}	102
Tabela 13 - Amostras de solo para realização de análises no tempo final (180 dias)	111
Tabela 14 - Análises realizadas nas amostras de solo	112
Tabela 15 - Parâmetros de inoculação e incubação dos micro-organismos para contagem de UFC.....	112
Tabela 16 - Composição granulométrica e classificação do solo.....	115
Tabela 17 - Caracterização físico-química das amostras de solo – Macronutrientes e análises complementares	117
Tabela 18 - Caracterização físico-química das amostras de solo – Micronutrientes e metais pesados e outros elementos.....	118
Tabela 19 - Número de UFC por amostra de solo e grupo microbiano	120
Tabela 20 - Porcentagem de sementes de alface germinadas (tempo zero)	124
Tabela 21 – Porcentagem de sementes de alface germinadas (tempo final).....	124
Tabela 22 - Porcentagem de sementes de rúcula germinadas (tempo zero)	128
Tabela 23 - Porcentagem de sementes de rúcula germinadas (tempo final)	128
Tabela 24 - Amostras de solo para realização de análises moleculares nos tempos zero e final (180 dias).....	136
Tabela 25 - Lista de primers utilizados para amplificação de diferentes alvos a partir do DNA total.....	138

Tabela 26 - Protocolo de amplificação da primeira reação de PCR para o grupo de Bactéria	139
Tabela 27 - Protocolo de amplificação da segunda reação de PCR para o grupo de Bactéria	139
Tabela 28 - Protocolo de amplificação da primeira reação de PCR para o grupo de Fungo	140
Tabela 29 - Protocolo de amplificação da segunda reação de PCR para o grupo de Fungo	140
Tabela 30 - Coeficientes de correlação dos parâmetros ambientais gerado por RDA baseado nos perfis de DGGE das amostras de solo. Software CANOCO 4.5.....	149
Tabela 31 - Número de bandas dos grupos formados com base na análise de DGGE para comunidades de fungos totais (região interespaçadora ITS).....	152

LISTA DE ABREVIATURAS

AN	Ágar nutriente
APS	Persulfato de amônia
BH	Meio Bushnell-Haas
Bmax	Valor máximo de biodegradação previsto (SCHMIDT et al., 1985)
BmaxT	Tempo estimado para o valor máximo de biodegradação previsto (SCHMIDT et al., 1985)
BRminT	Tempo estimado para o término da biodegradação (MEMBRÉ et al., 1996)
Bs	Biossurfactante (ramnolipídeo) produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI
C1	Contaminação 1
C2	Contaminação 2
CCD	Cromatografia em camada delgada
CN	Caldo nutriente
CS	Controle do solo
DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol
DCPIP_{ox}	2,6-diclorofenol-indofenol em seu estado oxidado (azul)
DCPIP_{red}	2,6-diclorofenol-indofenol em seu estado reduzido (incolor)
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
dNTPs	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
Dq	Detergente químico – Ecoquímica [®]
E₂₄	Índice de emulsificação
GI	Índice de germinação (<i>Germination Index</i>)
HPA	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
MEOR	Recuperação Microbiana de Óleos (<i>Microbial Enhanced Oil Recovery</i>)
MMM	Meio mineral mínimo

MO	Matéria orgânica
OLU	Óleo lubrificante automotivo usado
pb	Pares de base
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCoA	Análise de coordenadas principais (<i>Principal Coordinates Analysis</i>)
PCR	Reação em cadeia de polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Ps	Inóculo de <i>P. aeruginosa</i> LBI
qPCR	PCR quantitativo ou PCR em tempo real (<i>Real Time PCR</i>)
RDA	Análise de redundância (<i>Redundancy analysis</i>)
RL	Ramnoflipídio
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	Ácido ribonucleico ribossomal
SB	Soma de bases
SqC	Surfactante químico comercial – Tween80
t0	Tempo zero (t = 0)
tf	Tempo final (t = 180 dias)
TGGE	Eletroforese em gel com gradiente de temperatura (<i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i>)
T-RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminal (<i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
UCM	Mistura complexa não-decomposta (<i>Unresolved Complex Mixture</i>)
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV-Vis	Ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1.	REVISÃO DE LITERATURA	21
1.1.	Soja	21
1.1.1.	Borra de soja.....	26
1.2.	Impacto ambiental por petróleo e derivados.....	27
1.3.	Biorremediação de áreas impactadas: hidrocarbonetos de	
petróleo		29
1.4.	Surfactantes	31
1.5.	Biossurfactantes.....	32
1.5.1.	Ramnolipídios.....	34
1.5.2.	Produção de biossurfactantes a partir de substratos alternativos	36
1.6.	Biodegradação de hidrocarbonetos.....	38
1.7.	Ecotoxicidade.....	40
1.8.	Diversidade microbiana em solos	43
2.	OBJETIVOS.....	47
2.1.	Geral.....	47
2.2.	Específicos.....	47
3.	CAPÍTULO 1.....	49
	Produção de ramnolipídios por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI a partir de	
	borra de soja	
3.1.	Introdução	50
3.2.	Material e Métodos.....	51
3.2.1.	Material	51
3.2.1.1.	Meios de cultura.....	51
3.2.1.1.1.	Caldo nutriente e ágar nutriente	51
3.2.1.1.2.	Meio salino	51
3.2.1.1.3.	Meio mineral com óleo de soja.....	51
3.2.1.1.4.	Meio mineral com borra de soja	51

3.2.1.2.	Micro-organismo.....	52
3.2.2.	Métodos	52
3.2.2.1.	Condições de cultivo	52
3.2.2.2.	Processamento das amostras	53
3.2.2.3.	Determinação da biomassa microbiana	53
3.2.2.4.	Avaliação da produção de ramnolipídios.....	54
3.2.2.4.1.	Determinação da concentração de ramnolipídios – CCD.....	54
3.2.2.4.2.	Determinação da concentração de ramnolipídios – HPLC	54
3.2.2.4.2.1.	Derivatização	54
3.2.2.4.2.2.	HPLC	55
3.2.2.5.	Caracterização do biossurfactante	55
3.2.2.5.1.	Índice de emulsificação - E_{24}	56
3.2.2.6.	Recuperação dos ramnolipídios e cálculo de rendimento	57
3.3.	Resultados.....	58
3.3.1.	Determinação da biomassa e do pH do caldo livre de células	58
3.3.2.	Quantificação de ramnolipídios	59
3.3.3.	Rendimento na produção de ramnolipídios.....	60
3.3.4.	Determinação da tensão superficial	61
3.3.5.	Índice de emulsificação – E_{24}	63
4.	CAPÍTULO 2	65
	Biodegradação de óleo lubrificante automotivo usado associado ao solo sob diferentes condições de tratamento	
4.1.	Introdução	66
4.2.	Material e Métodos.....	68
4.2.1.	Material	68
4.2.1.1.	Detergente Químico	68
4.2.1.2.	Soluções aquosas de surfactantes químicos e biossurfactante ..	68
4.2.1.3.	Óleo lubrificante automotivo usado - OLU.....	69
4.2.1.4.	Meios de cultura	69
4.2.1.4.1.	Bushnell-Haas (BH).....	69
4.2.1.5.	Soluções.....	69
4.2.1.5.1.	Água destilada isenta de gás carbônico	69

4.2.1.5.2.	Solução de hidróxido de potássio – KOH 0,200 M	70
4.2.1.5.3.	Solução de ácido clorídrico - HCl 0,100 M	70
4.2.1.5.4.	Solução de cloreto de bário - BaCl ₂ .2H ₂ O 0,500 M	71
4.2.1.5.5.	Solução indicadora de fenolftaleína.....	71
4.2.1.5.6.	Solução indicadora de vermelho de metila.....	71
4.2.1.5.7.	DCPIP	71
4.2.1.6.	Micro-organismo.....	71
4.2.1.7.	Solo	72
4.2.2.	Métodos	72
4.2.2.1.	Solo	72
4.2.2.1.1.	Contaminação 1	72
4.2.2.1.2.	Contaminação 2	73
4.2.2.2.	Inóculo lixiviado para ensaios de colorimetria	74
4.2.2.3.	Respirometria	74
4.2.2.3.1.	Montagem dos ensaios	76
4.2.2.3.2.	Acompanhamento da biodegradação	78
4.2.2.3.3.	Modelagem Matemática	79
4.2.2.4.	Colorimetria	80
4.2.2.4.1.	Montagem dos ensaios	81
4.2.2.4.2.	Acompanhamento da biodegradação	82
4.2.2.4.2.1.	Reta padrão DCPIP	82
4.3.	Resultados.....	84
4.3.1.	Respirometria	84
4.3.1.1.	Modelagem Matemática	90
4.3.1.1.1.	Comparação entre os modelos matemáticos	99
4.3.2.	Colorimetria.....	100
4.3.3.	Discussão dos resultados.....	103
5.	CAPÍTULO 3	107
	Efeitos dos processos de biorremediação de solos contaminados com óleo lubrificante na composição físico-química e na ecotoxicidade dessas amostras	
5.1.	Introdução	108

5.2.	Material e Métodos.....	109
5.2.1.	Material	109
5.2.1.1.	Meios de cultura	109
5.2.1.1.1.	Plate Count Agar (PCA)	109
5.2.1.1.2.	Saboraud	109
5.2.1.2.	Soluções.....	109
5.2.1.2.1.	Solução salina 0,85%	109
5.2.1.2.2.	Sulfato de zinco 0,05 M	110
5.2.1.3.	Solo	110
5.2.2.	Métodos	110
5.2.2.1.	Solo	110
5.2.2.1.1.	Amostras de solo – tempo zero	110
5.2.2.1.2.	Amostras de solo – tempo final (180 dias)	110
5.2.2.2.	Inóculo lixiviado para contagem microbiana.....	111
5.2.2.3.	Análises realizadas nas amostras de solo	111
5.2.2.3.1.	Análises físico-químicas	112
5.2.2.3.2.	Contagem de UFC.....	112
5.2.2.3.3.	Bioensaios de Toxicidade.....	113
5.2.2.3.3.1.	Montagem dos ensaios.....	114
5.2.2.3.3.2.	Análise dos resultados.....	114
5.3.	Resultados.....	115
5.3.1.	Solo - Análises físico-químicas.....	115
5.3.1.1.	Composição granulométrica.....	115
5.3.1.2.	Composição físico-química	116
5.3.2.	Contagem de UFC	120
5.3.3.	Bioensaios de Toxicidade	123
5.3.3.1.	<i>Lactuca sativa</i>	124
5.3.3.2.	<i>Eruca sativa</i>	127
5.3.3.3.	Discussão dos resultados.....	131
6.	CAPÍTULO 4	134
	Alteração da comunidade microbiana do solo contaminado com óleo lubrificante usado após processo de biorremediação	

6.1.	Introdução	135
6.2.	Material e Métodos.....	136
6.2.1.	Material	136
6.2.2.	Métodos	137
6.2.2.1.	Extração de DNA total das amostras de solo	137
6.2.2.2.	Amplificação de genes específicos do DNA extraído por PCR	138
6.2.2.3.	Análise da estrutura da comunidade microbiana pela técnica de PCR-DGGE	141
6.2.2.4.	Análises estatísticas.....	141
6.3.	Resultados.....	143
6.3.1.	Análise da estrutura da comunidade microbiana pela técnica de PCR-DGGE	143
6.3.2.	Análises estatísticas.....	144
7.	CONCLUSÕES	155
8.	REFERÊNCIAS.....	157

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Soja

A soja (*Glycine max*) é uma importante leguminosa usada para alimentação mundial, cujas sementes constitui-se por cerca de 40% de proteínas e 20% de óleos. É destacada por ser pobre em gordura saturada e ser um alimento vegetal que possui todos os aminoácidos essenciais em sua composição. Ademais, é uma boa fonte de fibra, ferro, cálcio, zinco e vitaminas (XU et al., 2011).

Sua exploração e consumo como fonte de proteína no Oriente ocorre por mais de cinco mil anos, enquanto seu cultivo no Ocidente iniciou-se apenas no século XX (XU et al., 2011). O começo de sua exploração comercial ocorreu nos EUA, onde foram cultivados cerca de dois milhões de hectares de soja forrageira em 1940 (EMBRAPA, 2004).

A exploração da soja era realizada principalmente para forragem, todavia havia o cultivo de grãos em menor porcentagem. Em meados da década de 1960, a soja forrageira praticamente desapareceu dos campos agrícolas devido ao crescimento exponencial da produção de grãos que superara a produção para forragem a partir de 1941. O aumento do cultivo da soja como grãos ocorreu principalmente nos EUA, Brasil e Argentina, conforme Figura 1 (EMBRAPA, 2004). Além disso, é importante ressaltar que a demanda crescente na produção de grãos de soja reflete na redução do consumo de gordura animal e a substituição por óleo de soja.

Conforme apresentado na Figura 1 e registrado na Tabela 1, nosso país foi o segundo maior produtor mundial de soja no ano 2000. Em 2003, o Brasil ainda figurava como o segundo produtor mundial, responsável por 52 das 194 milhões de toneladas produzidas em nível global ou 26,8% da safra mundial.

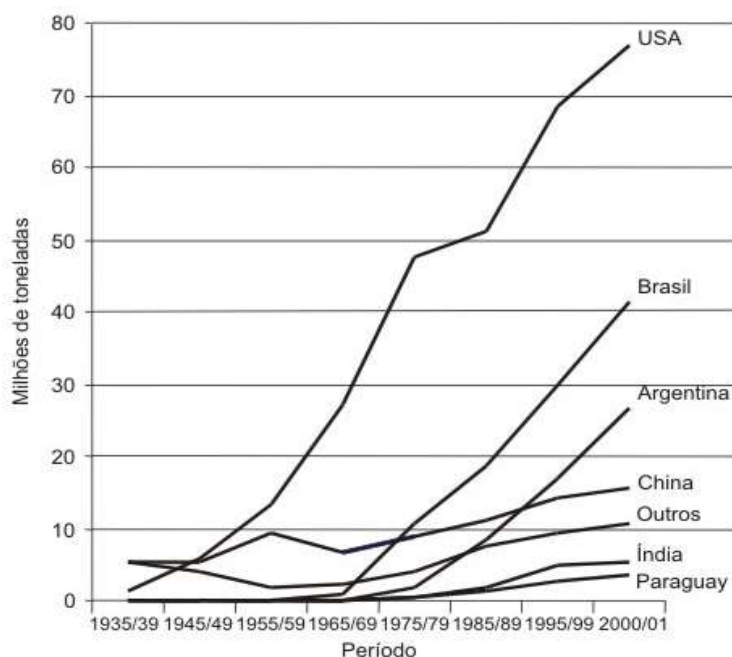


Figura 1 - Produção mundial de soja 1935-2001 (Fonte: Embrapa, 2004).

É possível observar ainda uma crescente produção mundial de soja nos anos seguintes sendo que, em 2009, a produção mundial de soja foi de 210,9 milhões de toneladas, cerca de 53% da produção mundial de oleaginosas. Nos EUA, a porcentagem de área plantada de soja atingiu 30,0% (Figura 2) (ASA, 2012).

No ano de 2010, as seis maiores nações produtores de soja seguiam em sequência: EUA, Brasil, Argentina, China, Índia e Paraguai (Tabela 1). No entanto, a safra brasileira entre 2000 e 2010 obteve um aumento de 109,3% enquanto que a produção norte-americana cresceu apenas 20,7%. Deste modo, a diferença em toneladas de soja diminuiu de 129,3% para 32,2% durante o período, demonstrando a posição de destaque do Brasil no mercado internacional de soja (FAOSTAT, 2012).

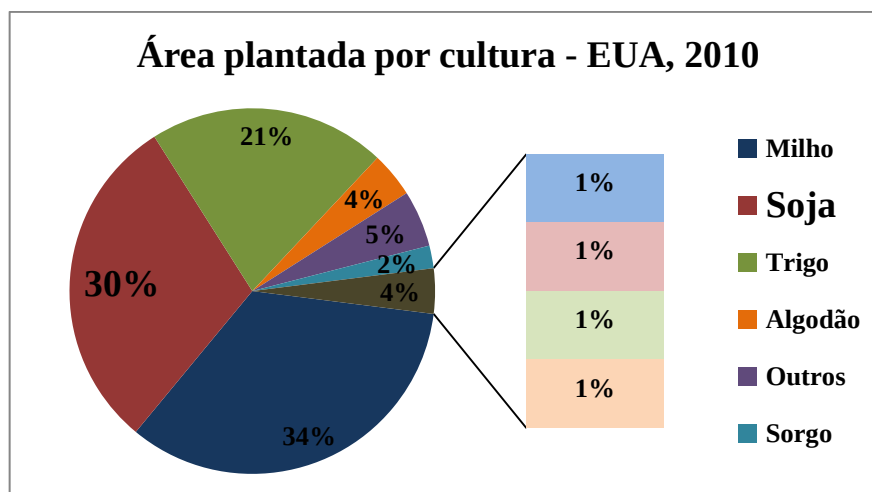


Figura 2 - Culturas agrícolas por área plantada nos EUA em 2010 (Fonte: ASA, 2012).

Tabela 1 - Ranking dos países produtores de soja nos anos de 2000 e 2010

Produção de soja / país							
Ano base 2010				Ano base 2000			
Rank	País	Produção (US\$1.000)	Produção (ton)	Rank	País	Produção (US\$1.000)	Produção (ton)
1	EUA	23.863.248	90.609.800	1	EUA	19.886.638	75.053.800
2	Brasil	15.927.953	68.518.700	2	Brasil	8.664.921	32.735.000
3	Argentina	14.172.365	52.677.400	3	Argentina	5.362.245	20.135.800
4	China	3.250.694	15.083.204	4	China	3.296.535	15.411.495
5	Índia	2.539.249	9.810.000	5	Índia	1.342.727	5.275.800
6	Paraguai	1.951.814	7.460.440	6	Paraguai	776.135	2.980.060
7	Canadá	1.074.601	4.345.300	7	Canadá	608.036	2.703.000
8	Uruguai	477.027	1.816.800	8	Bolívia	278.797	1.197.250
9	Ucrânia	186.993	1.680.200	9	Indonésia	266.786	1.017.630
10	Bolívia	396.576	1.637.000	10	Itália	159.499	903.490
11	Rússia	94.719	1.222.370	11	Nigéria	101.825	429.000
12	Indonésia	235.100	908.111	12	Coréia do Sul	89.419	350.000
13	África do Sul	149.486	566.000	13	Rússia	82.648	341.920
14	Itália	129.603	552.500	14	Tailândia	84.431	312.432
15	Sérvia	143.742	540.859	15	Japão	35.383	235.000
16	Nigéria	95.067	393.860	16	Sérvia	45.833	170.593
17	Coréia do Sul	89.419	350.000	17	África do Sul	39.343	153.472

Fonte: FAOSTAT, 2012

Na produção agrícola brasileira, a soja está abaixo somente da cana-de-açúcar, que vem sendo intensamente cultivada em função do etanol e políticas de bioenergia em evidência no país desde a criação do Proálcool na década de 1970.

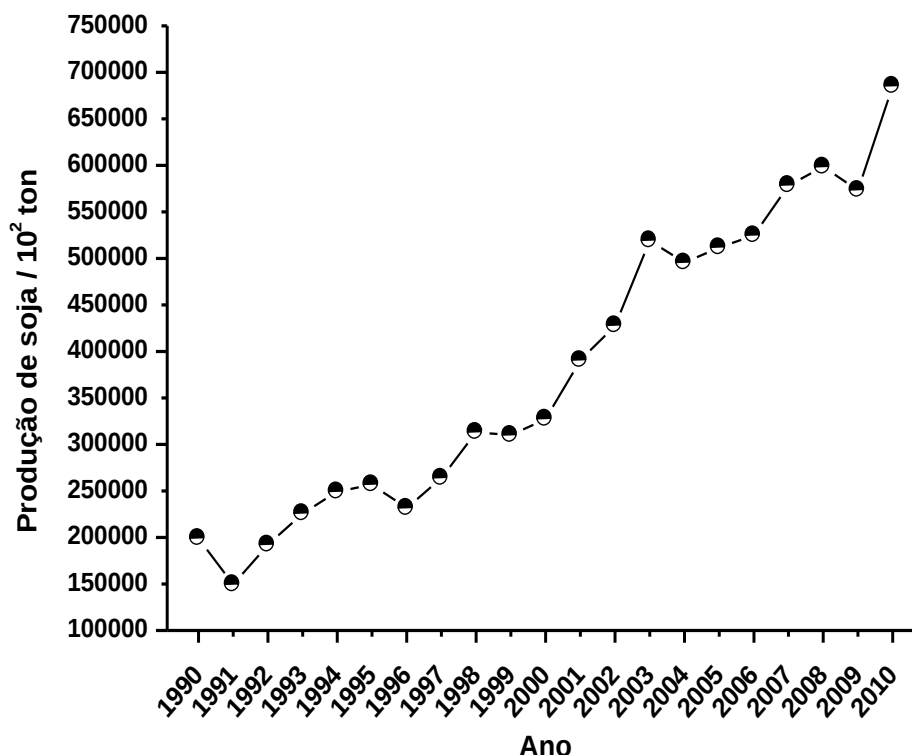


Figura 3 - Produção brasileira de soja 1990-2010 (Fonte: FAO, 2012).

Os crescentes valores na safra da soja no país devem continuar, segundo projeções do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Destacam-se os estados de Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul que, juntos, representaram e representarão 62,46% e 70,10% do total nacional nos anos de 2007/08 e 2018/19, respectivamente (Tabela 3). Neste período, a produção brasileira aumentará 34,70% e atingirá, em 2018/19, a marca de mais de 80 milhões de toneladas de soja (BRASIL, 2009).

O Brasil também se beneficiará nestes 11 anos com o crescimento de 41,60% nas exportações e de 4,00% na relação com o comércio mundial de soja. Seguem o mesmo caminho a produção, o consumo e as exportações de óleo e de farelo de soja. Em relação às projeções para o mercado internacional, o país terá um crescimento nas exportações de óleo e farelo de soja, respectivamente, de 40,19% e 13,87%, conforme Tabela 3 (BRASIL, 2009).

Tabela 3 - Projeções 2008/09 a 2018/19 na produção, consumo e exportação de soja, óleo de soja e farelo de soja no Brasil

		Unidade	2007/08	2018/19	Variação (%)
Soja	Produção - Brasil	10 ³ ton	60.072	80.914	34,70
	<i>Produção - Mato Grosso</i>	10 ³ ton	17.848	28.202	58,01
	<i>Produção - Paraná</i>	10 ³ ton	11.896	16.861	41,74
	<i>Produção - Rio Grande do Sul</i>	10 ³ ton	7.775	11.655	49,90
	Consumo	10 ³ ton	35.050	44.406	26,69
	Exportação	10 ³ ton	25.750	36.461	41,60
	Relação Exportação Brasil/Comércio Mundial	%	36,00	40,00	4,00
Óleo de soja	Produção	10 ³ ton	6.156	8.405	36,53
	Consumo	10 ³ ton	4.100	5.382	31,27
	Exportação	10 ³ ton	2.120	2.972	40,19
Farelo de soja	Produção	10 ³ ton	24.948	33.349	33,67
	Consumo	10 ³ ton	11.800	18.224	54,44
	Exportação	10 ³ ton	13.200	15.031	13,87
Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009)					

1.1.1. Borra de soja

Neste contexto, insere-se a problemática do resíduo da borra de soja gerado nos processos industriais de refino de óleo de soja. Com o aumento da produção de óleo, haverá uma maior geração deste composto que, consequentemente, demandará formas de tratamento para posterior descarte no meio ambiente.

A borra é gerada durante a produção do óleo de soja no processo de neutralização. Após a moagem dos grãos e extração do óleo, há um procedimento de refino que inclui esta etapa. Este processo é realizado por método físico-químico, pela adição de ácidos e álcalis e tem a função de neutralizar e remover o excesso de ácidos graxos livres presente no óleo. Também, utilizam-se centrífugas para separação do óleo e do resíduo (ABIOVE, 2012).

Deste modo, é gerado o principal resíduo da indústria de óleo de soja denominado borra de soja. Sua produção pode atingir 4% do processo de refino do óleo (ABIOVE, 2012), sendo que variações ocorrem em função dos ácidos graxos presente no óleo (OLIVEIRA et al., 2009).

A geração da borra de soja tornou-se significativa em decorrência do aumento na produção e consumo de óleo de soja. Estima-se que, com o crescimento de 36,53% na produção de óleo de soja no Brasil entre 2007/08 e 2018/19 (Tabela 3), a geração de borra saltará de 246,2 para aproximadamente 336,2 mil toneladas. Estes valores evidenciam a necessidade de se encontrar aplicações sustentáveis para este resíduo uma vez que sejam minimizados seu impacto no meio ambiente.

Sabe-se que este resíduo pode seguir diferentes destinos, como: (1) indústrias produtoras de sabão, sendo vendida a cerca de 10% do valor do óleo de soja refinado; (2) estações de tratamento que aumentam o custo de produção para a indústria, e (3) descarte direto em aterros sanitários ou de forma irresponsável (DUMONT; NARINE, 2007). Seguindo diretamente para o meio ambiente, os resíduos e efluentes gerados por essas indústrias são significativas fontes poluidoras de corpos d'água e solos em função da baixa degradabilidade dos componentes lipídicos, encontrados em altas concentrações nos efluentes (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

Por outro lado, a borra de soja é rica em matéria graxa e uma potencial fonte de carbono para processos biotecnológicos. A utilização da borra de soja como substrato para produção de metabólitos microbianos de aplicação biotecnológica torna-se uma importante alternativa no destino final deste resíduo. Além disso, esta estratégia de utilizar substratos alternativos, tais como os resíduos agroindustriais, reduzem os custos de produção do composto de interesse.

1.2. Impacto ambiental por petróleo e derivados

Os derrames de petróleo e/ou seus derivados causam danos consideráveis ao meio ambiente, gerando uma preocupação pública enorme, que pressiona para soluções rápidas e econômicas. Estima-se que cerca de 0,40% da produção mundial de petróleo eventualmente atinge os oceanos (BANAT et al. 2000) e os vários acidentes com derramamento de petróleo nos últimos anos evidenciam estes danos (MONTAGNOLLI; BIDOIA, 2012).

Os grandes derramamentos de petróleo e derivados são gerados em todas suas etapas de produção (exploração, refino e transporte), como acidentes em: tanques marinhos, perfuração de leitos complexos, frotas marítimas, refinarias, e vazamentos associados (EL-TARABILY, 2002; MILLE et al., 2006).

No Brasil, muitos acidentes envolvendo petróleo e derivados, como gasolina e óleo combustível, têm ocasionado sérios problemas ambientais. Em 1998, 1.200 m³ de óleo combustível foram liberados por causa da corrosão de oleodutos no município de Cubatão-SP. A corrosão de dutos também foi responsável por 1.300 m³ de óleo combustível derramados na Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, que vinha sofrendo constantes contaminações por derramamentos de óleo (BENINCASA, 2007).

Os óleos lubrificantes representam um dos principais derivados do petróleo, atingindo cerca de 60% dos produtos petroquímicos, e tem grande importância devido a seu massivo uso automobilístico e, principalmente, industrial (CASAS-LIZ; PINTO, 2005). Entretanto, este alto consumo também reflete em graves problemas ambientais (RAHMAN et al., 2002).

Os impactos causados por lubrificantes ocorrem geralmente em vazamentos nos tanques de armazenagem que, apesar de representarem uma pequena fração na contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, são geralmente crônicos (LOPES et al., 2008). Assim, a poluição contínua e prolongada proporciona alta persistência ambiental aos óleos lubrificantes na contaminação do solo e de águas superficiais e subterrâneas (CHAVAN; MUKHERJI, 2008).

A persistência de hidrocarbonetos de petróleo no ambiente depende de vários fatores, tais como: estrutura química, concentração e dispersão (ATLAS, 1981; BAMFORTH; SINGLETON, 2005; MILLE et al., 2006). Na ocorrência de desastres, são geralmente utilizados tratamentos físico-químicos de alto custo possivelmente capazes de impactar a área afetada pelo uso de agentes químicos como dispersantes e/ou catalisadores (ROSATO, 1997).

Tratamentos físicos convencionais separam solo e contaminantes sem destruí-los ou modificá-los quimicamente, porém possuem altos custos e muitas limitações, sendo que a maior parte dos hidrocarbonetos começa a ser absorvida na própria matriz do solo, diminuindo sua eficiência de remoção e absorção. Processos biológicos, por sua vez, são tecnologias limpas de descontaminação promissoras, principalmente por combinar simplicidade e custo-efetividade. Assim, dentre as novas estratégias, a biorremediação emerge como a menos agressiva e a mais adequada para manutenção do equilíbrio ecológico (ROSATO, 1997; MONTAGNOLLI; BIDOIA, 2012).

1.3. Biorremediação de áreas impactadas: hidrocarbonetos de petróleo

A capacidade microbiana de utilizar hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono foi primeiramente demonstrada por Zobell (1946), que revelou que estes organismos eram amplamente distribuídos na natureza. O autor descreveu mais de 100 espécies de bactérias, pertencentes a 30 gêneros diferentes, capazes de metabolizar petróleo. Posteriormente, Bartha e Atlas (1977) expandiram esta lista em mais 22 gêneros bacterianos, 14 de fungos e 1 de alga para ambientes aquáticos.

Para garantir uma boa aplicação prática, qualquer processo de biorremediação deve demonstrar que a remoção de contaminantes é o efeito primário de biodegradação e que a taxa de degradação pelo tratamento é maior do que a taxa natural de descontaminação. Dentre as dificuldades no desenvolvimento de métodos de biorremediação, está a obtenção de bons resultados no campo, assim como no laboratório (JUHASZ et al., 2000).

Há também diversas estratégias para aperfeiçoamento dos processos de biorremediação natural e de baixo custo, tais como: atenuação natural, bioestimulação, bioaeração, bioaugmentação, *landfarming*, compostagem e fitorremediação (SKIPPER, 1999).

Na biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo, a introdução de nutrientes (bioestimulação) e oxigênio (bioaeração) favorecem o metabolismo microbiano na remoção destes poluentes (SEKLEMOVA et al., 2001). Outro procedimento comumente utilizado é a inoculação de um consórcio microbiano enriquecido no solo, denominado bioaugmentação (RICHARD; VOGEL, 1999; BARATHI; VASUDEVAN, 2001).

Para melhor estabelecer as condições ótimas de biodegradação, é importante conhecer as características fundamentais da área impactada, tais como: concentração de óleo residual; densidade populacional dos micro-organismos degradadores e potencial microbiano de biodegradação. Observa-se geralmente que uma maior biodegradação de hidrocarbonetos depende da presença de micro-organismos específicos. Além disso, a composição da população microbiana é diretamente afetada pelas condições ambientais e pela composição dos hidrocarbonetos (ADMON et al., 2001). Todavia, nestas comunidades indígenas comumente não há espécies com habilidades enzimáticas necessárias que

permitem uma rápida biodegradação, resultando em processos de longo prazo (DÍAZ-RAMÍREZ et al., 2008).

Neste sentido, a biorremediação de solos contaminados com óleos minerais ainda é um desafio devido à baixa biodisponibilidade e complexa composição química destes produtos (LEE et al., 2008; SABATÉ et al., 2004). A concentração residual de hidrocarbonetos e a presença de possíveis metabólitos oxidativos com riscos à saúde humana podem permanecer no solo, após o tratamento (NOCENTINI et al., 2000).

No perfil cromatográfico dos óleos lubrificantes minerais (LLADÓ et al., 2012), de origem pelos óleos pesados, encontra-se uma fração considerável da chamada mistura complexa não-decomposta (Unresolved Complex Mixture - UCM). Na realidade, pouco se sabe acerca da composição da UCM, apesar de ser o componente principal de óleos combustíveis (WANG; FINGAS, 2003), que se compreendem em hidrocarbonetos ramificados e cíclicos alifáticos e aromáticos, dentre eles os HPA que são caracterizados por elevada resistência à biodegradação (NIEVAS et al., 2008).

Os HPA são frequentemente encontrados no meio ambiente, seja devido à deposição atmosférica, por causas naturais como queima de combustível e biomassa e vulcanismo, ou, principalmente, em função de acidentes ambientais com hidrocarbonetos e derivados de petróleo (LORS et al., 2010). Estes desastres representam uma preocupação muito grande para o meio ambiente em razão das propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas apresentadas por estes compostos (HENRY, 1998; WHITE; CLAXTON, 2004)

Embora estas moléculas aromáticas possam sofrer oxidação química, fotólise, adsorção e volatilização, a degradação microbiana de HPA é, na maioria dos casos, o principal processo envolvido no tratamento de ecossistemas terrestres (PARK et al., 1990; LORS; MOSSMANN, 2005).

Na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, já foram realizados diversos estudos adotando diferentes estratégias (CHAGAS-SPINELLI et al., 2012; MONTAGNOLLI; BIDOIA, 2012), porém eles indicaram a degradação de uma fração específica dessas substâncias. Em muitos casos, houve a remediação preferencial dos compostos mais leves, enquanto em outros foram direcionadas para os hidrocarbonetos mais pesados (HUANG et al., 2004). Ainda, a remediação de HPA

encontra limitações pela sua hidrofobicidade, como adsorção e biodisponibilidade (JOHNSEN et al., 2005).

Em se tratando de ambiente aquático, a biodegradação de poluentes é limitada em função da biodisponibilidade de nutrientes (como nitrogênio e fósforo), necessários para o início do crescimento microbiano. A utilização de sais solúveis contendo estes elementos é uma forma eficaz de otimizar os processos em condições laboratoriais. Porém, não se obtém o mesmo resultado em tratamentos *in situ*, devido à agitação insatisfatória do meio e pequena dissolução dos sais. Como alternativa viável, tem-se a utilização de biossurfactantes associada com a solução de nutrientes, pois o óleo será emulsificado pela ação do biossurfactante e, assim, proporcionará um rápido crescimento microbiano. Desta forma, uma vez que o número de células atinge o seu pico, a limitação de nutrientes não seria um problema para o seguimento do processo de biodegradação (THAVASI et al., 2011).

1.4. Surfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas ou anfifílicas, ou seja, compostos que apresentam uma parte apolar (hidrofóbica) e uma parte polar (hidrofílica) e podem ser insolúveis ou solúveis em solução aquosa. Estas moléculas agem na interface água/óleo, formando assim micelas de formas e tamanhos diferenciados (ROCHA, 2006; VAN HAMME et al., 2006).

Estes tensoativos são uma importante classe de produtos químicos especiais amplamente utilizados na indústria moderna (SILVA et al., 2007;. DEVELTER; LAURYSEN, 2010;. FRANZETTI et al., 2010). Em 2007, sua produção atingiu cerca de 10 milhões de toneladas (VAN BOGAERT et al., 2007). Neste contexto, o maior valor de mercado no setor refere-se aos detergentes para limpeza (até 50% da produção de surfactantes), totalizando cerca de 60 bilhões de dólares no ano de 2004 (SCHEIBEL, 2004).

Sabe-se que quase todos os agentes tensoativos comercialmente disponíveis hoje são quimicamente sintetizados a partir do petróleo. Logo, sendo os surfactantes químicos convencionais derivados de petróleo, eles estão sujeitos à disponibilidade de fontes fósseis e impõem ameaças potenciais para o ambiente, devido à sua natureza recalcitrante (MAKKAR et al., 2011; APARNA et al., 2012).

Os surfactantes são capazes de criar emulsões, permitindo uma maior solubilização dos compostos hidrofóbicos, como hidrocarbonetos de petróleo, em água. Estas moléculas anfipáticas atuam como dispersantes ou flocculantes, permitindo a suspensão de sólidos em meio líquido (MOLDES et al., 2011). Estas propriedades contribuem para o crescimento da indústria de surfactante, principalmente na biorremediação de locais contaminados por compostos hidrofóbicos. Este mercado movimentou cerca de 23,9 bilhões de dólares (AMI, 2008), ao passo que a produção mundial de surfactantes é cerca de 13 milhões de toneladas por ano (RUST, 2008; LEVISON, 2009).

Relacionando o consumo de petroquímicos na fabricação de surfactantes, sabe-se que 0,57 toneladas de intermediários petroquímicos são consumidas para cada tonelada de surfactante produzida (PATEL et al., 1999). Extrapolando estas proporções para a produção global de surfactantes, são consumidas, anualmente, 7,40 milhões de toneladas de petroquímicos (REZNIK et al., 2010).

Estima-se que cada tonelada de petroquímico utilizados na fabricação de surfactantes provoca a emissão de 4,27 toneladas de CO₂ e que o uso destes compostos gera a emissão anual de 31,6 milhões de toneladas de CO₂ no meio ambiente (PATEL et al., 1999). Além disso, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), a combustão de 1 litro de gasolina produz 8,8 kg de CO₂. Assim, Reznik et al. (2010) estimaram a emissão anual de CO₂, em função do uso de petroquímicos para produção de surfactantes, o equivalente à combustão de 13,63 bilhões de litros de gasolina.

Neste contexto, o acelerado desenvolvimento industrial e crescimento populacional estão continuamente ocasionando impactos ambientais, o que torna esta questão uma preocupação mundial. Deste modo, a tendência para a utilização de tecnologias ecologicamente viáveis aumentou a busca por compostos biodegradáveis originados de substratos renováveis ou resíduos industriais (MARCHANT;BANAT, 2012).

1.5. Biossurfactantes

A busca por novas tecnologias de produção de surfactantes está, atualmente, em destaque nos avanços biotecnológicos proporcionados pela ciência. Observa-se um elevado aumento no número de patentes envolvendo biossurfactantes no início

deste século, sendo que mais de 70% destas foram registradas entre 2000 e 2010. Em contrapartida, a maioria dos registros de patentes para surfactantes químicos foi realizada na década de 1900, com uma queda abrupta, após o ano 2000 (MÜLLER et al., 2012).

Os biossurfactantes são, portanto, a escolha natural para tais processos, pois possuem diversas vantagens, em comparação aos surfactantes sintéticos, tais como: (1) viabilidade de produção fermentativa, utilizando recursos renováveis; (2) efetividade em pequenas quantidades (ppm), mesmo sob condições extremas; (3) potencial seletivo e específico para diversas aplicações; (4) menor toxicidade; (5) maior biodegradabilidade; e (6) estabilidade a variações de pH, de salinidade e de temperatura (ABDEL-MAWGOUD, 2010; BANAT et al., 2010; CAMEOTRA et al., 2010; HAZRA et al. 2011).

Os biossurfactantes agem como tensoativos e são produzidos por micro-organismos para aumentar a acessibilidade de substratos hidrofóbicos às células, facilitando o metabolismo e o desenvolvimento da microbiota existente e, consequentemente, aumentando a biodegradação (ROCHA, 2006).

Tratam-se de metabólitos secundários que apresentam atividade tensoativa e são sintetizados por uma grande variedade de micro-organismos (BANAT et al., 2000; DESAI; BANAT, 1997). A maior vantagem dos biossurfactantes, quando comparado aos surfactantes sintéticos, está na sua diversidade estrutural e aceitabilidade ambiental por serem biodegradáveis, biocompatíveis, menos tóxicos, com maior especificidade, possibilidade de produção *in situ* e também a partir de substratos renováveis e resíduos agroindustriais (MULLIGAN, 2009).

A grande variedade e o potencial dos biossurfactantes possibilitam várias aplicações industriais: alimentos, petroquímica, mineração, agricultura, cosméticos, farmacêutica, têxtil, couro, construção civil, tintas, química e outras. Ademais, estas moléculas têm a capacidade de diminuir tensão superficial e interfacial entre sólidos, líquidos e gases e possuem importantes propriedades, tais como: detergência, emulsificação, formação de espuma, dispersão, umedecimento e espessamento (DESAI; BANAT, 1997; BANAT et al. 2000; THANOMSUB et al., 2007; COIMBRA et al. 2009; MAKKAR et al., 2011).

Suas propriedades podem favorecer o crescimento microbiano, sequestrar metais pesados de ambientes contaminados, Recuperação Microbiana de Óleos - MEOR (*Microbial Enhanced Oil Recovery*), auxiliar na perfuração de poços

petrolíferos, produzir lubrificantes, facilitar a biorremediação de poluentes, entre outras aplicações. Assim, os biossurfactantes representam um material multifuncional, devido a tais características únicas e, portanto, uma importante alternativa para substituição de compostos e processos químicos (DESAI; BANAT, 1997; BANAT et al. 2000; MAKKAR et al., 2011; MONTAGNOLLI; BIDOIA, 2012).

Do ponto de vista ambiental, os biossurfactantes são amplamente aceitos no processo de remediação tanto em ambientes aquáticos quanto em terrestres (CAMEOTRA; BOLLAG, 2003; CAMEOTRA; MAKKAR, 2010).

Um biossurfactante é composto de uma porção hidrofílica - aminoácidos, peptídeos, mono/dissacarídeos, polissacarídeos - e uma porção hidrofóbica - ácidos graxos saturados ou insaturados (DESAI; BANAT, 1997; BANAT et al., 2000; SMYTH et al., 2010).

Sua composição química depende do micro-organismo produtor, do substrato e das condições do processo fermentativo. Neste sentido, os biossurfactantes são classificados por sua estrutura química (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; BANAT et al., 2000; CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; NITSCHKE et al., 2005a; VAN HAMME et al., 2006; SINGH et al., 2007). Estas moléculas possuem alta diversidade estrutural e suas principais classes incluem os glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, ácidos graxos e fosfolipídios e biossurfactantes poliméricos (MAKKAR; CAMEOTRA, 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2006).

Os micro-organismos produtores de biossurfactantes são geralmente isolados a partir de ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Isto geralmente ocorre uma vez que, na natureza, os biossurfactantes desempenham o papel fisiológico da biodisponibilidade crescente de moléculas hidrofóbicas que estão envolvidas na sinalização celular e processos de diferenciação, o que facilita o metabolismo destas moléculas como fontes de carbono pela microbiota (SINGH et al., 2007).

1.5.1. Ramnolipídios

Dentre a gama de micro-organismos produtores de biossurfactantes, as bactérias encontram-se em grande destaque. Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são capazes de sintetizar biossurfactantes conhecidos como ramnolipídios, que, estruturalmente, são glicolipídios contendo ácidos graxos ligados a moléculas de ramnose – Rha. A porção lipídica é representada pelo ácido β -

hidrodecanóico (HAUSER; KARNOVSKY, 1957; REILING et al., 1986; ZHANG; MILLER, 1992; LANG; WULLBRANDT, 1999; BANAT et al., 2000; MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; NITSCHKE et al., 2005b; MARCHANT; BANAT, 2012).

Bactérias do gênero *Pseudomonas*, mais especificamente *P. aeruginosa*, tratam-se de micro-organismos isolados de diferentes ambientes, mas também podem ser patógenos oportunistas em humanos, ocasionando sérias complicações (LYCZAK et al., 2000).

De acordo com Lang e Wagner (1987), a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* tem sido vastamente estudada, sendo relatadas misturas de espécies homólogas destes compostos: RL1 (RhaC₁₀C₁₀), RL2 (RhaC₁₀), RL3 (Rha₂C₁₀C₁₀) e RL4 (Rha₂C₁₀), conforme apresentado na Figura 4. Estes diferentes tipos de ramnolipídios possuem estrutura química e atividade de superfície semelhantes, além de apresentar uma massa molecular média de 577 u (TORRENS et al., 1998). Suas propriedades dependem da composição da mistura em relação às moléculas homólogas, sendo determinada pela linhagem bacteriana e pelas condições do meio de cultura e do cultivo (GUERRA-SANTOS et al., 1984).

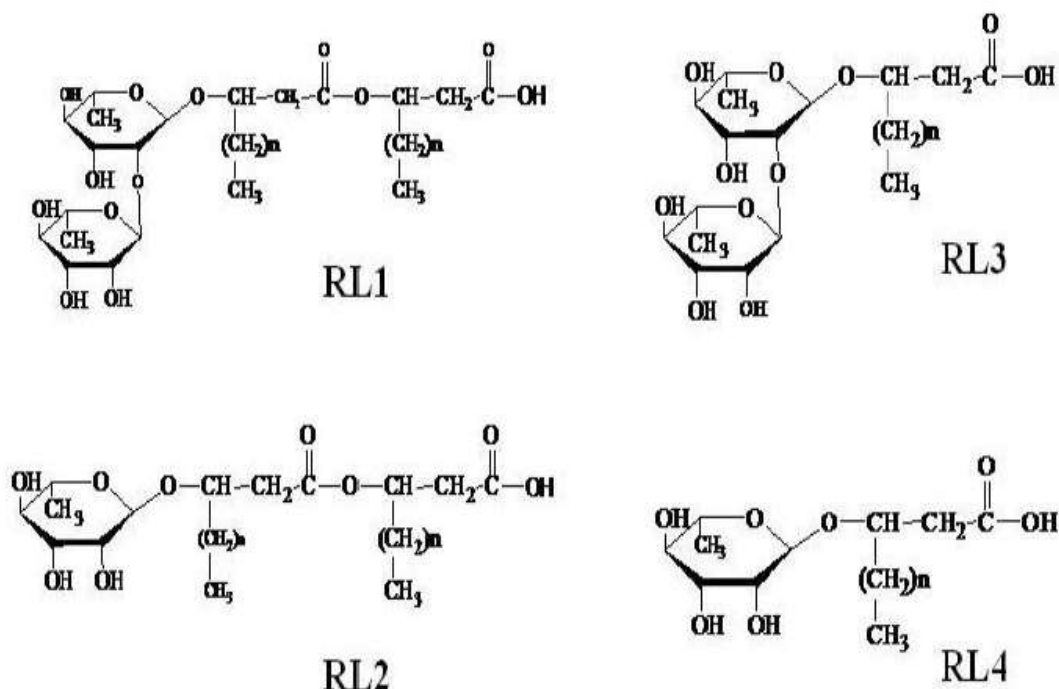


Figura 4 - Estruturas dos quatro principais homólogos de ramnolipídios. RL1 e RL2 – 2 e 1 moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas à duas moléculas de ácido graxo; RL3 e RL4 - 2 e 1 moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas à uma molécula de ácido graxo (LOVAGLIO, 2011).

Estes biotensoativos são considerados como a classe mais promissora em termos de produção industrial, por suas características físico-químicas e biológicas distintas e alta produtividade (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2004; NITSCHKE et al., 2005b; COSTA et al., 2006).

Além do uso industrial e potencial biorremediador, Wang et al. (2005) verificaram que ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* tem efeito algicida. Embora existam poucos relatos de atividade antimicrobiana dos biossurfactantes, o ramnolipídio produzido por *P. aeruginosa* LBI apresentou-se como agente microbiocida para micro-organismos Gram+ e Gram-, além de propriedades antifúngicas (BENINCASA et al., 2004) e antivirais (ABALOS et al., 2001). De acordo com Thanomsub et al. (2007), ramnolipídios produzido por *P. aeruginosa* B189 tem potencial para ser aplicado como agente antitumoral.

Outras aplicações incluem a produção de compostos químicos, a remediação ambiental e como agente de controle biológico (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2004). Desta forma, diversos estudos são realizados devido à sua extrema importância ambiental e industrial e em função da possibilidade de ser obtido por uma grande variedade de fontes de carbono (BENINCASA et al., 2002; BENINCASA et al., 2004; NITSCHKE et al., 2005b; COSTA et al., 2006).

O gênero *Pseudomonas* demonstrou-se eficaz na utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono para a produção de ramnolipídios. Estudos revelaram a produção a partir de melaço, soro de leite, resíduo da coco, glicerol, casca de laranja, entre outros (APARNA et al., 2012).

Os biossurfactantes produzidos nestas condições apresentaram-se estáveis (pH, temperatura e salinidade), com alta capacidade tensoativa e habilidade em emulsificar diferentes hidrocarbonetos. Consequentemente, estas moléculas são importantes ferramentas ecológicas para utilização na biorremediação de ambientes contaminados em função da possibilidade de sua produção a partir de substratos renováveis e resíduos agroindustriais (BANAT et al., 2000; CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; LOVAGLIO et al., 2011a; APARNA et al., 2012).

1.5.2. Produção de biossurfactantes a partir de substratos alternativos

No início do interesse científico pelos biossurfactantes, por volta de 1980 (SYLDATK; WAGNER, 1987), apenas hidrocarbonetos puros eram utilizados como

fonte de carbono para sua produção (FISH et al., 1982; HISATSUKA et al., 1971; ITOH; SUZUKI, 1972; SYLDATK et al., 1985), o que tornava o processo caro.

Apesar de suas inúmeras vantagens sobre os surfactantes químicos sintéticos, os biossurfactantes ainda possuem obstáculos econômicos no processo em larga escala e no custo de produção. Com isto, os esforços nas últimas décadas concentraram-se em minimizar os custos de produção, a fim de facilitar uma maior utilização comercial (KOSARIC, 1992; BOGNOLO, 1999; MUKHERJEE et al., 2006; COSTA et al., 2008; NITSCHKE et al., 2011).

Atualmente, os valores dos biossurfactantes nos EUA estão cerca de 20-30% mais caro do que os surfactantes de origem química (MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000). Neste sentido, estratégias alternativas têm sido adotadas, a fim de estabelecer uma relação de custo competitiva aos surfactantes sintéticos. Incluem-se: (1) desenvolvimento de micro-organismos geneticamente modificados para obtenção de melhor rendimento no processo fermentativo; (2) utilização de matérias-primas de maior custo-benefício para o crescimento microbiano e produção de biossurfactante, e (3) desenvolvimento de processos de produção em larga escala e economicamente viáveis (MUKHERJEE et al., 2006; HAZRA et al., 2011).

Assim, uma estratégia possível para reduzir os custos de produção é a utilização de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo tais como subproduto agrícola ou de processamento industrial (HENKEL et al., 2012). A utilização de resíduos agroindustriais como meio de produção torna-se uma estratégia economicamente interessante, uma vez que a matéria-prima representa cerca de 10-30% do custo total neste processo biotecnológico (CAMEOTRA; MAKAR, 1998; MUKHERJEE et al., 2006). Estes compostos são conhecidos por apresentar elevados níveis de hidratos de carbono e lipídios, ambos necessários para o crescimento de micro-organismos e biossíntese de biossurfactantes (NITSCHKE et al., 2005a,b; BENINCASA, 2007; ELSE et al., 2007).

Muitos gêneros microbianos demonstraram-se capazes de produzir biossurfactantes a partir destes resíduos – *Azotobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Candida*, *Pseudozyma*, *Trichosporon*, entre outros (KIM et al., 2000; BOUDOUR et al., 2004; THAVASI et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009; MAKAR et al., 2011; THAVASI et al., 2011).

Além disso, há uma grande variedade destes substratos alternativos utilizados na produção de biossurfactantes: borras obtidas pela fabricação de óleos vegetais (amendoim, coco, milho, oliva, soja); óleos de fritura de diferentes origens (girassol, oliva, soja), resíduos do processamento de vegetais (batata, cevada, caju, mandioca, trigo); melaço de cana de açúcar; soro de leite; turfa; resíduos oleosos de refinarias de petróleo; resíduos lignocelulósicos (cascas de laranja, espigas de milho) e; recentemente, glicerol, originado da produção de biodiesel (VATER, 1986; SHEPPARD; MULLIGAN, 1987; MERCADE et al., 1993; DESAI; BANAT, 1997; CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; FOX; BALA, 2000; HABA et al., 2000; NITSCHKE et al., 2004; BENINCASA, 2007; MOLDES et al., 2007; BARROS et al., 2008; SOBRINHO et al., 2008; HAVASI et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009; ROCHA et al., 2009; THAVASI et al., 2011; ACCORSINI et al., 2012; APARNA et al., 2012).

Quando se utiliza resíduos agroindustriais como substratos para a obtenção de biossurfactantes, o custo de produção e o volume de compostos a ser despejado no meio ambiente são menores. Assim, o impacto ambiental da indústria torna-se menor e, além disso, há a valorização econômica dos resíduos que seriam descartados (MULLIGAN, 2009; ACCORSINI et al., 2012).

1.6. Biodegradação de hidrocarbonetos

A respiração da comunidade microbiana é utilizada como indicador de atividade biológica, constituindo-se numa ferramenta importante para avaliar o potencial de biodegradação de compostos orgânicos. Neste sentido, ensaios de respirometria permitem avaliar este potencial, pois consiste na determinação da quantidade de CO₂ gerado pela degradação da matéria orgânica, a partir do metabolismo microbiano (SIVIERO, 1999).

O método respirométrico provê dados adequados para testar diferentes opções no tratamento biológico, como o efeito de diferentes fatores sobre a biodegradação. O teste pode ser usado também para confirmar a degradação de compostos, antes de ser utilizado em um processo de biorremediação em escala real para grandes áreas (BALBA et al., 1998).

Montagnolli et al. (2009), em ensaios de respirometria, obtiveram dados sobre a biodegradação de óleos lubrificantes utilizando respirômetros de Bartha e Pramer (1965). Modelos cinéticos foram aplicados às curvas de biodegradação, os quais

demonstraram que a taxa de biodegradação de óleos lubrificantes automotivos, quando comparadas às de óleos vegetais, tendem a diminuir mais lentamente e duram mais tempo. Entretanto, não foi determinada a influência de outros fatores na biodegradação, como por exemplo, a aplicação de biossurfactantes.

Lopes e Bidoia (2009) também avaliaram a biodegradação de óleos lubrificantes automotivos em meio líquido pelo mesmo método (BARTHA; PRAMER, 1965). Os resultados revelaram que o óleo usado possui maior biodegradabilidade, quando comparado a óleos novos, fenômeno explicado pelo processamento do lubrificante em altas pressões e temperaturas ao qual é submetido durante seu uso em motores automobilísticos. Igualmente ao estudo de Montagnoli et al. (2009), a pesquisa não se utilizou de biossurfactantes nos ensaios de biodegradação.

Somado aos estudos de respirometria, a capacidade de diferentes micro-organismos na biodegradação pode ser verificada também utilizando a técnica colorimétrica baseada no indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Com sua adição ao meio de cultura, é possível avaliar a capacidade dos micro-organismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato e sua consequente biodegradação pela alteração de cor do DCPIP de azul, estado oxidado, para incolor, estado reduzido (BIDOIA et al., 2010).

Hanson et al. (1993) desenvolveram a técnica de avaliação da biodegradação com DCPIP e, em seu trabalho, realizaram uma possível aplicação do indicador em meio Bushnell-Haas no *screening* de micro-organismos na degradação de petróleo. Nesse experimento, bactérias com alto potencial biodegradador foram capazes de tornar o meio incolor, após 24 h de incubação. Contudo, o tempo necessário de descoloração para cada cultura foi considerado um indicador de suas respectivas habilidades de metabolismo para a substância em análise.

Mariano et al. (2007) demonstraram que bactérias encontradas em água subterrânea, próximo a um vazamento de combustível, têm a capacidade de biodegradar óleo diesel em curto prazo. Assim, a técnica revelou-se eficiente em identificar a microbiota melhor adaptada em biodegradar hidrocarbonetos.

Em 2008, Mariano et al. estudaram diferentes culturas bacterianas e consórcios microbianos na biodegradação de óleo diesel comercial e intemperizado, sem o uso de biossurfactantes, por duas metodologias: método respirométrico de Bartha (BARTHA; PRAMER, 1965; CETESB, 1990; ABNT, 1999) e descoloração de DCPIP (HANSON et al., 1993; BIDOIA et al., 2010). Seus resultados revelaram que

ambos os procedimentos foram capazes de avaliar a ação dos diferentes micro-organismos na degradação deste hidrocarboneto e estabelecer a velocidade da biodegradação.

1.7. Ecotoxicidade

A ecotoxicologia é o ramo da toxicologia que trata do estudo dos efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos nos ecossistemas, causando impacto nas comunidades animais, vegetais e microbianas (FORBES; FORBES, 1994).

Apesar da caracterização da poluição e da concentração dos poluentes serem realizadas por métodos físico-químicos, a qualidade global do solo contaminado não pode ser inferida apenas por meio destas análises. No que diz respeito à ecotoxicidade dos poluentes, as metodologias mais adequadas na determinação dos seus riscos sobre a ecologia do solo e o meio ambiente são as técnicas biológicas (TANG et al., 2011).

Segundo Smaka-Kincl et al. (1997), testes ecotoxicológicos são indispensáveis para avaliar as reações dos organismos vivos à poluição ambiental e indicar os possíveis efeitos sinérgicos dos diversos poluentes, enquanto análises físico-químicas geram informações isoladas da presença e concentração de diferentes compostos. Logo, estas análises não são suficientes para avaliar os efeitos biológicos, pois não é possível avaliar todos os compostos e efeitos sinérgicos que contribuem para a toxicidade do poluente (BANKS; SCHULTZ, 2005; PLAZA et al., 2005).

Os seres vivos estão expostos a numerosos agentes potencialmente tóxicos e a ação destes compostos nos organismos pode provocar efeitos deletérios (ARNAIZ, 1995). De acordo com a OECD (1994), as substâncias tóxicas persistem e se acumulam, comprometendo o ambiente e, conseqüentemente, a espécie humana em decorrência da transferência de contaminantes pela cadeia trófica ou por veiculação hídrica.

A diminuição nas concentrações dos contaminantes por biorremediação ou outros tratamentos nem sempre indica que a toxicidade no ambiente diminuiu (LOEHR; WEBSTER, 1997; TAMADA et al., 2012b). A degradação incompleta e conseqüente formação de compostos (metabólitos) intermediários tóxicos podem

resultar numa maior toxicidade durante o processo de remediação (LOEHR; WEBSTER, 1997; LOIBNER et al, 2003; TAMADA et al., 2012b).

Na avaliação de solo contaminado por petróleo e derivados, o desaparecimento dos hidrocarbonetos pode significar a ocorrência de lixiviação ou que os compostos não se encontram biodisponíveis. Portanto, é recomendado combinar a análise química a ensaios de ecotoxicidade, para elucidar estes efeitos e avaliar o risco associado à contaminação. De tal modo, o monitoramento detalhado e uma avaliação final, acerca da eficiência do processo, são cruciais para adequação da biorremediação, com o intuito de estabelecer os padrões de segurança ambiental (AL-MUTAIRI et al., 2008; MONTAGNOLLI; BIDOIA, 2012).

Atualmente, observa-se o uso cotidiano de surfactantes químicos em ambientes contaminados por petróleo e derivados. Entretanto, esta crescente aplicação na remediação *in situ* vai de encontro à falta de informação existente referente a seus efeitos ambientais, como a toxicidade destes surfactantes (FRANZETTI et al., 2006).

Dentre as consequências da aplicação de surfactantes químicos na natureza, está seu efeito tóxico à microbiota local. Neste caso, destacam-se dois fatores: (1) o rompimento da membrana celular pela interação entre surfactante e seus componentes lipídicos; e (2) a reação da molécula do surfactante com proteínas essenciais ao funcionamento da célula (GLOXHUBER, 1980; JENSEN, 1999).

Logo, o propósito dos testes ecotoxicológicos é estabelecer o potencial de impacto de um composto químico na biota presente no meio ambiente. Em posse desta informação, é possível controlar o uso de determinadas substâncias e avaliar meios de tratamento deste resíduo, após a contaminação ambiental (HAGNER et al., 2010).

Diferentes ensaios com vários organismos-teste são aplicados no monitoramento ecotoxicológico de ambientes contaminados, respondendo de forma distinta a cada poluente. No solo, ainda são considerados os efeitos dos parâmetros físico-químicos e biológicos, que podem ocasionar algum efeito deletério no organismo-teste em questão (LABUD et al., 2007; AL-MUTAIRI et al., 2008).

Os efeitos tóxicos diretos na sobrevivência, crescimento ou reprodução de organismos-teste podem refletir o potencial ecotoxicológico de solos contaminados (FENT, 2003). Assim, diversos procedimentos demonstram-se úteis no fornecimento

de informações quanto ao progresso da biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados (MARWOOD et al., 1998).

Dentre estas opções, ensaios de fitotoxicidade (germinação de sementes e o desenvolvimento das plântulas) têm sido utilizados para avaliar a eficácia do tratamento e a recuperação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos (AMAKIRI; ONOFEGHARA, 1984; FERRARI et al., 1999; ADAM; DUNCAN, 2002; BANKS; SCHULTZ, 2005; MOLINA-BARAHONA et al., 2005; LOPES et al., 2010; TAMADA et al., 2012a,b; CRUZ et al., 2013a,b).

Bioensaios vegetais aplicados a estudos de contaminação de ambientes terrestres contaminados com hidrocarbonetos incluem vários organismos-teste: *Allium cepa* (MAZZEO et al., 2011; VENTURA-CAMARGO et al., 2011; SOUZA et al., 2013), *Allium sativum*, *Amaranthus espinosus* (TIQUIA et al., 1996); *Arachis hypogaea* (OGBO, 2009), *Avena sativa* (DORN; SALANITRO, 2000), *Barbarea verna* (CRUZ et al., 2013a), *Brassica alba* (SASEK et al., 2003; DAWSON et al., 2007; MARECIK et al., 2012), *Brassica oleracea* (CRUZ et al., 2013a), *Brassica parachinensis* (TIQUIA et al., 1996); *Calamagrostis canadensis* (PRINCZ et al., 2012), *Capsicum frutescens* (AMAKIRI; ONOFEGHARA, 1984), *Cardamine pratensis* (MARECIK et al., 2012), *Cucumis sativus* (TIQUIA et al., 1996; CRUZ et al., 2013a); *Eruca sativa* (LOPES et al., 2010; TAMADA et al., 2012a,b); *Euchlaena mexicana*, *Festuca arundinacea*, *Gossypium hirsutum* (TANG et al., 2011); *Lactuca sativa* (HAMDI et al., 2007; AL-MUTAIRI et al., 2008; MILLIOLI et al., 2009; LOPES et al., 2010; TAMADA et al., 2012a,b); *Lolium perenne* (PALMROTH et al., 2002; SIDDIQUI; ADAMS, 2002; DAWSON et al., 2007; LABUD et al., 2007), *Lycopersicon esculentum* (TIQUIA et al., 1996); *Medicago sativa* (MARECIK et al., 2012), *Ordeum vulgare* (LABUD et al., 2007), *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Pinus banksiana* (PRINCZ et al., 2012), *Pisum sativum* (PALMROTH et al., 2002; DAWSON et al., 2007), *Solidago canadensis* (PRINCZ et al., 2012), *Populus tremuloides* (PRINCZ et al., 2012), *Sinapis alba* (MARECIK et al., 2012), *Sorghum sp.* (TANG et al., 2011; MARECIK et al., 2012), *Triticum aestivum* (DORN; SALANITRO, 2000; TANG et al., 2011); *Vigna unguiculata* (OGBO, 2009), *Zea mays* (AMAKIRI; ONOFEGHARA, 1984; DORN; SALANITRO, 2000; OGBOGHODO et al., 2004; OGBO, 2009; TANG et al., 2011), entre outros.

Para os ensaios de ecotoxicidade realizados com sementes já foram utilizados por diversos estudos na avaliação de contaminantes em solo como:

explosivos (GUNDERSON et al., 1997; FRISCHE, 2003), herbicidas (BOUTIN et al., 2004), resíduos industriais (ARAÚJO; MONTEIRO, 2005) e petróleo (BANKS; SCHULTZ, 2005) e derivados (DORN; SALANITRO, 2000; AL-MUTAIRI et al., 2008; MILLIOLI et al., 2009; MARECIK et al., 2012; CRUZ et al., 2013a,b), incluindo óleos lubrificantes (LOPES et al., 2012; TAMADA et al., 2012a).

Análises fitotóxicológicas são consideradas de curto prazo e avaliam os efeitos de toxicidade aguda. Nestes estudos, as sementes são plantadas em uma pequena quantidade do solo contaminado e, após o período de incubação, são contabilizadas aquelas que germinaram e avaliados o desenvolvimento do hipocótilo e da raiz (KAPANEN; ITAVAARA, 2001). Assim, os resultados são expressos em comparação com os percentuais de germinação e desenvolvimentos obtidos no controle negativo (BANKS; SCHULTZ, 2005).

Consequentemente, a avaliação da fitotoxicidade de compostos é um dos critérios mais importantes a ser utilizado para evitar danos ambientais antes de compostos poluentes serem descartados no meio ambiente sem o devido tratamento (TIQUIA et al., 1996).

Portanto, a utilização de sementes na análise toxicológica de ambientes contaminados destaca-se como uma técnica simples e de baixo custo. Ademais, revela-se como uma potencial ferramenta no monitoramento ambiental, durante um processo de remediação, que permite avaliar a resposta das ações de mitigação adotadas (AL-MUTAIRI et al., 2008).

1.8. Diversidade microbiana em solos

Ecologia microbiana denomina a ciência que estuda as interações dos micro-organismos entre si, entre outros organismos e com o ecossistema. Estas interações podem ocasionar alterações químicas benéficas ou prejudiciais ao meio. Por consequência, os ecossistemas microbianos e os microambientes são responsáveis pelo crescimento e propagação da microbiota (ANDREOTE et al., 2009).

Neste sentido, os processos bioquímicos prevalecentes em ambiente terrestre são definidos em função da organização das comunidades microbianas. Contudo, as relações entre estruturas destas comunidades e as atividades bioquímicas que ocorrem nos solos são muito pouco conhecidas, dificultando a compreensão dos mecanismos que regulam seu funcionamento (LAMBAIS et al., 2005).

Ainda segundo Lambais et al. (2005), a diversidade microbiana pode ter um importante papel na manutenção da qualidade dos solos. Organizando-se de forma previsível, em diferentes condições edáficas ou em resposta a diferentes tipos de distúrbios, as comunidades microbianas poderiam ser utilizadas como indicadores de qualidade dos solos.

De acordo com Tótola e Chaer (2002), diversidade biológica é a variedade de espécies presentes em um ecossistema, assim como a variedade de genótipos dentro da mesma espécie. A diversidade biológica dos solos pode ser explicada pela riqueza de espécies e suas ligações com os processos bioquímicos no ambiente terrestre (KENNEDY; SMITH, 1995).

Nestes ambientes, as diferentes populações microbianas, que estão em diversas associações com outros seres vivos e com o meio externo, são capazes de realizar a biodegradação de compostos por meio de ciclos biogeoquímicos, decorrentes de processos biológicos e químicos de substâncias (MUYZER et al., 1993; KENNEDY; SMITH, 1995; ØVREÅS, 2000).

Durante o processo de biorremediação de áreas contaminadas, a dinâmica populacional dos micro-organismos está em constante mudança e apresenta variações, de acordo com as condições ambientais. Neste sentido, a aplicação de técnicas moleculares torna capaz o estudo da comunidade microbiana que se estabelece no meio (ØVREÅS et al., 1997; NOGUEZ et al., 2005; THERON; CLOETE, 2000; LAMBAIS et al., 2005; TÓTOLA; CHAER, 2002).

Um grande avanço nos estudos de ecologia microbiana ocorreu com a aplicação de técnicas moleculares, baseadas nas análises do DNA total extraído diretamente de ambientes naturais ou não, sem a necessidade de cultivar micro-organismos (PACE et al., 1986; MUYZER et al., 1993; ØVREÅS et al., 1997; MUYZER; SMALLA, 1998; TORSVIK et al., 1998; ARMANN; LUDWIG, 2000; ØVREÅS, 2000; KEMP; ALLER, 2004; KIRK et al., 2004; ZHOU et al., 2004). Os estudos moleculares tornaram-se possíveis a partir de Pace et al. (1986), pioneiros em análises de comunidades microbianas, utilizando informações de sequência de nucleotídeos do gene codificador do RNA ribossômico 16S (DNAr), o qual se trata de uma sequência muito conservada presente em todas as células procarióticas.

A análise do material genético microbiano fornece informação sobre a composição de espécies e as estruturas das diferentes comunidades, de acordo com o tratamento proposto. Embora, a princípio, qualquer gene possa ser usado nas

análises, os genes 16S rRNA de procariotos e a região interespaçadora ITS de eucariotos são os mais utilizados como moléculas marcadoras para este propósito, uma vez que estão presentes, respectivamente, em todos procariotos e eucariotos. Estas estruturas apresentam regiões conservadas e variadas, o que torna possível o desenho de *primers* e sondas com diferentes níveis de especificidade; têm informação de sequência suficiente para inferência filogenética; e, estão presentes em grande número de células, o que facilita sua detecção. Outros alvos definidos são genes que codificam para funções ecológicas específicas (ROTTHAUWE et al., 1997; GUMIERE, 2012).

As técnicas de *fingerprinting* são utilizadas a fim de se obter uma visão global da estrutura genética da comunidade microbiana. Sua aplicação em estudos de ecologia microbiana vem sendo amplamente disseminada nos últimos anos, uma vez que constituem metodologias rápidas e, relativamente, fáceis de operar, permitindo a análise simultânea de múltiplas amostras ambientais. Estas técnicas para análise de ácidos nucleicos têm sido desenvolvidas mediante variações no método básico de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase – *Polymerase Chain Reaction*), utilizado com acuidade no diagnóstico, quantificação, caracterização e identificação de micro-organismos e atividade dos mesmos (KIRK et al., 2004). Em genética de populações e ecologia microbiana, a PCR gera dados para estudos da distribuição natural de membros dos Domínios Bacteria, Archaea e Eucarya (NAVARRETE, 2009).

De uma maneira simplificada, a diversidade das sequências de DNA, obtidas a partir da amostra ambiental, é estimada pela migração eletroforética diferencial em géis de agarose e acrilamida ou por eletroforese capilar automatizada, em função do tamanho ou composição das sequências. O *fingerprinting* genético fornece um perfil de bandas ou picos que reflete a complexidade da comunidade microbiana analisada (MUYZER et al., 1993; TORSVIK et al., 1998; KIRK et al., 2004; NAVARRETE, 2009).

A variabilidade nas sequências do 16S rDNA pode ser avaliada, por exemplo, por meio de Eletroforese em Gel de poliacrilamida com Gradiente Desnaturante (DGGE). Essa técnica foi utilizada primeiramente por Muyzer et al. (1993) e está fundamentada na separação de fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, porém com sequências de nucleotídeos diferentes, baseada na mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA, parcialmente desnaturada, em géis de poliacrilamida

contendo gradiente crescente de agentes desnaturantes, como ureia e formamida. O padrão de migração destes fragmentos, denominados *amplicons*, no gel é resultado de sua composição de nucleotídeos e de seu teor guanina-citosina, G+C (LAMBAIS et al., 2005).

De acordo com Muyzer et al.(1993), a técnica de DGGE é um método muito apropriado não somente para caracterizar comunidades complexas, como também para: inferir sobre a filogenia dos membros destas, testar a pureza de linhagens bacterianas, monitorar o isolamento de micro-organismos, a partir de amostras ambientais, e acompanhar a dinâmica de populações específicas em funções de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema.

Assim, a técnica PCR-DGGE foi abordada em diversos estudos na avaliação da diversidade microbiana em solo (LAMBAIS et al., 2006; GUMIERE, 2012) e também em ecossistemas terrestres contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (NAKATANI et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2011; LIU et al., 2011, LORS et al., 2010; 2012; LLADÓ et al., 2012; 2013; SIMARRO et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Avaliar a biodegradação de óleo lubrificante automotivo usado associado ao solo pela aplicação de diferentes soluções de surfactantes químicos e biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI a partir de borra de soja, analisando a eficiência do processo de biorremediação quanto: ao metabolismo microbiano; aos parâmetros físico-químicos do solo, à ecotoxicidade do meio; e à diversidade da comunidade microbiana.

2.2. Específicos

- Produzir ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI, utilizando um resíduo agroindustrial (borra de soja);
- Caracterizar as propriedades físico-químicas do biossurfactante obtido, investigando o potencial para novas aplicações e desenvolvimento de estratégias de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarboneto de petróleo;
- Analisar o metabolismo microbiano na degradação do óleo lubrificante usado em diferentes sistemas de tratamento, comparando o efeito da aplicação de biossurfactante e de surfactantes químicos;
- Monitorar o potencial ecotoxicológico e composição físico-química das amostras de solo nos tratamentos antes e após o processo de biorremediação;

- Verificar o efeito da aplicação das soluções de surfactantes quanto a alterações na estrutura da comunidade microbiana, por meio de técnicas de biologia molecular.

3. CAPÍTULO 1

Produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI a partir de borra de soja



3.1. Introdução

O interesse biotecnológico nos biossurfactantes iniciou-se na década de 1980, quando sua utilização era basicamente restrita à MEOR (SYLDATK; WAGNER, 1987). Estes compostos são metabólitos microbianos, que apresentam atividade superficial e são sintetizados por uma grande variedade de micro-organismos (BANAT *et al.*, 2000; DESAI; BANAT, 1997). Eles geralmente apresentam como estrutura glicolipídios, lipopeptídios, complexos polissacarídeo-proteína, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros (DESAI BANAT, 1997; DAS; MUKHERJEE, 2007).

As vantagens destes compostos, quando comparado aos surfactantes sintéticos, são a sua diversidade estrutural, baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (MULLIGAN, 2009; BANAT *et al.*, 2010; CAMEOTRA *et al.*, 2010; HAZRA *et al.* 2011; LOVAGLIO *et al.*, 2011a).

Devido às suas propriedades tensoativas, esses detergentes biológicos podem ser aplicados em diferentes ramos da indústria, como: alimentício, cosmético, farmacêutico, químico, petroquímico, da saúde, têxtil, etc. Além disso, são aplicados na biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo e MEOR (TIEHM, 1994; BERTRAND *et al.*, 1994; SANDRIN *et al.*, 1990; BANAT *et al.*, 2000; THANOMSUB *et al.*, 2007; TACCARI *et al.*, 2012; SZULC *et al.*, 2014).

Estes biotensoativos têm a propriedade de formar microemulsões e micelas, facilitando a solubilização de hidrocarbonetos em água. Essa propriedade está relacionada à sua composição molecular que apresenta uma porção hidrofílica composta de aminoácidos, peptídeos, ânions, cátions, monossacarídeos, dissacarídeos ou polissacarídeos; e uma porção hidrofóbica composta por ácidos graxos saturados, insaturados ou hidroxilados (GEORGIOU *et al.*, 1992; LOVAGLIO *et al.*, 2011a).

Os tensoativos sintetizados por *P. aeruginosa* são glicolipídios, denominados ramnolipídios, cuja porção hidrofílica é composta por moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (HENKEL *et al.*, 2012). O conhecimento dos ramnolipídios iniciou-se em 1946 por Bergström *et al.* (1946) e sua produção foi, primeiramente, descrita por Jarvis *et al.* (1949).

Apesar de suas vantagens, os biossurfactantes não são amplamente utilizados pelas indústrias, devido ao alto custo de produção. A utilização de

substratos mais econômicos, associado à otimização das condições de cultivo e ao desenvolvimento de linhagens mutantes pode torná-los economicamente competitivos e proporcionar a substituição dos surfactantes sintéticos pelos compostos de origem biológica (NITSCHKE et al., 2005b; MUKHERJEE et al., 2006; COSTA et al., 2008; NITSCHKE et al., 2011; HENKEL et al., 2012).

O objetivo deste capítulo foi realizar a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI a partir de borra de soja. O biossurfactante foi também caracterizado quanto às suas propriedades físico-químicas.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Material

3.2.1.1. Meios de cultura

3.2.1.1.1. Caldo nutriente e ágar nutriente

Os meios de cultura utilizados foram caldo nutriente (CN) e ágar nutriente (AN). Para o preparo dos meios, foram dissolvidos 8,0 g de *Nutrient Broth* (Himedia[®]) em 1,0 L de água destilada. Na composição do meio AN foi acrescido 17,0 g de ágar por litro de meio de cultivo.

3.2.1.1.2. Meio mineral mínimo

O meio mineral mínimo (MMM) foi preparado segundo Robert et al. (1989). Os compostos utilizados no seu preparo foram, em g.L⁻¹: NaNO₃ 4,00; K₂HPO₄ 1,00; KH₂PO₄ 0,50; MgSO₄.7H₂O 0,50; KCl 0,10; FeSO₄.7H₂O 0,01; CaCl₂ 0,01; e extrato de levedura 0,01. Além disso, foi adicionado 0,05 mL.L⁻¹ da solução de elementos-traço. Esta solução foi preparada com os seguintes elementos: boro 0,026% (H₃BO₃); cobre 0,050% (CuSO₄.5H₂O); manganês 0,050% (MnSO₄.H₂O); molibdênio 0,006% (Mo₇(NH₄)₆O₂.4H₂O); e zinco 0,070% (ZnSO₄.H₂O). O pH inicial do MMM foi ajustado para 6,8. Salienta-se que o MMM foi esterilizado em autoclave antes do preparo dos meios de inóculo e de fermentação.

3.2.1.1.3. Meio mineral com óleo de soja (meio de inóculo)

Adicionou-se 2,0% (m/v) de óleo de soja Liza[®] (sem conservantes) ao MMM.

3.2.1.1.4. Meio mineral com borra de soja (meio de produção)

Ao MMM foram adicionados 2,0% (m/v) de borra de soja, obtida junto a empresa Cargill S.A. Homogeneizou-se o meio até completa dissolução da borra de

soja em solução. Esta concentração (20 g.L^{-1}) corresponde a 15,0 g de carbono por litro de meio de produção (LOVAGLIO et al., 2010).

3.2.1.2. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolada por Benincasa et al. (2002) de solo contaminado por petróleo. A linhagem foi mantida em caldo nutriente com 20% de glicerol a -20°C (COSTA et al., 2006).

Quando necessário, a cultura foi inoculada em ágar nutriente. Após ser autoclavado a 121°C , durante 15 min, o meio AN foi distribuído em tubos de ensaio e estes foram, posteriormente, inclinados. Os repiques foram realizados periodicamente, incubados a 35°C por 24 h e, posteriormente, utilizados ou armazenados a 4°C em geladeira.

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Condições de cultivo

O processo fermentativo na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI seguiu a metodologia descrita por Benincasa et al. (2002), Costa et al. (2006) e Costa et al. (2009), sendo desenvolvido conforme a Figura 5.

Primeiramente, a cultura mantida em meio AN foi reativada em frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de CN. Imediatamente, o frasco foi incubado por 24 h a 30°C em mesa agitadora a 150 rpm (centrífuga MLW - modelo K24)

A partir da cultura reativada, preparou-se uma suspensão celular em água destilada esterilizada com densidade ótica (absorbância a 610 nm) igual a 0,65. Este ajuste indica a presença de 10^8 UFC mL^{-1} (COSTA et al., 2006; 2009). Posteriormente, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão bacteriana foi transferida a frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do MMM com 2,0% (m/v) de óleo de soja. Os frascos permaneceram por 24 h a 30°C em mesa agitadora a 200 rpm para a formação do inóculo.

O meio de fermentação, ou meio de produção, foi composto por MMM mais 2,0% (m/v) de borra de soja. Após adicionar 1,0 mL do inóculo em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL, do meio de fermentação, estes foram incubados durante 120 h a 30°C em mesa agitadora a 200 rpm.

O processo de produção de biossurfactante foi realizado em batelada em frascos Erlenmeyer de 125 mL, em triplicata. A cada 24 h e também no tempo inicial, três frascos foram retirados e seu conteúdo centrifugado. Com isso, separou-se o *pellet* para determinação da biomassa e o caldo livre de células para análises de pH, tensão superficial e quantificação de ramnolipídios. Portanto, a caracterização dos parâmetros no processo de produção do biossurfactante foi realizada em seis tempos: t0 (inicial), t1 (24 h), t2 (48 h), t3 (72 h), t4 (96 h) e t5 (120 h).



Figura 5 - Esquema experimental do processo de produção de biossurfactante (ramnolipídio) por *P. aeruginosa* LBI.

3.2.2.2. Processamento das amostras

O processamento das amostras proveniente do meio de cultivo seguiu-se da seguinte maneira: uma alíquota do meio de produção foi centrifugada, sendo o sobrenadante utilizado na determinação da concentração de ramnolipídios e o *pellet* na quantificação da biomassa, ambos descritos abaixo.

3.2.2.3. Determinação da biomassa microbiana

Para a determinação da biomassa microbiana, 1,0 mL do caldo fermentado foi transferido a um tubo eppendorf e centrifugado a 6.000 rpm durante 20 min. Nota-se que os tubos foram previamente pesados para cálculo de massa seca (balança analítica Adam ADA 210/L).

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1,0 mL de solução salina 0,85% e novamente centrifugado (6.000 rpm por 20 min a 4° C – Eppendorf®). Posteriormente, houve descarte do sobrenadante e os tubos foram mantidos em estufa de secagem por 24 h a 60 °C. Após este período, foram transferidos para um dessecador até atingir a temperatura ambiente, e então pesados novamente para determinação da biomassa em massa seca.

3.2.2.4. Avaliação da produção de ramnolipídios

O volume restante do caldo que permanecera no frasco (24 mL) foi centrifugado a 6.000 rpm durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante, ou fase aquosa, foi armazenado a 4 °C para a caracterização do processo de produção.

Uma alíquota da fase aquosa foi utilizada para quantificação de ramnolipídios. Primeiramente, adicionou-se H_3PO_4 85% 1:100 (v/v) e homogeneizou-se a solução em agitador de tubos para ajuste do pH para 2,0-3,0, levando à precipitação dos ramnolipídios. Em seguida, utilizou-se acetato de etila 1:1,25 (v/v) para extração do tensoativo. Centrifugou-se a amostra a 6.000 rpm por 20 min a 4 °C e a fase orgânica (superior) foi retirada. O procedimento com acetato de etila foi repetido e as amostras de ramnolipídios coletadas e armazenadas a 4 °C (LOVAGLIO, 2011b).

3.2.2.4.1. Determinação da concentração de ramnolipídios – CCD

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada com o objetivo de verificar se houve produção de ramnolipídios antes de prosseguir às análises em HPLC. Para isso, foram utilizadas placas de sílica-gel e como fase móvel a mistura de clorofórmio/metanol/ácido acético (65:15:2). O agente revelador utilizado foi uma solução contendo 2,0 mL de anisaldeído em 100 mL de ácido acético acrescido de 2,0 mL de ácido sulfúrico. As amostras consistiram em 4,0 µL de extratos de ramnolipídios obtidos, a partir do caldo livre de células, em diferentes tempos de cultivo.

3.2.2.4.2. Determinação da concentração de ramnolipídios – HPLC

3.2.2.4.2.1. Derivatização

Para que os ramnolipídios fossem analisados via detector UV em HPLC, os padrões e as amostras de ramnolipídios foram derivatizados de acordo com Schenk et al. (1995), com pequenas modificações.

As amostras, contendo ramnolipídios e acetato de etila, foram primeiramente evaporadas; em seguida adicionou-se 360 µL de acetonitrila e 40 µL da mistura 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 40 mM e trietilamina 20 mM, ambos em acetonitrila. A derivatização foi feita por 90 min a 60 °C e 1400 rpm, em um banho seco (*Eppendorf Thermomixer comfort*).

3.2.2.4.2.2. HPLC

As análises foram feitas em equipamento HPLC (*Shimatzu LC-20A series*) acoplado a um detector UV. Para a calibração do HPLC, utilizou-se solução padrão de mono- e di-ramnolipídio nas seguintes concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 g.L⁻¹. Para as análises foi utilizada uma coluna de fase reversa (Supelcosil LC18 Supelco - 150 mm x 4,6 mm, 5 µm sílica gel) a 30 °C.

As fases móveis foram Solução A com 5,0% de metanol e Solução B com 95,0%, ambas em água ultra pura. Para que houvesse separação dos homólogos presentes, foi estabelecido um gradiente de 80 a 100% da Solução B, de acordo com o seguinte protocolo: de t = 0 a t = 17 min, aumento da Solução B de 80 para 100%, conservando-se em 100% até 25 min. Em seguida, ocorreu um decréscimo para 80% até 30 min, mantendo-se, por mais 5 min, para que houvesse equilíbrio. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL.min⁻¹ e os ramnolipídios foram monitorados a 254 nm. Os tempos de retenção foram 21,5±0,1 min para Rha-Rha-C₁₀C₁₀ e 22,2±0,1 min para Rha-C₁₀C₁₀.

3.2.2.5. Caracterização do biossurfactante

Para a caracterização do caldo livre de células nos diferentes tempos de incubação, foram avaliados o pH e a tensão superficial.

A determinação do pH foi realizada a partir das amostras do caldo livre de células, utilizando o medidor de pH Digimed DMPH-2.

As leituras de tensiometria seguiram a metodologia do anel de De Nöuy (ZAJIC; SEFFENS, 1984), utilizando-se tensiômetro Krüss modelo K6, ilustrado na Figura 6. Este equipamento realiza medidas analógicas, com indicação direta em mN.m⁻¹, por meio do anel de platina-irídio (6,0 cm de circunferência) em um recipiente de vidro (50 mm de diâmetro), onde se coloca a amostra. Assim, aplica-se uma força ao anel pelo disco giratório e a leitura de tensão superficial é obtida no momento em que o anel se desprende da superfície da solução.

Esta medida torna-se essencial para estabelecer o potencial tensoativo do biossurfactante produzido uma vez que esta molécula possui atividade superficial, ou seja, têm a capacidade de reduzir a tensão superficial (fases líquido-gás) ou a tensão interfacial (fases imiscíveis líquido-líquido) (MULLIGAN, 2009; BANAT et al., 2010; CAMEOTRA et al., 2010).

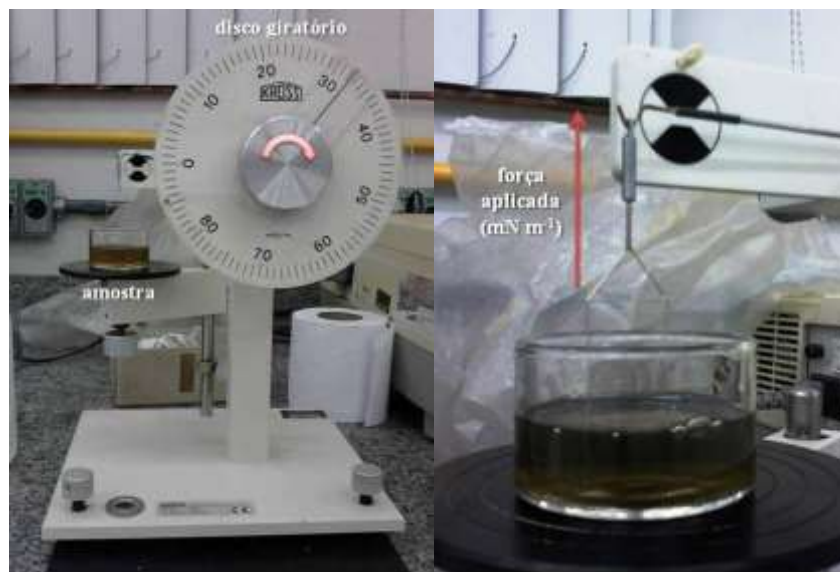


Figura 6 - Tensiômetro de bancada Krüss – modelo K6 e detalhe do anel de platina-irídio utilizados nas análises de tensiometria.

3.2.2.5.1. Índice de emulsificação - E_{24}

Para investigar possíveis aplicações do biossurfactante obtido por *P. aeruginosa* LBI, frente aos surfactantes sintéticos, procedeu-se um teste de atividade emulsificante. Uma emulsão é formada quando uma fase líquida é dispersa como gotas microscópicas em outra fase contínua líquida, sendo que as ambas as fases são imiscíveis entre si (DESAI; BANAT, 1997). Assim, a capacidade de formar emulsões para o óleo lubrificante automotivo usado (OLU), em contato com o biossurfactante produzido (Bs), um detergente químico (Dq) e um surfactante químico comercial (SqC – Tween80), foi medida pelo índice de emulsificação E_{24} (Figura 7).

O índice E_{24} foi medido pela adaptação do método inicialmente descrito por Cooper e Goldenberg (1987), com adaptações (IQBAL et al., 1995; COSTA et al., 2008). As atividades dos diferentes surfactantes foram avaliadas ao adicionar a tubos de ensaio 4,0 mL de solução de surfactante 10% (m/v) e 2,0 mL do OLU (Figura 7). O teste foi realizado em triplicata à temperatura de 25°C.

Além disso, o teste foi realizado com óleo lubrificante mineral (Ipiranga® F1 Super Plus – SAE 25W/50 API SJ) e petróleo cru (Petrobrás®) para comparação. A descrição das soluções de surfactantes utilizadas na análise do E_{24} e nos ensaios de biodegradação está disposta a seguir no Capítulo 2.

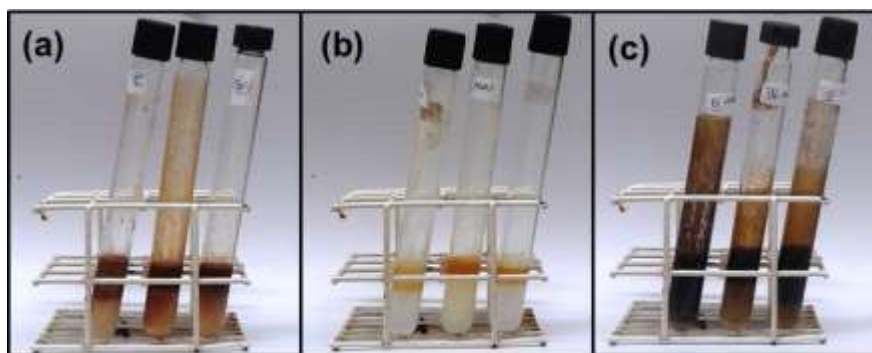


Figura 7 - Montagem dos testes para medida do índice de emulsificação (E_{24}) na sequência: Bs, Dq e SqC. (a) OLU; (b) óleo lubrificante novo; (c) petróleo.

O conteúdo dos tubos foi colocado em agitador de tubos durante 120 s em alta rotação. Após 24 h, calculou-se a razão entre a altura da região emulsificada e altura total com auxílio de uma régua, conforme a Equação 1:

$$E_{24} = \frac{H_{em}}{H_s} \times 100 \quad (1)$$

em que,

H_{em} = altura da região emulsificada

H_s = altura total da solução.

3.2.2.6. Recuperação dos ramnolipídios e cálculo de rendimento

A recuperação do biossurfactante foi realizada com o caldo livre de células, obtido pela centrifugação do meio fermentativo, após 120 h de incubação (COSTA et al., 2006). Após a remoção da biomassa, o pH do sobrenadante foi ajustado para 2,0 com a adição de H_2SO_4 6,0 N e permaneceu *overnight* a 4 °C em geladeira.

O caldo livre de células contendo biossurfactante foi transferido para um funil de separação, juntamente com um volume igual de solvente orgânico clorofórmio:metanol (2:1). A mistura foi suavemente agitada por 10 min e deixada intacta por mais 10 min, até a separação das fases orgânica (superior) e aquosa (inferior). Retirou-se a fase orgânica pela torneira e um novo volume da solução de solvente orgânico foi adicionado para repetição do processo.

Posteriormente, a fase orgânica contendo os ramnolipídios foi transferida para um rotavapor para evaporação do solvente e concentração do biossurfactante. O procedimento em rotavapor foi realizado sob vácuo e com temperatura do banho

maria a 50 °C. Após total evaporação do solvente orgânico, o produto foi coletado por lavagem do frasco com metanol.

Previamente pesado para o cálculo de rendimento na produção de ramnolipídio, um béquer de 50 mL foi utilizado na coleta do metanol com biossurfactante. O solvente foi totalmente evaporado em estufa a 50 °C (48 h) para concentração e obtenção do ramnolipídio.

3.3. Resultados

3.3.1. Determinação da biomassa e do pH do caldo livre de células

Os resultados de biomassa e pH do caldo livre de células durante a produção de ramnolipídios estão apresentados na Figura 8.

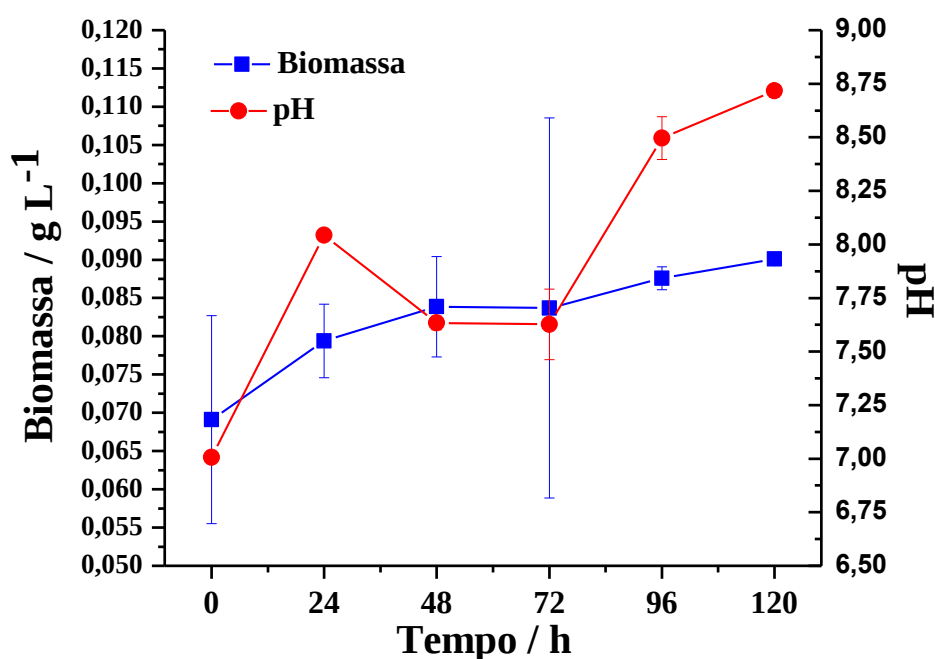


Figura 8 - Determinação da biomassa e do pH no processo de produção de ramnolipídios.

Observou-se um crescente valor de biomassa no decorrer do processo fermentativo. Este resultado evidencia o desenvolvimento da bactéria *P. aeruginosa* LBI no meio mineral mínimo (MMM), contendo apenas a borra de soja como substrato. Nestas condições, foi observado por Lovaglio et al. (2010) que uma maior biomassa microbiana propicia maior rendimento na produção de biossurfactantes.

Em relação às medidas de pH, verificou-se que o meio de cultivo sofreu leve alcalinização de 7,01 para 8,72 no decorrer da fermentação. Costa et al. (2008) também observaram valores de pH entre 7,01 e 7,72 após 120 h de cultivo em borra de soja com diferentes linhagens de *P. aeruginosa*. Ainda, seus resultados apresentaram pH final 8,64 (120 h) quando utilizado gordura vegetal como substrato.

3.3.2. Quantificação de ramnolipídios

A concentração de ramnolipídios produzidos foi determinada pela análise via detector UV em HPLC (Figura 9). Além de quantificar o total de ramnolipídio (RL total) presente nas amostras, o procedimento permitiu também diferenciar duas espécies homólogas produzidas: RL1 ($\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$) e RL3 ($\text{Rha}_2\text{C}_{10}$)

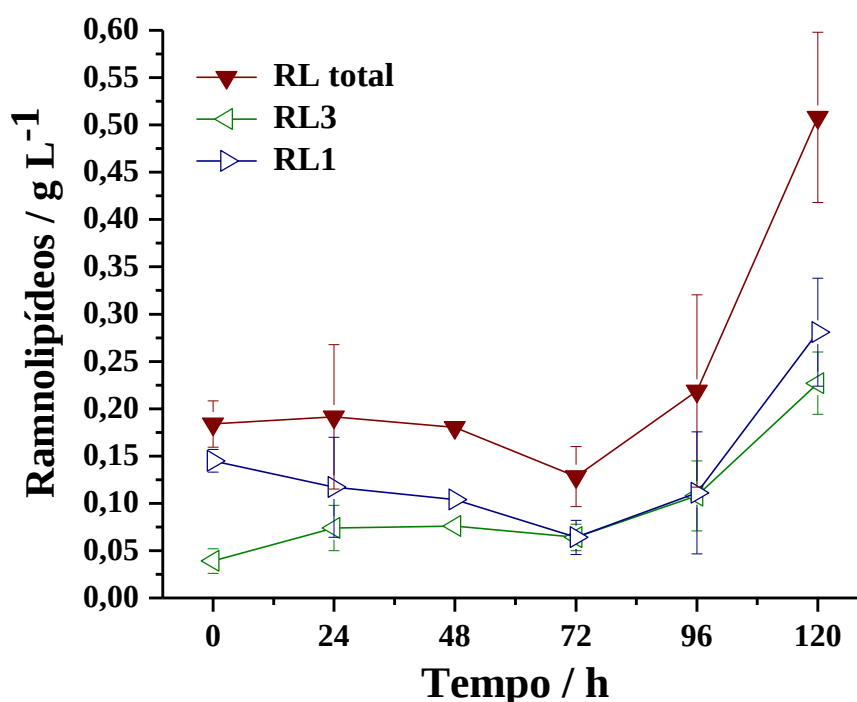


Figura 9 - Quantificação de espécies homólogas (RL1 e RL3) e do total de ramnolipídios (RL total) produzidos por *P. aeruginosa* LBI.

Observa-se, pela Figura 9, um aumento na concentração de RL total, atingindo $0,51 \text{ g.L}^{-1}$ em 120 h. Nas concentrações das espécies homólogas, foi estabelecido que o processo fermentativo produziu maior quantidade de RL1. Contudo, as curvas de produção destes dois homólogos seguem praticamente o mesmo padrão, principalmente, no aumento de produção após 72 h.

3.3.3. Rendimento na produção de ramnolipídios

A recuperação de ramnolipídios do caldo livre de células foi realizada utilizando solventes orgânicos com posterior evaporação em rotavapor (COSTA et al., 2006). Em seguida, a quantidade de ramnolipídios extraída foi concentrada em um béquer previamente pesado. Deste modo, a concentração de biossurfactante obtida no processo fermentativo foi de $1,434 \text{ g.L}^{-1}$ em 120 h.

Salienta-se que o maior valor obtido pelo método de extração com solventes orgânicos deve-se à presença de outros compostos no material final obtido no rotavapor. No caso da quantificação do RL total, apresentada na Figura 9, a detecção pelo HPLC determinou exatamente a concentração das espécies homólogas RL1 e RL3.

Assim, o rendimento de produção de ramnolipídios encontra-se próximo a valores obtidos por processos semelhantes. Costa et al. (2008) estudaram a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa*, utilizando como fonte de carbono a gordura vegetal. A concentração após 120 h de produção foi de $1,71 \text{ g.L}^{-1}$, $1,87 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,03 \text{ g.L}^{-1}$ para as linhagens LBO, LMI 6c e LMI 7a, respectivamente. Observa-se que, com substrato de composição semelhante e a mesma estirpe (*P. aeruginosa* LBI), a produção de ramnolipídios foi próxima à concentração obtida ($1,434 \text{ g.L}^{-1}$). Entretanto é importante salientar o maior custo de produção pela gordura vegetal, em relação a um resíduo (borra de soja). Da mesma forma, utilizando como fonte de carbono óleo de buriti, substrato ainda mais nobre, Costa et al. (2006) obtiveram $2,9 \text{ g.L}^{-1}$ de biossurfactante.

A partir do resultado da extração, foi possível calcular o rendimento do processo fermentativo e estabelecer uma perspectiva em âmbito nacional para a utilização da borra de soja na produção de biossurfactantes. Foi necessário um grama de borra de soja para que a bactéria *P. aeruginosa* LBI produzisse 0,0717 g de ramnolipídio, ou seja, rendimento de 7,17% no processo fermentativo. Segundo previsões da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais para 2018/2019, a geração deste resíduo na indústria será em torno de 336,2 mil toneladas (ABIOVE, 2012). Portanto, pelos resultados deste estudo, o potencial brasileiro em produzir ramnolipídios, a partir da borra de soja, pode atingir 24,10 toneladas. Deste modo, agregará um alto valor de mercado a um composto

até então descartado pelo setor, além de evitar que esta carga poluidora seja repassada ao meio ambiente pelo seu destino direto a aterros sanitários.

Rendimentos próximos já foram encontrados em cultivos em batelada, mesmo utilizando substratos de produção mais nobres e de alto custo. Wei et al. (2005) obtiveram 0,04 g de ramnolipídio por grama de óleo de oliva e Müller et al. (2010) produziram 0,06-0,07 g do biossurfactante a partir de óleo de girassol.

Além disso, visando menor custo de produção, a fonte de nitrogênio estava apenas concentrada no MMM (ROBERT et al., 1989), uma vez que não houve acréscimo na concentração deste elemento pela adição de outros produtos que aumentariam o custo do processo. Lovaglio et al. (2010) demonstraram que a razão entre as concentrações de carbono e nitrogênio (C/N) possui um papel fundamental na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa*, a partir da borra de soja.

3.3.4. Determinação da tensão superficial

A tensão superficial do caldo livre de células foi analisada para caracterização do processo fermentativo, conforme demonstrado pela Figura 10.

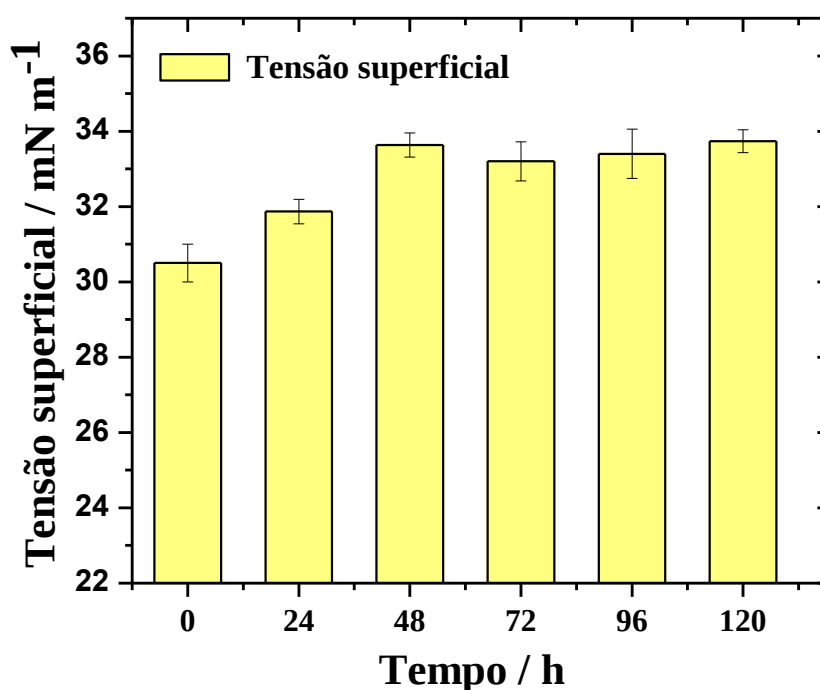


Figura 10 - Valores da tensão superficial no caldo livre de células durante o processo produtivo.

Acerca da tensão superficial (Figura 10), tem-se o menor valor no tempo zero ($30,50 \text{ mN.m}^{-1}$). No decorrer da fermentação, houve aumento nos valores, atingindo tensão superficial final de $33,73 \text{ mN.m}^{-1}$ em 120 h de cultivo.

Neste sentido, o resultado encontrado no presente estudo demonstrou-se próximo aos valores encontrados em outras pesquisas (Tabela 4). Além disso, as medidas nos seis tempos de amostragem foram próximas, o que não infere que houve aumento significativo na tensão superficial durante o processo. Costa et al. (2008) realizaram a produção de ramnolipídios em condições idênticas de cultivo (*P. aeruginosa* LBI e borra de soja) e relataram $33,20 \text{ mN m}^{-1}$ para a tensão superficial, após 120 h.

Tabela 4 - Valores de tensão superficial na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa*

Linhagem de <i>P. aeruginosa</i>	Fonte de carbono	Tensão superficial final (mN.m^{-1})	Referência
LMI 6c	óleo de soja usado	31,00	Costa et al. (2008)
	borra de soja	31,90	
LMI 7a	óleo de soja usado	34,00	
	borra de soja	31,90	
LBI	óleo de soja usado	32,60	
	borra de soja	33,20	
	gordura de frango	32,30	
	gordura vegetal	35,00	
PA1	óleo parafínico	51,60	Santa Anna et al. (2002)
	glicerol	27,46	
	óleo de babaçu	27,60	
NLIM 0112	sacarose	27,00	Amani et al. (2010)
2 KM	glicose	42,60	Górna et al. (2011)
3 KM	glicose	49,90	
10 K	glicose	50,00	
S6	glicose	33,90	Yin et al. (2009)

Todavia, o menor valor apresentado no tempo zero (Figura 10) não pode ser considerado efeito de biossurfactantes presentes no meio de cultivo. A baixa tensão superficial pode ser devido à presença de moléculas no meio de cultivo originárias da borra de soja que influenciaram neste resultado, tais como: ácidos graxos não metabolizados, mono e diglicerídeos (MATA-SANDOVAL et al., 2001; COSTA et al., 2006).

3.3.5. Índice de emulsificação – E_{24}

O poder emulsificante é outra importante característica para qualquer surfactante (ABDEL-MAWGOUD et al., 2009). Desta forma, na Figura 11, estão demonstrados os valores dos índices de emulsificação para os óleos lubrificantes (usado e novo) e o petróleo. Todos estes compostos foram emulsionados pelos seguintes surfactantes: (Bs) ramnolipídio produzido por *P. aeruginosa* LBI, (Dq) detergente químico e (SqC) surfactante químico comercial – Tween80.

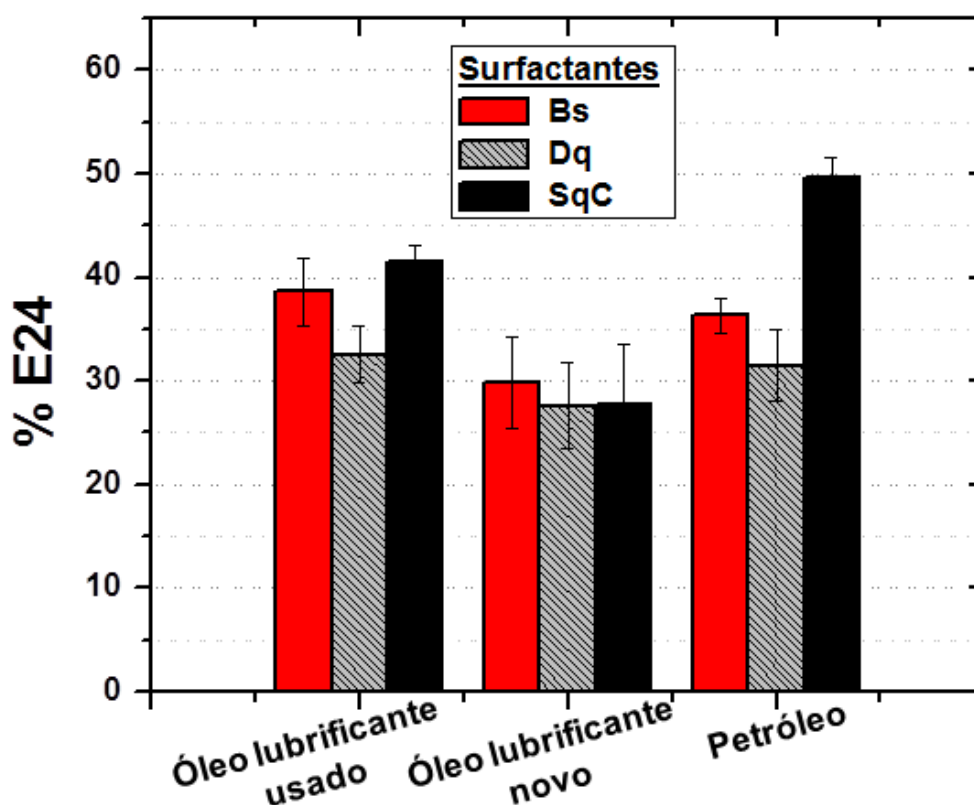


Figura 11 - Índice de emulsificação (E_{24}) para: OLU, óleo lubrificante novo e petróleo; utilizando biossurfactante (Bs), detergente químico (Dq) e surfactante químico comercial – Tween80 (SqC).

Em relação ao óleo lubrificante novo, foi observado que os valores dos três surfactantes estavam semelhantes com valores entre 27,59% e 29,81%. O Tween80

destacou-se nos ensaios com petróleo, mas a diferença entre SqC e Bs não foi significativa para o OLU. De tal modo, tem-se uma boa ação do ramnolipídio produzido frente ao hidrocarboneto utilizado nos ensaios de biodegradação (OLU).

Ainda, o biossurfactante produzido apresentou maiores valores de E_{24} para as três substâncias, em relação ao detergente químico. A habilidade dos ramnolipídios em emulsificar hidrocarbonetos derivados do petróleo (óleos lubrificantes, por exemplo) pode facilitar sua assimilação microbiana como fonte de carbono. Assim, esses dados são úteis para o planejamento estratégico na remediação de ambientes contaminados por estes compostos (MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; BENINCASA et al., 2004).

Além disso, a maioria dos surfactantes de origem microbiana são específicos, solubilizando ou emulsionando hidrocarbonetos diferentes de forma distinta (ILORI et al., 2005), o que explicaria a diversidade de valores E_{24} encontrados para cada substância. O índice de emulsificação varia de acordo com a viscosidade, tamanho das gotas, razão do volume das fases, temperatura, pH, tempo de emulsão, agitação e diferença de densidade das substâncias testadas (SINGH et al., 2007).

A variação nos valores de pH e a adição de aditivos como etanol podem aumentar a atividade emulsificante dos ramnolipídios, tornando-os mais competitivos, em relação aos surfactantes químicos (LOVAGLIO, 2011b).

Por fim, o conhecimento sobre emulsificação de diversas substâncias é importante para a definição destes processos na indústria petroquímica. Tais processos são aplicados, por exemplo, na recuperação do óleo de emulsões de oleodutos, MEOR e biorremediação de áreas contaminadas (LEE, 1999).

4. CAPÍTULO 2

**Biodegradação de óleo lubrificante automotivo usado
associado ao solo sob diferentes condições de tratamento**



4.1. Introdução

O processo produtivo do setor petroquímico representa uma grande preocupação global pelo seu alto potencial de impacto. Em todas suas etapas (exploração, transporte, refino e armazenamento) a atividade petrolífera está sujeita a contaminação de diversos ecossistemas (CHAGAS-SPINELLI et al., 2012; MONTAGNOLLI; BIDOIA, 2012).

Os impactos ambientais envolvendo petróleo e derivados são principalmente devido a vazamentos acidentais e a derrames em tanques de armazenagem e bombas (UDIWAL; PATEL, 2010). No Brasil, os maiores responsáveis por acidentes com hidrocarbonetos de petróleo são os postos de combustíveis. Estes estabelecimentos concentram mais da metade dos casos de contaminação de solo e de aquíferos, sendo, em sua maioria, devido à falta de manutenção e ao longo tempo de uso dos tanques subterrâneos por cerca de 25 anos (BRITO et al., 2010).

Dentre os compostos perigosos ao meio ambiente, estão os óleos lubrificantes. Um estudo de Bartz (1998) revelou que cerca de 1% de todo petróleo extraído no planeta é utilizado na produção de lubrificantes. A partir da década de 80, o nível de informações sobre a demanda de óleo lubrificante descartada nos ecossistemas tem crescido gradativamente, em razão do potencial de impacto deste composto (ANON, 1996).

Os óleos lubrificantes podem adentrar nos ecossistemas através de duas maneiras: durante seu próprio uso ou por vazamentos e descartes diretos (BATTERSBY; MORGAN, 1997). Lopes et al. (2008) investigaram a contaminação dos recursos hídricos pelo descarte indiscriminado de óleo lubrificante residual nas embalagens do produto comercializadas em postos de combustíveis e centros de lubrificação automotiva. O resultado indicou que o município de Rio Claro-SP, com aproximadamente 200.000 habitantes, possui uma carga poluidora mensal alarmante de 47 milhões de litros de água contaminados por este hidrocarboneto.

Em contraste com os tratamentos físicos convencionais de separação do material contaminado e os poluentes, sem que ocorra sua destruição (parcial ou total), geralmente mediante altos custos e muitas limitações, os processos biológicos de biorremediação representam tecnologias limpas de descontaminação promissoras, principalmente pela simplicidade e custo-efetividade (ALEXANDER, 1994).

A aplicação de tecnologias de biorremediação foi introduzida na década de 80 como uma alternativa às metodologias convencionais que envolviam escavação, aterro, bombeamento, tratamento e adição de materiais absorventes. Para tal, a biorremediação é também considerada um método seguro e ecologicamente viável (STALLWOOD et al., 2005; KARHU et al., 2009).

Além disso, outros procedimentos podem ser combinados, visando maior eficiência do tratamento biológico. A inoculação de linhagens microbianas capazes de metabolizar o composto poluente (bioaumentação) e a suplementação de alguns nutrientes para a microbiota indígena (bioestimulação) muitas vezes são eficazes na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos (MISHRA et al., 2001; THOMPSON et al., 2005; MUKHERJEE; BORDOLOI, 2011; SUN et al., 2012).

Entretanto, uma das principais barreiras encontradas na biorremediação de ambientes contaminados com petróleo e derivados, como os óleos lubrificantes, está em função de sua hidrofobicidade e consequente baixa biodisponibilidade (ANGELOVA; SCHMAUDER, 1999; JOHNSEN et al., 2005; THAVASI et al., 2011). Esta limitação deve-se a baixa solubilidade dos hidrocarbonetos na água e às suas interações com a matriz de solo que, geralmente, refletem na inibição da degradação (HARMS; BOSMA, 1997).

Desta forma, a modificação das propriedades físico-químicas destes contaminantes hidrofóbicos pode tornar o processo de biodegradação por micro-organismo mais rápido e eficiente, fenômeno realizado pelos tensoativos (VOLKERING et al., 1998; MAKKAR; ROCKNE, 2003; SINGH et al., 2007). Este aumento da biodisponibilidade pode ser realizado por diversos mecanismos, como a emulsificação do contaminante por redução da tensão interfacial e a solubilização por micelas (MOHANTY; MUKHERJI, 2013).

De acordo com essas propriedades, encontram-se os biossurfactantes (LIN, 1996). Eles aumentam a acessibilidade de substratos hidrofóbicos às células, facilitando o metabolismo e o desenvolvimento da microbiota existente e, consequentemente, aumentando a biodegradação do contaminante (ROCHA, 2006; YU et al., 2007; PANTSYRNAYA et al., 2011; WYRWAS et al. 2011).

Recentemente, estes tensoativos de origem microbiana ganharam relevância, uma vez que oferecem biodegradabilidade superior e maior compatibilidade ambiental em comparação com surfactantes sintéticos (BORDOLOI; KONWAR, 2009; WHANG et al, 2008).

Assim, torna-se importante a realização, em escala laboratorial, de ensaios representativos de biodegradação, pois estes permitem uma avaliação do impacto, sobre diversos parâmetros, que podem interferir na eficácia do biotratamento. Este tipo de análise fornece instruções a respeito de reduzir a duração e o custo do processo (LORS et al., 2012; SZULC et al., 2014).

O desenvolvimento deste capítulo compreende a avaliação da biodegradação em solo do óleo lubrificante automotivo usado (OLU) a partir de duas abordagens metodológicas. Os resultados permitiram comparar o efeito da aplicação do biossurfactante produzido em relação a um detergente químico e um surfactante químico utilizado comercialmente em laboratório (Tween80).

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Material

4.2.1.1. Detergente Químico

A formulação do detergente químico EcoQuímica[®] (1,00 L) encontra-se na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 - Composição do detergente químico EcoQuímica[®]

Composto	Quantidade
Ácido sulfônico 90%	60,00 g
Água Milli-Q	0,885 L
Amida 60%	20,00 g
Cloreto de sódio	3,000 g
Formol inibido	0,006 L
Lauril éter sulfato de sódio	15,00 g
Soda cáustica	16,00 g
Trietanolamina	3,000 g
Ureia técnica	10,00 g

4.2.1.2. Soluções aquosas de surfactantes químicos e biossurfactante

Foram preparadas três soluções de surfactantes para realização dos experimentos: (1) biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBI a partir de borra de soja – Bs; (2) detergente químico EcoQuímica[®] - Dq, e (3) surfactante químico comercial Tween80 – SqC.

Todas as soluções foram preparadas na concentração de 10,0% (m/v) pesando 5,000 g do surfactante e, posteriormente, diluindo esta massa em 0,500 L de água Milli-Q. Posteriormente, as soluções dos surfactantes Bs, Dq e SqC foram homogeneizadas em balão volumétrico de 0,500 L e, assim, armazenadas separadamente em recipientes de vidro e mantidos em geladeira a 4 °C.

4.2.1.3. Óleo lubrificante automotivo usado - OLU

O OLU utilizado em todos os experimentos foi de origem mineral, conforme sua especificação a seguir:

- Óleo lubrificante mineral usado: Shell® Helix HX5 - SAE 15W-50

A coleta foi realizada em estabelecimento comercial denominado como centro de lubrificação no município de José Bonifácio-SP.

4.2.1.4. Meios de cultura

4.2.1.4.1. Bushnell-Haas (BH)

O meio mineral Bushnell-Haas (BH) foi preparado, em balão volumétrico de 1.000 mL, pela dissolução dos sais apresentados na Tabela 6 em 1,00 L de água destilada.

Tabela 6 - Composição de sais no preparo de 1,0 L do meio Bushnell-Haas

Composto	Fórmula	Quantidade
Nitrato de amônio	NH_4NO_3	1,000 g
Fosfato de potássio dibásico	K_2HPO_4	1,000 g
Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4	1,000 g
Cloreto férrico	FeCl_3	0,500 g
Sulfato de magnésio	MgSO_4	0,200 g
Cloreto de cálcio	CaCl_2	0,020 g

4.2.1.5. Soluções

As soluções utilizadas nas análises experimentais foram preparadas conforme os procedimentos abaixo. Os reagentes utilizados foram das marcas: Merck®, Sigma-Aldrich®, Vetec® e Synth®.

4.2.1.5.1. Água destilada isenta de gás carbônico

Transferiu-se para um bquer de 1.000 mL a quantidade desejada de água destilada e levou-se ao bico de Bunsen sobre tela de amianto. Ferveu-se a água até a ebulição e, após levantar fervura, evidenciando a redução da solubilidade dos

gases no líquido, aguardou-se 30 min. Transcorrido este período, esperou-se o resfriamento do recipiente, para utilização da água na análise da biodegradação dos respirômetros (ABNT, 1999).

4.2.1.5.2. Solução de hidróxido de potássio – KOH 0,200 M

Dissolveu-se 11,2 g de KOH em 1,00 L de água destilada isenta de CO₂. A padronização desta solução foi realizada utilizando 100 g de ftalato ácido de potássio com duas gotas de indicador fenolftaleína adicionado a cerca de 50 mL de água destilada. Salienta-se que o ftalato permaneceu em estufa a 105 °C, durante 24 h, antes da padronização da solução de KOH.

A molaridade real da solução de KOH (M_{KOH}) foi calculada da seguinte forma (Equação 2):

$$M_{KOH} = \frac{100/MM}{V} \quad (2)$$

em que,

100 = massa, em gramas, de ftalato ácido de potássio utilizado;

MM = massa molecular do ftalato ácido de potássio (204,2212 g.mol⁻¹);

V = volume, em mL, de KOH gasto na viragem do indicador.

A solução de hidróxido de potássio padronizada foi armazenada em recipiente plástico.

4.2.1.5.3. Solução de ácido clorídrico - HCl 0,100 M

Transferiu-se 8,5 mL de HCl concentrado (P.A.) para um balão volumétrico de 1.000 mL. A padronização desta solução foi realizada utilizando 50 g de carbonato de sódio (Na₂CO₃) com duas gotas de indicador vermelho de metila adicionado a cerca de 50 mL de água destilada. Salienta-se que o Na₂CO₃ permaneceu em estufa a 105 °C, durante 24 h, antes da padronização da solução de HCl.

A molaridade real da solução de HCl (M_{HCl}) foi calculada da seguinte forma (Equação 3):

$$M_{HCl} = \frac{(\frac{50}{MM}) \times 2}{V} \quad (3)$$

em que,

50 = massa, em gramas, de carbonato de sódio utilizado;

MM = massa molecular do carbonato de sódio ($104,99 \text{ g.mol}^{-1}$);

V = volume, em mL, de HCl gasto na viragem do indicador.

A solução de ácido clorídrico padronizada foi armazenada em recipiente de vidro.

4.2.1.5.4. Solução de cloreto de bário - $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,500 M

Em um balão volumétrico de 100 mL, foram dissolvidos 12,2 g de cloreto de bário em 100 mL de água destilada isenta de CO_2 . Posteriormente, a solução foi armazenada em recipiente plástico.

4.2.1.5.5. Solução indicadora de fenolftaleína

Foram dissolvidos 0,20 g de fenolftaleína (P.A.) em 60 mL de etanol. Posteriormente, completou-se o volume para 100 mL com água destilada em balão volumétrico de mesmo volume.

4.2.1.5.6. Solução indicadora de vermelho de metila

Foram dissolvidos 0,20 g de vermelho de metila em 60 mL de etanol. Posteriormente, completou-se o volume para 100 mL com água destilada e a solução foi homogeneizada em constante agitação. A solução foi filtrada em algodão, quando houve formação de precipitado.

4.2.1.5.7. DCPIP

A solução do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) foi preparada na concentração de $1,00 \text{ g.L}^{-1}$. Deste modo, 0,100 g de DCPIP foram dissolvidos em 100 mL do meio salino BH e a solução homogeneizada em balão volumétrico de mesmo volume. O armazenamento da solução de DCPIP $1,00 \text{ g.L}^{-1}$ foi realizado em frasco de vidro âmbar e ao abrigo de luz.

4.2.1.6. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi *P. aeruginosa* LBI isolada por Benincasa et al. (2002) em solo contaminado por petróleo. A linhagem foi mantida em caldo nutriente com 20% de glicerol a -20°C (COSTA et al., 2006).

Quando necessário, a cultura foi inoculada em meio AN. Após ser autoclavado a 1,50 atm durante 15 min, o meio AN foi distribuído em tubos de

ensaio e estes, posteriormente, inclinados. Os repiques foram realizados periodicamente, incubados a 35 °C por 24 h e, posteriormente, utilizados ou armazenados a 4 °C em geladeira.

4.2.1.7. 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 1,00 mm para retirada de sólidos grosseiros e obtenção de material homogêneo a ser utilizada em todos os procedimentos experimentais.

4.2.2. Métodos

4.2.2.1. Solo

Após peneirado e homogeneizado, o solo foi utilizado para elaborar diferentes amostras em função do contaminante (OLU) e das condições de tratamento (soluções, tempo, etc.).

4.2.2.1.1. Contaminação 1

O preparo do solo denominado “Contaminação 1” (C1) foi realizado segundo Lopes e Bidoia (2009) e Montagnolli et al. (2009). Este procedimento foi realizado com o intuito de obter uma seleção prévia da microbiota capaz de metabolizar o OLU.

Os micro-organismos que realizam a biodegradação do óleo foram obtidos por meio de uma contaminação simulada de solo contendo 3,0 kg de solo, 50 mL de OLU e 100 mL de água destilada (Figura 12). Todo material foi acondicionado em um saco plástico perfurado, a fim de permitir o intercâmbio de micro-organismos entre o solo contendo óleo e o meio externo, visando a seleção da microbiota capaz de metabolizar este hidrocarboneto.

Pequenos furos de aproximadamente 1,0 mm de diâmetro e espaçados em 1,0 cm foram realizados em todo o saco plástico. Em seguida, este recipiente foi enterrado a 15 cm de profundidade no Jardim Experimental do Instituto de Biociências - UNESP, campus Rio Claro (Figuras 13). O saco plástico permaneceu enterrado durante 21 dias, considerando a ocorrência de uma seleção prévia de micro-organismos (LOPES; BIDOIA, 2009; MONTAGNOLLI et al., 2009).



Figura 12 - Preparo do inóculo de solo a partir de contaminação com OLU (Contaminação 1 – C1).



Figura 13 - Amostras C1 sendo enterrado no Jardim Experimental – IB/UNESP, campus Rio Claro.

Para os ensaios “Controle” (CS), analisados durante os procedimentos experimentos, foi preparado um saco plástico contendo apenas 3,0 kg solo e água destilada no mesmo volume utilizado nos experimentos com OLU (150 mL). Da mesma forma, o recipiente CS foi perfurado e enterrado durante 21 dias.

4.2.2.1.2. Contaminação 2

A amostra de solo denominada de “Contaminação 2” (C2) apresentou uma composição associada de solo C1 junto a um maior volume de OLU. Neste caso, o contaminante foi adicionado numa proporção semelhante a derrames de OLU ocorridos em ambientes terrestres (LOPES; BIDOIA, 2009; MONTAGNOLLI et al., 2009; LOPES et al., 2010). Portanto, o preparo do solo C2 utilizou a mesma concentração dos ensaios de respirometria, ou seja, 10,0% v/m (50 g de C1 e 5,0 mL de OLU). O contaminante foi adicionado devido à amostra de solo (C1) já conter os micro-organismos possivelmente biodegradadores do OLU por ter permanecido enterrado 21 dias conforme o método descrito anteriormente.

4.2.2.2. Inóculo lixiviado para ensaios de colorimetria

Para os ensaios de colorimetria foi utilizado inóculo aquoso proveniente da lavagem da “Contaminação 1” (C1). Utilizando material e soluções estéreis, 50 g de C1 e 50 mL de água permaneceram durante 24 h sob agitação a 180 rpm. Posteriormente, o lixiviado foi filtrado em filtro de papel e a solução acondicionada em frasco estéril.

4.2.2.3. Respirometria

O monitoramento da biodegradação do OLU em solo pela adição de diferentes soluções de surfactantes foi realizado por duas técnicas: respirometria e colorimetria.

A respirometria aplicada à biorremediação oferece uma série de vantagens por obter dados de produção de CO_2 de maneira simples e de baixo custo, em relação a outras metodologias (GRAVES et al., 1991). Utilizando-se o método respirométrico de Bartha, é possível determinar o comportamento do metabolismo microbiano na degradação de uma determinada substância, pela produção de CO_2 no interior do respirômetro em diferentes ensaios.

Desta forma, realiza-se a quantificação da biodegradação em determinado período de tempo, envolvendo diferentes fases de adaptação, degradação ativa e declínio deste processo (WU et al., 2004). Tais informações puderam então ser imediatamente relacionadas ao comportamento da microbiota presente nas amostras, em função da taxa de biodegradação e até mesmo da evolução da biomassa ao longo do tempo (FIÚZA et al., 2004).

O método respirométrico baseou-se na Norma Técnica L6.350 da Cetesb (1990) e na NBR 14283 (ABNT, 1999) pela utilização de frascos respirométricos, ilustrado pela Figura 14. O respirômetro de Bartha e Pramer (1965) consiste em um sistema fechado, apresentando duas câmaras conectadas. No frasco Erlenmeyer do sistema (Figura 14, indicado por G) ocorre a biodegradação do composto em análise, enquanto que o braço lateral (Figura 14, indicada por D) possui a solução alcalina capaz de assimilar o CO_2 produzido pelo metabolismo microbiano.

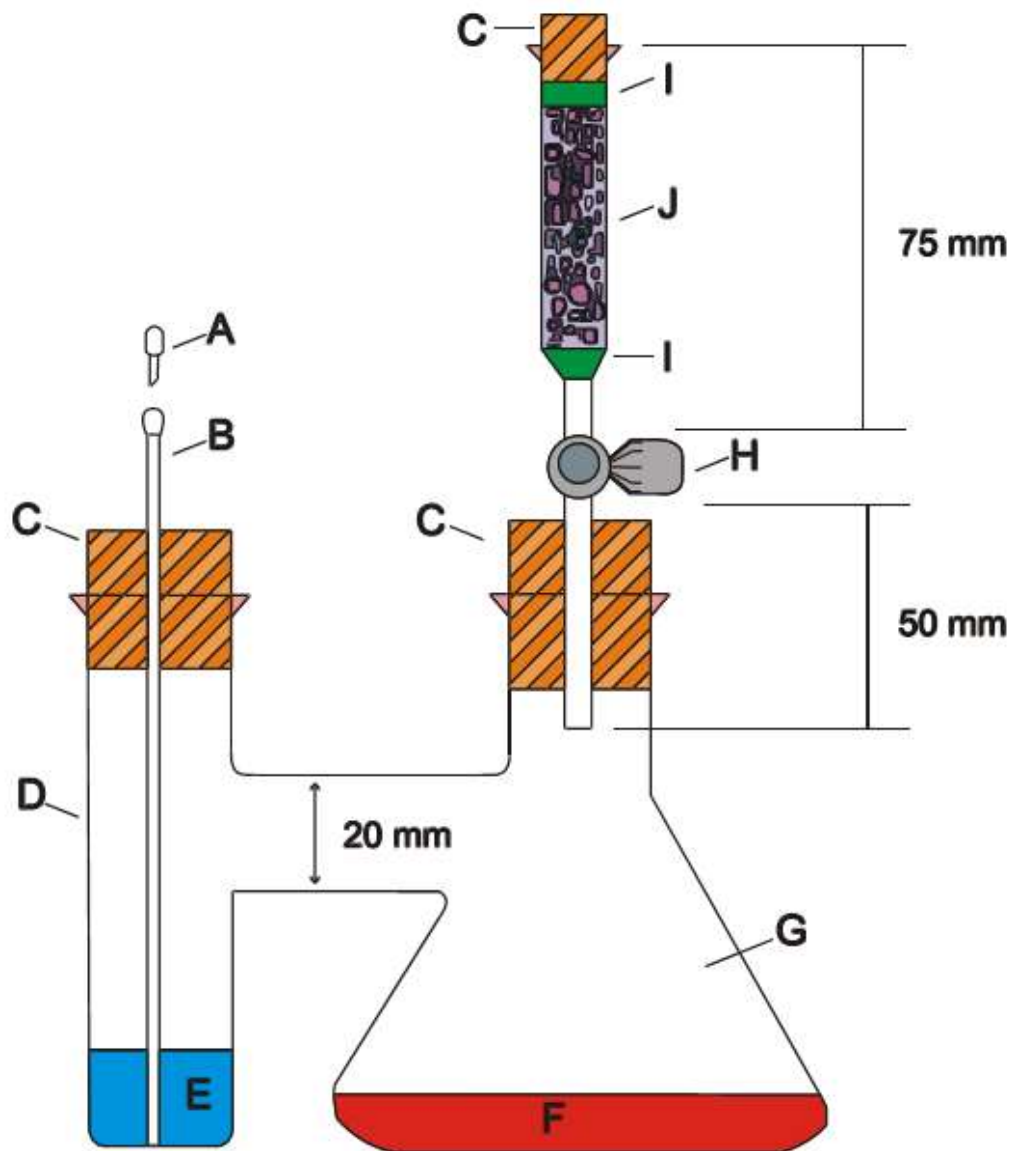
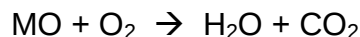


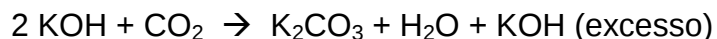
Figura 14 - Esquema de um respirômetro de Bartha (CETESB, 1990; ABNT, 1999). A: Tampa da cânula; B: Cânula (diâmetro 1-2 mm); C: Rolha de borracha; D: Braço lateral (diâmetro 40 mm; altura 100 mm); E: Solução alcalina de KOH; F: Amostra de solo; G: Frasco Erlenmeyer (250 mL); H: Válvula; I: Suporte (lã de vidro ou algodão); J: Filtro de cal sodada (diâmetro 15 mm; altura 40 mm).

Por meio da respirometria, o CO_2 produzido durante a respiração microbiana é capturado pela solução de hidróxido de potássio (KOH) localizada no braço lateral. Sua quantificação é determinada por titulação do KOH residual com solução padrão de ácido clorídrico (HCl), após a adição do cloreto de bário (BaCl_2), para precipitar os íons carbonato. Logo, os níveis de dióxido de carbono evoluídos podem ser calculados e representados em função do tempo de incubação (BALBA et al., 1998). Todo o processo pode ser esquematizado pelas reações abaixo:

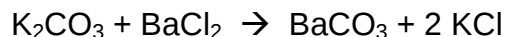
Biodegradação da matéria orgânica (MO):



Absorção do CO_2 gerado:



Reação do cloreto de bário com o carbonato de potássio:



Titulação do excesso de KOH com HCl:



Substâncias resultantes:



4.2.2.3.1. Montagem dos ensaios

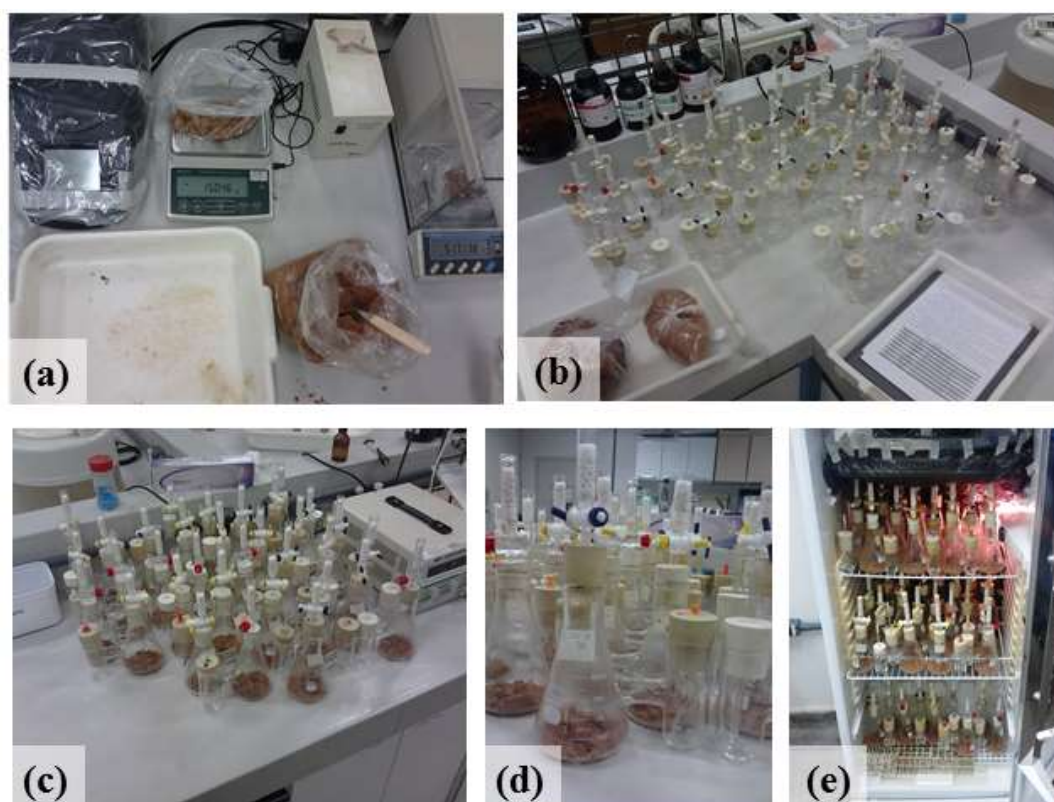
O monitoramento da biodegradação pelo método respirométrico avaliou a contaminação de solo contaminado com OLU pela adição de inóculo de *P. aeruginosa* LBI (Ps) e diferentes soluções de surfactante (Dq, Bs, SqC). As amostras de solo utilizadas foram C1 e C2.

Assim, foram preparados 14 sistemas em triplicata (Figura 15), sendo: três controles do meio (solo/CS, contaminação 1/C1 e contaminação 2/C2); três controles dos surfactantes (C1 Dq, C1 Bs e C1 SqC), um controle do inóculo de *P. aeruginosa* LBI (C1-Ps) e sete com OLU (C2 Dq, C2 Bs, C2 SqC, C2-Ps, C2 Dq-Ps, C2 Bs-Ps e C2 SqC-Ps).

Todos os respirômetros apresentaram $50 \pm 0,1$ g da amostra de solo. Quando adicionadas as soluções de surfactantes e do inóculo de *P. aeruginosa* nos respirômetros, seus volumes foram respectivamente de 5,0 mL e 2,0 mL. Porém, nos sistemas controles estas substâncias foram substituídos por água destilada. Na Tabela 7 está demonstrada a composição dos sistemas respirométricos.

Tabela 7 - Composição dos sistemas respirométricos

Composição		
Sistema 01	Controle	50 g de solo + 12,0 mL de água
Sistema 02	C1	50 g de C1 + 12,0 mL de água
Sistema 03	C1 Dq	50 g de C1 + 5,0 mL de Dq + 7,0 mL de água
Sistema 04	C1 Bs	50 g de C1 + 5,0 mL de Bs + 7,0 mL de água
Sistema 05	C1 SqC	50 g de C1 + 5,0 mL de SqC + 7,0 mL de água
Sistema 06	C1-Ps	50 g de C1 + 2,0 mL de Ps + 10,0 mL de água
Sistema 07	C2	50 g de C2 + 7,0 mL de água
Sistema 08	C2 Dq	50 g de C2 + 5,0 mL de Dq + 2,0 mL de água
Sistema 09	C2 Bs	50 g de C2 + 5,0 mL de Bs + 2,0 mL de água
Sistema 10	C2 SqC	50 g de C2 + 5,0 mL de SqC + 2,0 mL de água
Sistema 11	C2-Ps	50 g de C2 + 2,0 mL de Ps + 5,0 mL de água
Sistema 12	C2 Dq-Ps	50 g de C2 + 5,0 mL de Dq + 2,0 mL de Ps
Sistema 13	C2 Bs-Ps	50 g de C2 + 5,0 mL de Bs + 2,0 mL de Ps
Sistema 14	C2 SqC-Ps	50 g de C2 + 5,0 mL de SqC + 2,0 mL de Ps

**Figura 15** - Montagem dos sistemas respirométricos para o monitoramento da biodegradação. (a) pesagem das amostras de solo; (b) montagem dos frascos de Bartha; (c) preparo dos sistemas; (d) sistema respirométrico; e (e) incubação dos respirômetros em câmara BOD a 28 °C.

4.2.2.3.2. Acompanhamento da biodegradação

O acompanhamento da biodegradação pelo método respirométrico foi realizado por um período de 181 dias. Cada respirômetro contem um braço lateral, ao qual foi adicionado 10 mL da solução de KOH 0,200 M para capturar o CO₂ liberado durante a biodegradação. A titulação do KOH residual foi realizada pela solução de HCl 0,100 M, após ser adicionado 1,0 mL de BaCl₂ 0,500 M e duas gotas do indicador fenolftaleína.

O procedimento de análise química iniciou-se pela retirada da rolha de borracha e abrindo a válvula do filtro de cal sodada. Em seguida, removeu-se a vedação da cânula do braço lateral e, com uma seringa de 10 mL, transferiu-se a solução de KOH do braço lateral para um Erlenmeyer de 125 mL (Figura 14, indicado por E). Em seguida, preencheu-se a seringa com 10 mL de água destilada isenta de gás carbônico e injetou-se no braço lateral do respirômetro para a lavagem. Com esta mesma seringa, transferiu-se o volume de água da lavagem para o mesmo Erlenmeyer. O processo de lavagem foi repetido mais uma vez, totalizando 30 mL no Erlenmeyer. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de BaCl₂ e duas gotas de fenolftaleína, sendo imediatamente titulado com HCl 0,100 M.

Mantendo a cânula do braço lateral aberta, injetou-se ar comprimido com uma bomba de ar durante 2 min em cada respirômetro. O ar passou através do filtro de cal sodada, com função de reter o CO₂ do ar introduzido, de forma a garantir a oxigenação, sem permitir a entrada de CO₂ na atmosfera do sistema. Por fim, foram adicionados 10 mL de uma solução de KOH 0,200 M no braço lateral e o sistema foi fechado recolocando a vedação da cânula e a rolha de borracha no filtro.

O monitoramento da produção de CO₂ evoluído nos frascos respirométricos foi analisado semanalmente. Após cada determinação, os respirômetros foram fechados e incubados a 28 °C.

Para cada etapa de quantificação da produção de CO₂, foi preparada uma prova em branco contendo 10 mL de KOH 0,200 M, 20 mL de água destilada isenta de gás carbônico, 1,0 mL de BaCl₂ 0,500 M e 2 gotas de fenolftaleína. Da mesma forma, a solução foi titulada com HCl 0,100 M, anotando-se o volume necessário para a viragem do indicador fenolftaleína. O cálculo do CO₂ gerado foi feito de acordo com o volume gasto de HCl na titulação do KOH, conforme a Equação 4:

$$GCO_2 = (A - B) \times 50 \times \theta_{HCl} \times 0,044 \quad (4)$$

em que,

GCO₂ = geração de gás carbônico em mg;

A = volume de HCl 0,100 M gasto, em mL, na titulação do branco;

B = volume de HCl 0,100 M gasto, em mL, na titulação da amostra;

50 = fator de transformação equivalente em μmol de CO₂;

Θ_{HCl} = fator de correção da solução de HCl 0,100 M;

0,044 = fator de transformação μmol em mg de CO₂.

4.2.2.3.3. Modelagem Matemática

Os dados de produção de CO₂ foram utilizados no ajuste de modelos matemáticos que melhor descrevem o processo de biodegradação. A modelagem dos dados permite um melhor conhecimento da cinética de biodegradação, possibilitando assim prever e otimizar o processo (KERNANSHANI et al., 2006). O uso de ferramentas matemáticas e estatísticas é uma maneira eficaz de descrever os parâmetros envolvidos na remoção de poluentes durante a biodegradação (PALA et al., 2006). A proposição de diferentes modelos para cada sistema respirométrico avaliado permitiu determinar de que maneira os perfis de biodegradação variam para cada biotratamento proposto ao longo do tempo.

Os dados foram analisados pelos *softwares* Systat SigmaStat 10, Microcal Origin 6.0 e Systat SigmaPlot 11. A partir das curvas geradas foram realizadas análises descritivas dos dados. Para a modelagem dos dados e ajuste em equações foram utilizados o *software* Systat SigmaPlot 11 e a plataforma Wolfram Mathematica 6.

Foi utilizado um modelo matemático diferente para cada tipo de produção de CO₂ (acumulada e semanal), segundo Montagnolli et al. (2009). Estes autores elaboraram o ajuste de dados a partir de modelos existentes, que correspondem à cinética de crescimento de culturas microbianas, conforme descrito a seguir.

O primeiro modelo foi proposto para as curvas de respirometria semanal (Equação 5). Deste modo, utilizou-se a equação proposta por Membré et al. (1996). No cálculo do tempo estimado para o término da biodegradação (BR_{minT}), foi utilizado uma produção igual a 2,709 mg de CO₂, referente à média obtida no ensaio controle (CS).

$$B = \left[\left(\frac{1}{K1} \right) e^{-m1t} + \left(\frac{1}{K2} \right) e^{m2t} \right]^{-1} \quad (5)$$

em que,

- B = CO₂ produzido;
 K1 = constante de aumento de produção de CO₂;
 k2 = constante de diminuição de produção de CO₂;
 m1 = taxa de aumento na produção de CO₂;
 m2 = taxa de diminuição na produção de CO₂;
 t = tempo.

Outro modelo ajustado foi uma adaptação da equação logística de Schmidt et al. (1985). A equação abaixo fornece a previsão da máxima produção acumulada de CO₂ pelos micro-organismos no processo de biodegradação (Equação 6).

$$B = Bmax / (1 + \left[\frac{Bmax - Bo}{Bo} \right] e^{-rt}) \quad (6)$$

em que,

- B = CO₂ produzido;
 Bmax = produção máxima de CO₂;
 Bo = produção inicial de CO₂;
 r = taxa máxima de produção específica;
 t = tempo.

4.2.2.4. Colorimetria

O indicador 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) é um composto químico cuja cor se altera quando reduzido. Quando o indicador está oxidado, sua coloração é azul, e quando reduzido é incolor.

A mudança de cor é devida à mudança na estrutura da molécula de DCPIP. O átomo de nitrogênio no centro da molécula é o aceptor de elétrons, onde ocorre a mudança da ligação dupla entre nitrogênio e carbono para uma ligação simples (Figura 16). A mudança na ligação faz com que ocorra uma alteração da molécula. Sendo assim, a redução causa a mudança de cor de azul para incolor. Esta

mudança de cor pode, portanto, ser usada em uma série de reações em que ocorram trocas de elétrons, como a biodegradação (BIDOIA et al., 2010).

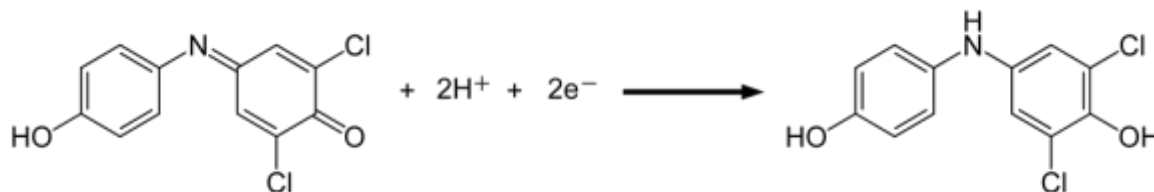


Figura 16 - Reação do indicador 2,6-diclorofenol-indofenol comoceptor de elétrons. A mudança na ligação dupla entre o nitrogênio e carbono altera a estrutura da molécula (BIDOIA et al., 2010).

A colorimetria utilizando indicador DCPIP estabeleceu a comparação da velocidade de degradação de OLU pela aplicação do detergente químico EcoQuímica[®](Dq), do Tween80 (SqC), do ramnolipídio (Bs) e do inóculo de *P. aeruginosa* LBI (Ps). Também, foi possível observar a biodegradação do lubrificante pelos micro-organismos obtidos em C1.

A metodologia utilizada seguiu Bidoia et al. (2010) e Hanson et al. (1993) com adaptações, e os resultados consideraram o tempo necessário para a total descoloração como indicador de biodegradação do óleo e as mudanças na absorbância ao longo do tempo de incubação.

Sobre o indicador DCPIP foi necessário estabelecer o comprimento de onda de maior absorbância, no qual foram feitas leituras ao longo da biodegradação, utilizando o espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu[®] 2401 PC. Também, foi calculada, com o espectrofotômetro Hach[®] Odissey DR-2500, uma reta padrão no comprimento de onda de maior absorbância a partir de cinco diluições do indicador em caldo BH. Deste modo, foi determinada a quantidade, em mg, de DCPIP em sua presente em solução ao longo do processo de biodegradação.

4.2.2.4.1. Montagem dos ensaios

A colorimetria foi conduzida em tubos de ensaio com tampa, próprios para leitura no espectrofotômetro Hach[®] Odissey DR-2500. As quantidades e substâncias utilizadas nos ensaios colorimétricos estão apresentadas pela Tabela 8.

Na montagem dos ensaios colorimétricos, realizados em triplicata, foi utilizado: (1) o meio BH com o indicador - DCPIP; (2) inóculo de *P. aeruginosa* LBI – Ps; (3) o óleo lubrificante usado – OLU; e (4) as soluções aquosas de surfactantes

químicos e biossurfactante – Dq, SqC e Bs. Depois de montados, cada um dos tubos foi colocado em agitador de tubos, por 10 s, e incubados a 35°C por 120 h.

Tabela 8 - Composição dos ensaios colorimétricos

Ensaio	Composição	Volumes					
		Meio BH (mL)	DCPIP (μL)	OLU (μL)	Inóculo Ps (μL)	Surfact. (μL)	Água (μL)
Branco	<i>BH</i>	7,5	-	-	-	-	1000
C.Meio	<i>BH+DCPIP</i>	7,5	400	-	-	-	500
C.OLU	<i>BH+DCPIP+OLU</i>	7,5	400	50	-	-	450
C.SqC	<i>BH+DCPIP+SqC</i>	7,5	400	-	-	250	250
C.Bs	<i>BH+DCPIP+Bs</i>	7,5	400	-	-	250	250
C.-Ps	<i>BH+DCPIP+Ps</i>	7,5	400	-	200	-	300
SqC-Ps	<i>BH+DCPIP+Ps+SqC</i>	7,5	400	-	200	250	50
Bs-Ps	<i>BH+DCPIP+Ps+Bs</i>	7,5	400	-	200	250	50
OLU SqC	<i>BH+DCPIP+OLU+SqC</i>	7,5	400	50	-	250	200
OLU Bs	<i>BH+DCPIP+OLU+Bs</i>	7,5	400	50	-	250	200
OLU-Ps	<i>BH+DCPIP+OLU+Ps</i>	7,5	400	50	200	-	250
OLU SqC-Ps	<i>BH+DCPIP+OLU+Ps+SqC</i>	7,5	400	50	200	250	-
OLU Bs-Ps	<i>BH+DCPIP+OLU+Ps+Bs</i>	7,5	400	50	200	250	-

4.2.2.4.2. Acompanhamento da biodegradação

A descoloração do DCPIP, que indica ocorrência do processo de biodegradação, foi monitorada três vezes ao dia (a cada 8 h) até o total de 120 h. Assim, a coleta de dados pela medida de absorbância nos tubos foi feita diariamente às 7:00 h, 15:00 h e 23:00 h. As medidas quantitativas foram realizadas em espectrofotômetro Hach® Odissey DR-2500 pela leitura de absorbância no comprimento de 600 nm em todos os tubos.

4.2.2.4.2.1. Reta padrão DCPIP

Previamente à análise quantitativa da biodegradação por leituras de absorbância, foi determinada a reta padrão para concentração de DCPIP. O comprimento de máxima absorbância do DCPIP, em 600 nm, foi obtido por espectrofotometria UV-Vis (Figura 17).

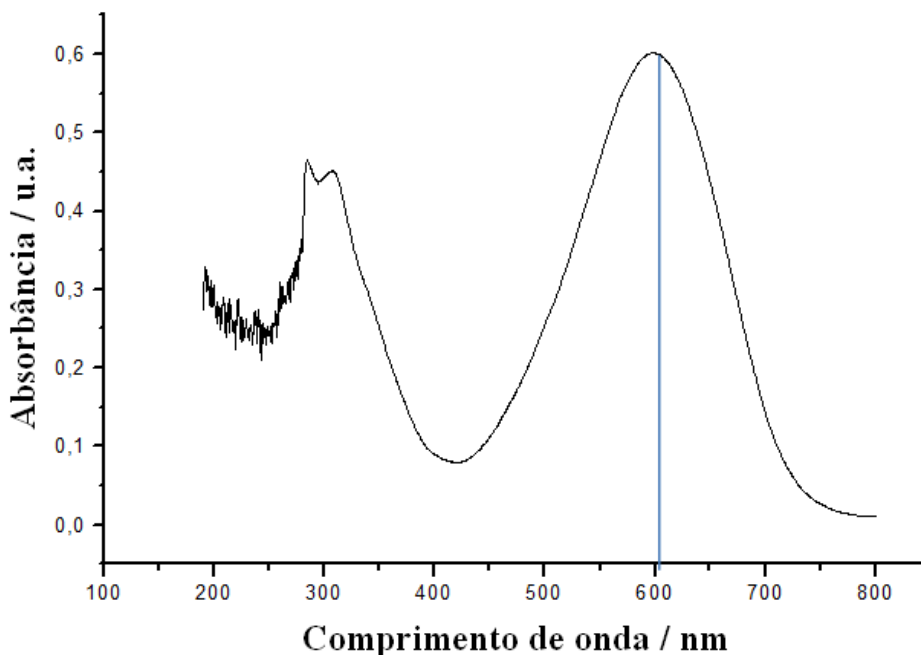


Figura 17 - Espectro de absorção UV-Vis do indicador redox DCPIP.

Logo, foram realizadas leituras de absorbância a 600 nm nos tubos contendo as cinco soluções de concentrações conhecidas no espectrofotômetro Hach® Odissey DR-2500, conforme apresentado pela Tabela 9.

Tabela 9 - Composição dos tubos, concentração de DCPIP e valores de absorbância obtidos na elaboração da reta padrão

Tubos	Volumes (mL)			[DCPIP]	Abs ₆₀₀
	Meio BH (mL)	DCPIP 1,0 g.L ⁻¹ (mL)	Água destilada (mL)	(mg.L ⁻¹)	u.a.
0	7,5	0	0,9	0	0
1	7,5	0,05	0,85	5,952	0,382
2	7,5	0,1	0,8	11,905	0,767
3	7,5	0,2	0,7	23,809	1,505
4	7,5	0,3	0,6	35,714	2,296
5	7,5	0,4	0,5	47,619	2,931

A partir dos dados de absorbância e das concentrações de DCPIP em solução, foi obtido a reta padrão ($R^2 = 0,999$) e expressa pela Equação 7 abaixo:

$$[DCPIP] = (15,171 * Abs_{600}) - 0,488 \quad (7)$$

em que,

[DCPIP] = concentração do indicador redox DCPIP , em mg.L^{-1} ;

Abs_{600} = absorvância no comprimento de onda 600 nm.

4.3. Resultados

4.3.1. Respirimetria

Com o método respirométrico, a produção de CO_2 a partir do metabolismo microbiano, utilizando o OLU como substrato, foi calculada e representada em função do tempo de biodegradação para os sistemas realizados. Na Figura 18 está a produção semanal de CO_2 em cada um dos tratamentos realizados. Na Figura 19 estão os resultados de CO_2 acumulado, ou seja, a somatória do total de gás carbônico gerado em cada um dos sistemas em duplicatas ao longo do tempo.

A partir desses dados é possível observar quais dos tratamentos contendo OLU, surfactantes químicos, biossurfactante e inóculo bacteriano apresentaram maior taxa de biodegradação, e quanto de CO_2 foi liberado dos sistemas durante e ao término do monitoramento da biodegradação.

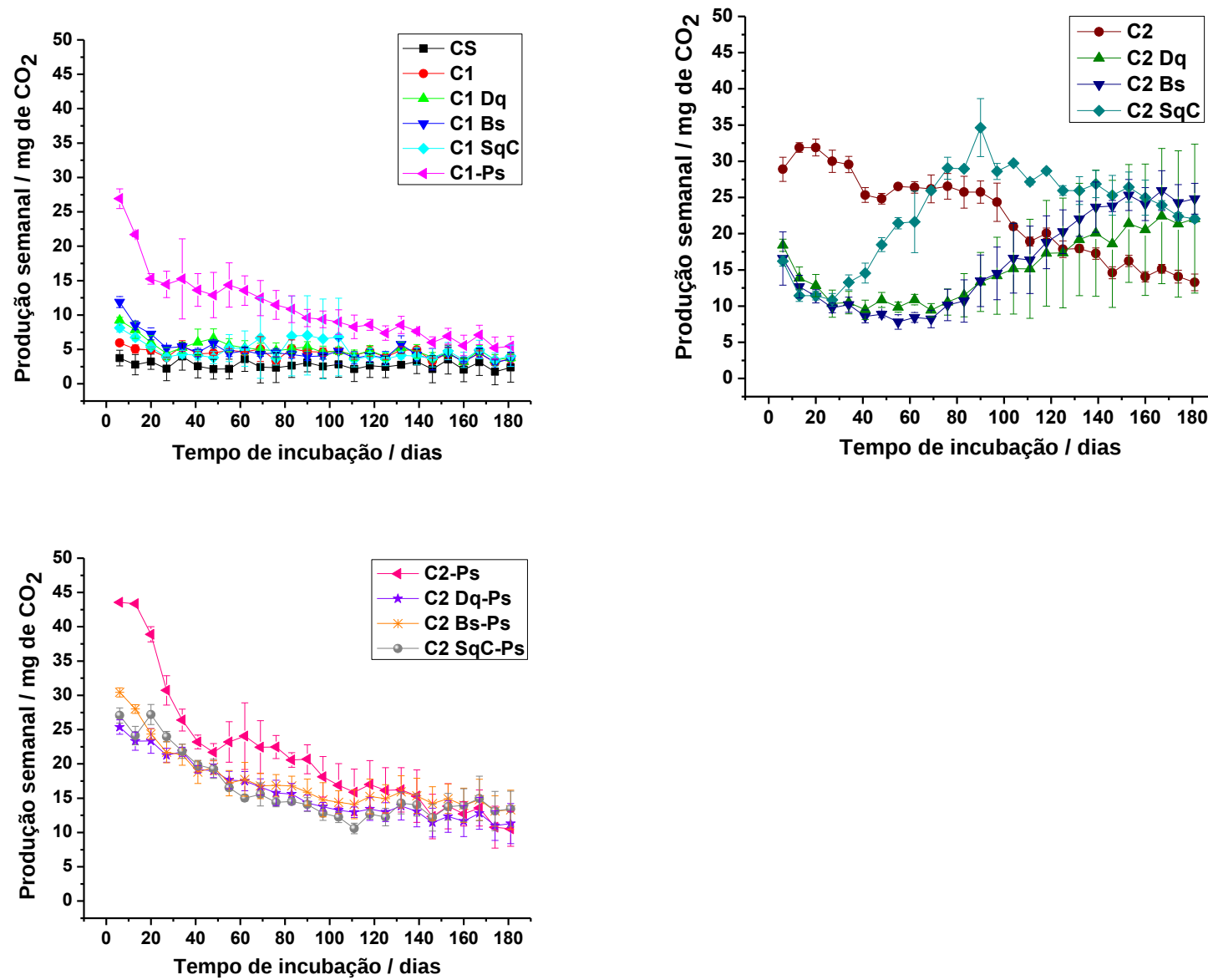


Figura 18 - Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação - respirometria.

Diferentes curvas de produção semanal de CO₂ foram observadas (Figura 18). Como esperado, o sistema CS foi o que apresentou a menor produção de semanal de CO₂ (média de 2,71 mg de CO₂.semana⁻¹). Tal fato deve-se à baixa quantidade de matéria orgânica presente no solo controle, revelando apenas uma respiração basal da microbiota indígena deste substrato.

Os sistemas com menor concentração de OLU (C1) foram utilizados como ensaios controle para os surfactantes (Bs, Dq e SqC), uma vez que seu preparo tinha como finalidade o preparo do inóculo pela prévia seleção dos micro-organismos no solo. Neste sentido, tem-se que C1, C1 SqC, C1 Bs e C1 Dq apresentaram comportamentos semelhantes na produção de CO₂ semanal, com taxas um pouco maiores que em CS. As médias de produção ficaram entre 4,47 e 5,10 mg de CO₂.semana⁻¹. Assim, o impacto da adição das soluções de tensoativos no solo foi pequeno, visto que os resultados estavam próximos ao ensaio C1 ausente de surfactantes. Porém, quando houve bioaugmentação neste sistema (C1-Ps), a média semanal de CO₂ produzido aumentou para 11,06 mg, além da maior taxa nas semanas iniciais. A produção de 43,56 mg encontrada na primeira semana, evidencia que a bactéria *P. aeruginosa* LBI foi capaz de degradar o hidrocarboneto logo nos primeiros dias.

O mesmo resultado foi encontrado quando utilizado o solo contaminado com OLU em maior concentração (C2). Os maiores picos observados na Figura 18 foram nas duas primeiras semanas para C2-Ps. A inoculação desempenhou uma maior eficiência de degradação, principalmente, no início do tratamento. Além disso, notou-se que o sistema C2-Ps apresentou a terceira maior média de produção semanal com 21,18 mg de CO₂.

Em relação à adição de surfactante nos biotratamentos avaliados, foram observados diferentes efeitos na taxa de biodegradação. No caso do detergente químico (Dq), a biodegradabilidade do OLU foi prejudicada. Em comparação a C2, o sistema C2 Dq teve 32,1% de queda na média de produção semanal de CO₂. O comportamento do processo de biodegradação nesse ensaio apresentou-se diferente dos outros, com redução contínua na taxa de CO₂, até o 69º dia e posterior aumento. O valor mais alto, designado o pico de produção, somente ocorreu no final do ensaio (167º dia). Igualmente, a biodegradação do sistema contendo o biossurfactante (C2 Bs) demonstrou o mesmo perfil e, além disso, obteve menos 28,5% de CO₂ produzido por semana do que C2. Estes resultados indicam um

possível efeito tóxico de Dq e Bs para o ensaio proposto, já que não conseguiram melhor eficiência de tratamento e demonstraram menor atividade microbiana no início.

Ainda analisando o detergente químico e o ramnolipídio, os sistemas contendo surfactantes e inóculo de *Pseudomonas* novamente apresentaram comportamento semelhante. Houve melhora no tratamento tanto para C2 Dq-Ps, quanto para C2 Bs-Ps, e, mais uma vez, o biossurfactante revelou ser mais eficaz pela maior produção semanal de CO₂. A bioaugmentação favoreceu em 4,50% a taxa para C2 Dq-Ps e em 8,86% para C2 Bs-Ps. Em comparação, C2 Dq-Ps obteve seu pico com 25,37 mg de CO₂ produzido, enquanto C2 Bs-Ps apresentou 30,43 mg de CO₂ como valor mais alto.

Já o surfactante químico comercial (SqC – Tween80) demonstrou perfis de degradação bem diferentes, quando adicionado o inóculo Ps, em relação aos surfactantes Bs e Dq. A média de produção semanal do sistema C2 SqC foi de 22,92 mg de CO₂, tornando-o com a maior taxa dentre todos os ensaios. Ainda, seu valor máximo, atingido na 13^a semana, foi de 34,65 mg (segundo maior). A diferença entre este sistema com os ensaios com Bs e Dq está no fato de que, com a inoculação de *P. aeruginosa*, a taxa de biodegradação reduziu 28,89% em relação a C2 SqC. Ademais, o pico de produção de produção de CO₂ no ensaio C2 SqC-Ps foi de 27,21 mg de CO₂, valor este menor que os dos ensaios C2-Ps, C2 SqC, C2 e C2 Bs-Ps.

A produção acumulada soma todo o gás carbônico produzido nos frascos respirométricos, ao longo do processo de biodegradação (Figura 19). Da mesma forma que os resultados do monitoramento semanal (Figura 18), a taxa acumulada revelou que a aplicação das soluções dos diferentes tipos de surfactantes (Bs, Dq e SqC) demonstrou padrões distintos na biodegradação do OLU. Também, foi demonstrado que, quando o inóculo Ps foi adicionado, houve na maioria dos ensaios, um efeito positivo na produção de CO₂.

Na Tabela 10, estão expressos os valores acumulados da taxa de CO₂ produzido em cada sistema, após 181 dias de monitoramento.

Tabela 10 - Produção acumulada de CO₂ nos ensaios respirométricos, após 181 dias

Sistema	CO ₂ acumulado (mg)	Sistema	CO ₂ acumulado (mg)
Controle	70,44	C2 Dq	396,70
C1	116,09	C2 Bs	417,52
C1 Dq	132,51	C2 SqC	595,98
C1 Bs	127,78	C2-Ps	550,55
C1 SqC	128,48	C2 Dq-Ps	414,55
C1-Ps	287,54	C2 Bs-Ps	454,52
C2	584,25	C2 SqC-Ps	423,79

Em se tratando das amostras de solo contaminadas com OLU (C1 e C2), foi possível concluir que os sistemas contendo maior volume do óleo (C2) resultaram numa maior produção de CO₂. Portanto, a maior atividade observada nestes sistemas permitiu concluir que a microbiota terrestre, previamente selecionada, foi capaz de metabolizar este hidrocarboneto.

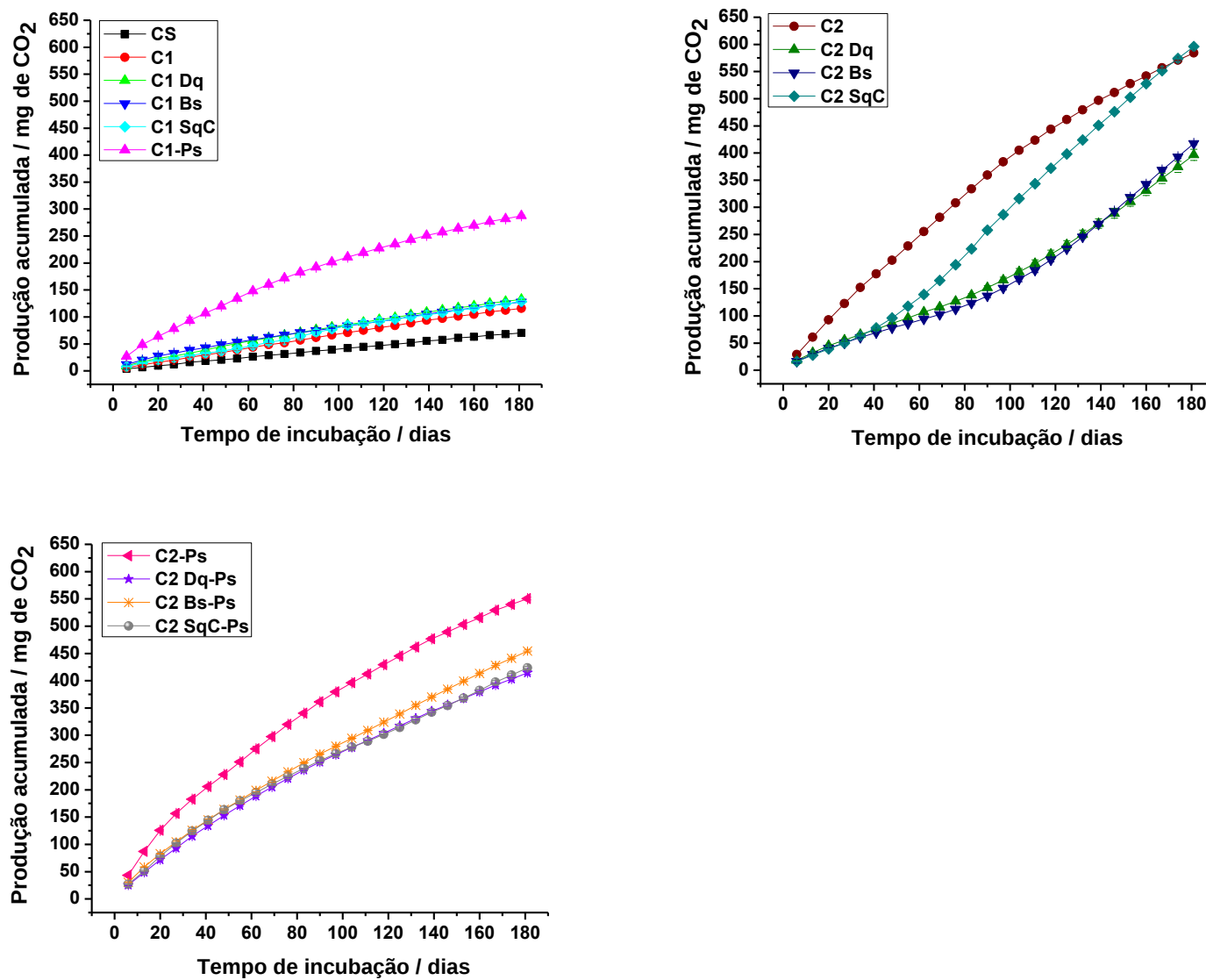


Figura 19 - Produção de CO₂ acumulada pelo tempo de incubação - respirometria.

A produção acumulada reflete com clareza os resultados discutidos a partir dos dados observados na Figura 19. Pela Tabela 10, o sistema de menor produção de CO₂ foi o controle CS, seguido dos ensaios C1 e C1 mais surfactante (C1 Bs, C1 SqC e C1 Dq). Porém, ao adicionar o inóculo (C1-Ps), o perfil de biodegradação mudou bastante (Figura 19) e a respiração microbiana no sistema deu um grande salto, atingindo 287,54 mg de CO₂ após 181 dias. O sucesso em inocular micro-organismos nos solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo deve-se à capacidade destes micro-organismos em assimilar o composto em seu metabolismo mais fácil e/ou mais rapidamente que outros grupos. Assim, a bioaugmentação representa uma alternativa de grande valor no aperfeiçoamento do processo de biorremediação (RUBERTO et al., 2003; BENTO et al., 2005; TACCARI et al., 2012; SZULC et al., 2014). O gênero *Pseudomonas* também produz tensoativos (ramnolipídios) que aumentam a biodisponibilidade do composto hidrofóbico e, portanto, favorecem seu metabolismo (NITSCHKE et al., 2005b).

Na sequência, encontram-se os sistemas C2 Dq e C2 Dq-Ps que evidenciam o fator prejudicial ao processo de degradação do óleo, quando utilizado o detergente químico. Neste sentido, foi observado que a toxicidade de um surfactante provavelmente altera a composição das populações microbianas responsáveis por realizar a degradação do hidrocarboneto (CHEN et al., 2000; COLORES et al., 2000).

Em relação ao ramnolipídio, notou-se que a adição do inóculo proporcionou um aumento de 8,90% na taxa de CO₂ ao comparar C2 Bs e C2 Bs-Ps. Além disso, o efeito do biossurfactante na biodegradação do OLU foi positivo visto que estes sistemas apresentaram maior atividade em comparação com os ensaios C2 Dq e C2 Dq-Ps. O aumento na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo é devido à interação óleo-surfactante-micro-organismo que facilita e estimula a microbiota do solo em degradar os compostos poluentes (JAIN et al., 1992; WHANG et al., 2008).

Por fim, tem-se os sistemas C2 SqC e C2 SqC-Ps. O ensaio C2 SqC foi o que apresentou maior produção de CO₂ (595,98 mg) e C2 SqC-Ps foi o quinto maior produtor de CO₂ (423,79 mg).

4.3.1.1. Modelagem Matemática

Os padrões na distribuição dos dados de produção de CO₂ ao longo do tempo, observados nas Figuras 20 e 21, permitiram a proposta de modelos

matemáticos acerca do processo de biodegradação. A modelagem dos dados permitiu um melhor conhecimento da cinética do processo e, com isso, prever e otimizar as condições de tratamento (KERNANSHANI et al., 2006).

Na Figura 19 estão apresentados os ajustes das curvas experimentais pela produção de CO₂ semanal (Figura 20), utilizando o modelo de Membré et al. (1996) adaptado por Montagnolli et al. (2009).

Cada curva obtida gerou um índice de correlação (R^2) que demonstra a adequação do ajuste dos dados ao modelo. A equação do modelo utilizado consiste de duas partes, uma delas descreve o crescimento e a outra o declínio da curva. A partir do ajuste aos dados, foi possível prever o comportamento cinético esperado de cada sistema respirométrico nas suas respectivas taxas de produção semanal de CO₂ durante o processo de biodegradação.

Além disso, na Figura 20, o eixo que designa o tempo de incubação foi estendido para 520 dias, superior ao intervalo de 181 dias utilizado para coleta de dados. Assim, utilizou-se o modelo para prever a cinética de produção de CO₂ com monitoramento até 520 dias de biodegradação.

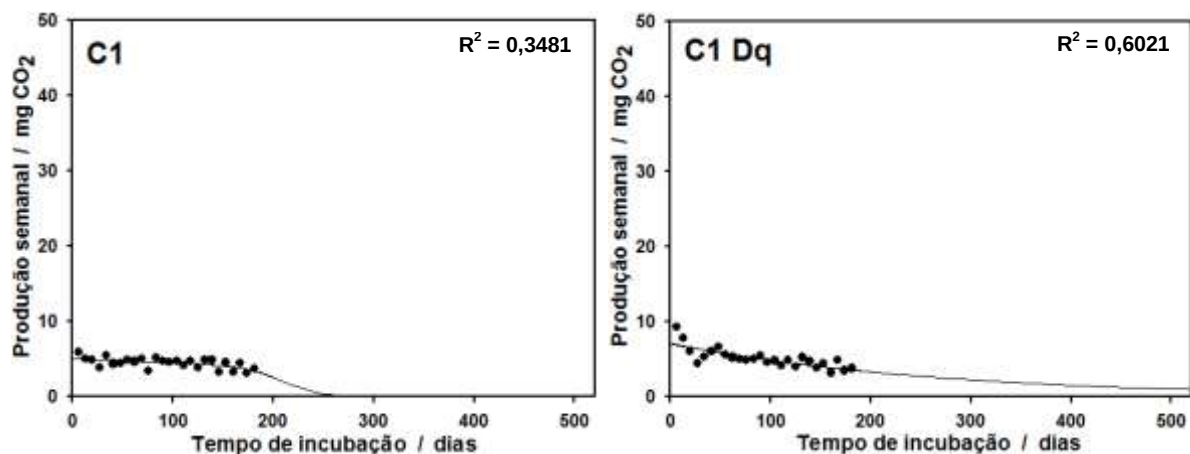


Figura 20 - Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação de cada sistema respirométrico ajustada ao modelo de Membré et al. (1996) e Montagnolli et al. (2009).

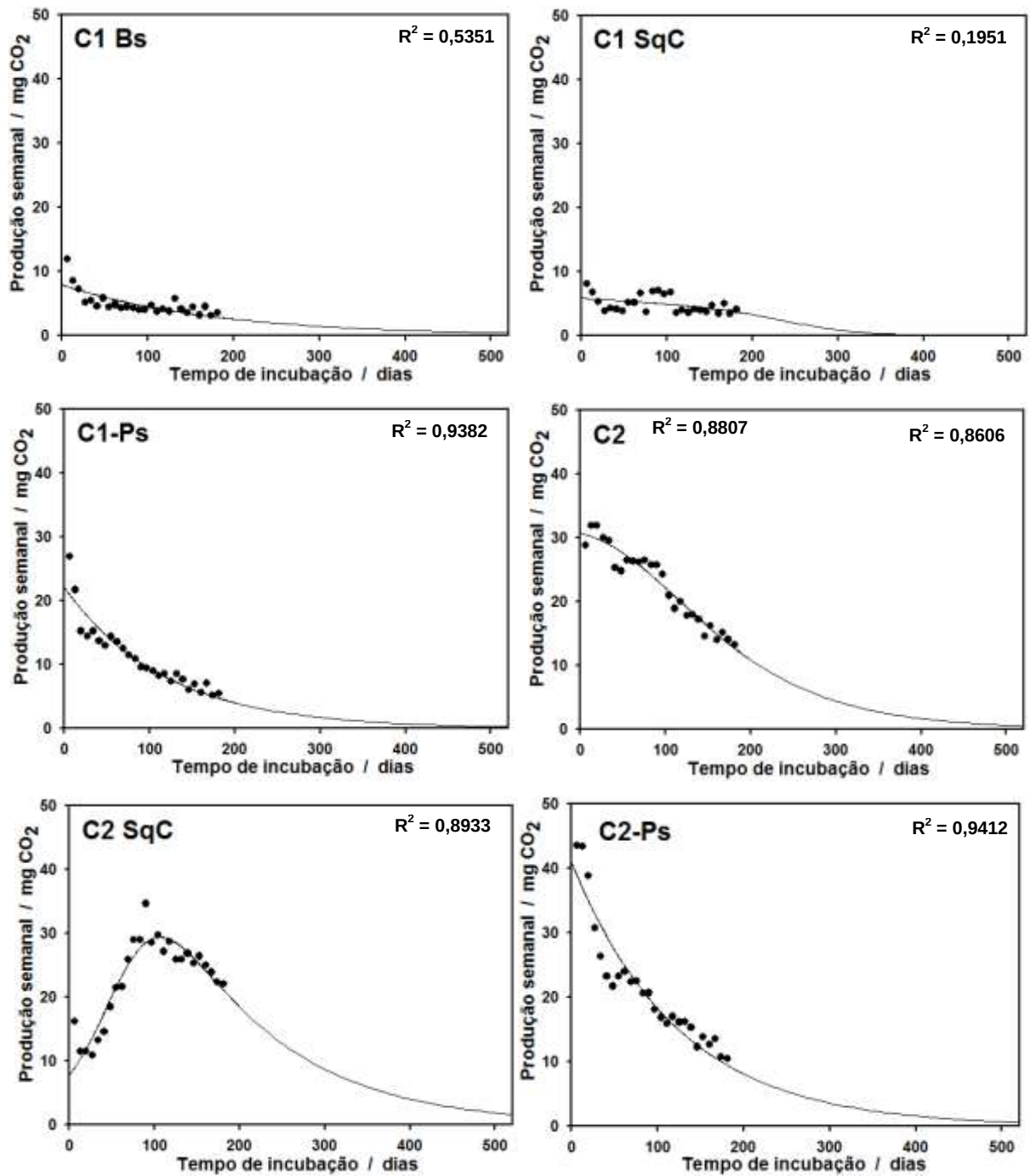


Figura 20 - Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação de cada sistema respirométrico ajustada ao modelo de Membré et al. (1996) e Montagnolli et al. (2009).

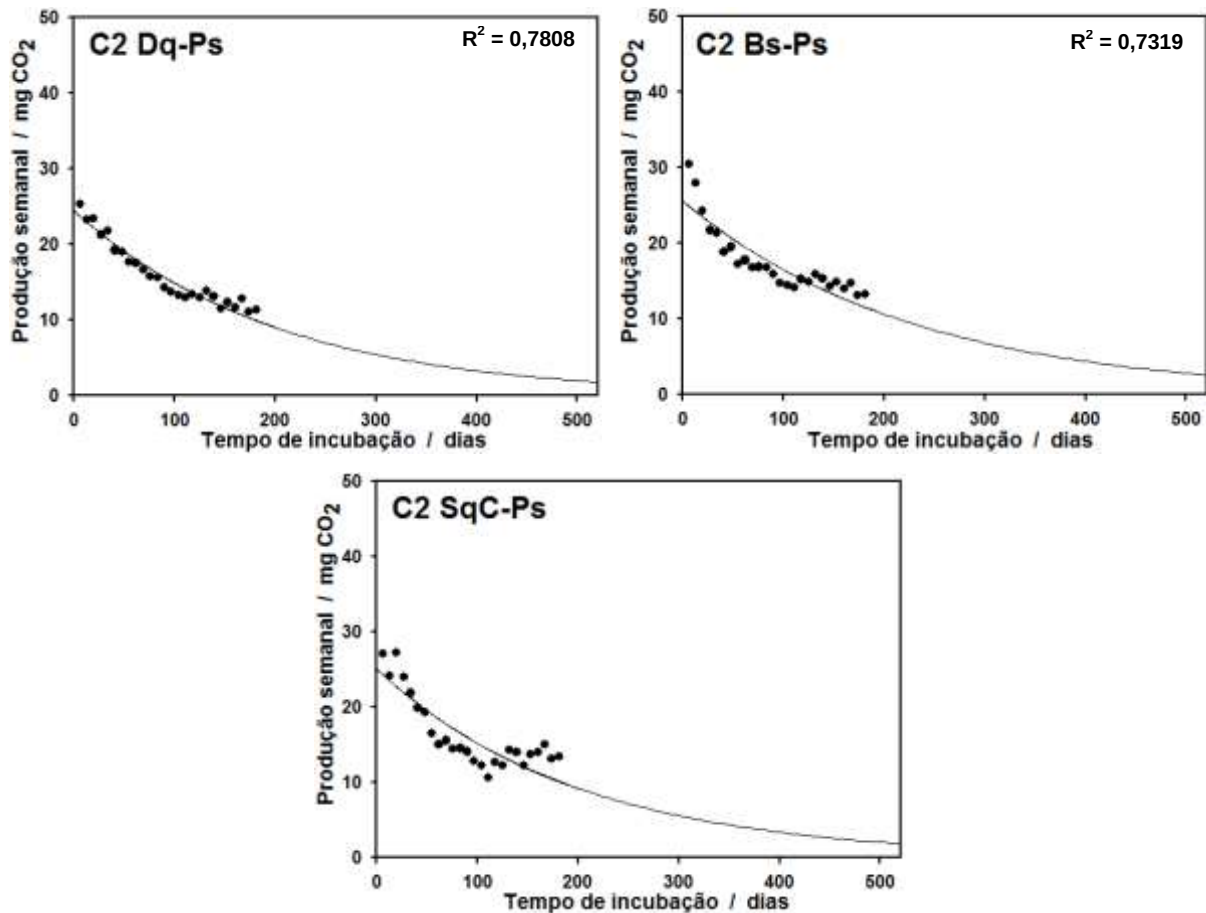


Figura 20 - Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação de cada sistema respirométrico ajustada ao modelo de Membré et al. (1996) e Montagnolli et al. (2009).

Dentre os conjuntos de dados de produção semanal de CO₂, o sistema CS foi o único em que o modelo proposto não se ajustou. Após cerca de um milhão de iterações dos parâmetros no ajuste ao modelo, o R² ainda apresentava valores de aproximadamente 0,0874. Isso pode ter ocorrido pelo fato da produção de CO₂ ter sido muito baixa e aleatória, não seguindo uma tendência ajustável ao modelo.

De acordo com a Figura 20, também foi possível notar que o ajuste foi inadequado para os sistemas C2 Dq e C2 Bs. Seus modelos indicaram uma produção de CO₂ crescente, o que é incoerente com a realidade, já que seria necessária matéria orgânica infinita nos respirômetros. Assim, o ajuste inadequado deu-se em razão dos pontos não indicarem uma tendência à diminuição da produção de CO₂, após os 181 dias de monitoramento. Portanto, nesses casos o modelo não descreveu com precisão a cinética de biodegradação.

Por outro lado, houve sistemas em que o modelo apresentou valores altos de correlação ao ajuste dos dados (R² > 0,700). Nestes casos foi feita a determinação

do tempo estimado para o término da biodegradação (BRminT), ou seja, o final do processo de biodegradação de cada ensaio previsto pelo modelo ajustado aos dados de respirometria. Neste sentido, na Tabela 11 estão demonstrados os valores de R^2 e do tempo estimado para o término da biodegradação (BRminT).

De maneira geral, os sistemas C1, C1 Bs, C1 Dq e C1 SqC apresentaram ajuste semelhantes ao modelo proposto para a produção semanal de CO_2 (Figura 20). Pela baixa concentração de OLU, as taxas de biodegradação foram pequenas, apresentando R^2 e BRminT de, no máximo, 0,6021 e 254 dias, respectivamente. Já com o inóculo, o sistema C1-Ps apresentou produções de CO_2 mais altas no início, que determinou um R^2 igual a 0,9382.

Em relação aos ensaios C2, apresentando ou não surfactante e Ps, os índices de correlação dos ajustes aplicados aos dados foram maiores que 0,700. Apesar de todos estes sistemas demonstrarem uma maior taxa de biodegradação nos primeiros dias, na Figura 20 pode ser observado um claro padrão de crescimento e declínio na produção de CO_2 apresentado por C2 SqC.

Os dados de produção acumulada de CO_2 foram ajustados de acordo com o modelo de Schimdt et al. (1985) e adaptado por Montagnoli et al. (2009). Foi visto nos perfis de biodegradação (Figura 19), a ocorrência de um padrão de distribuição próximo ao linear ou exponencial. Desta forma, foi possível desenvolver modelos matemáticos que se ajustaram aos dados.

Na Figura 21 estão representados todos estes ajustes, em que foi observada uma tendência à desaceleração da produção acumulada de CO_2 , após 100 dias, exceto para os ensaios C2 Bs, C2 Dq e C2 SqC, todos estes com comportamento de crescimento. Por esse motivo foi dada preferência a um modelo logístico não linear, pois um modelo linear não se adaptaria com precisão a todos os casos observados. Com esta estratégia, foi possível obter valores de R^2 acima de 0,982 em todos os ajustes e, consequentemente, estabelecer o valor máximo de biodegradação previsto (Bmax).

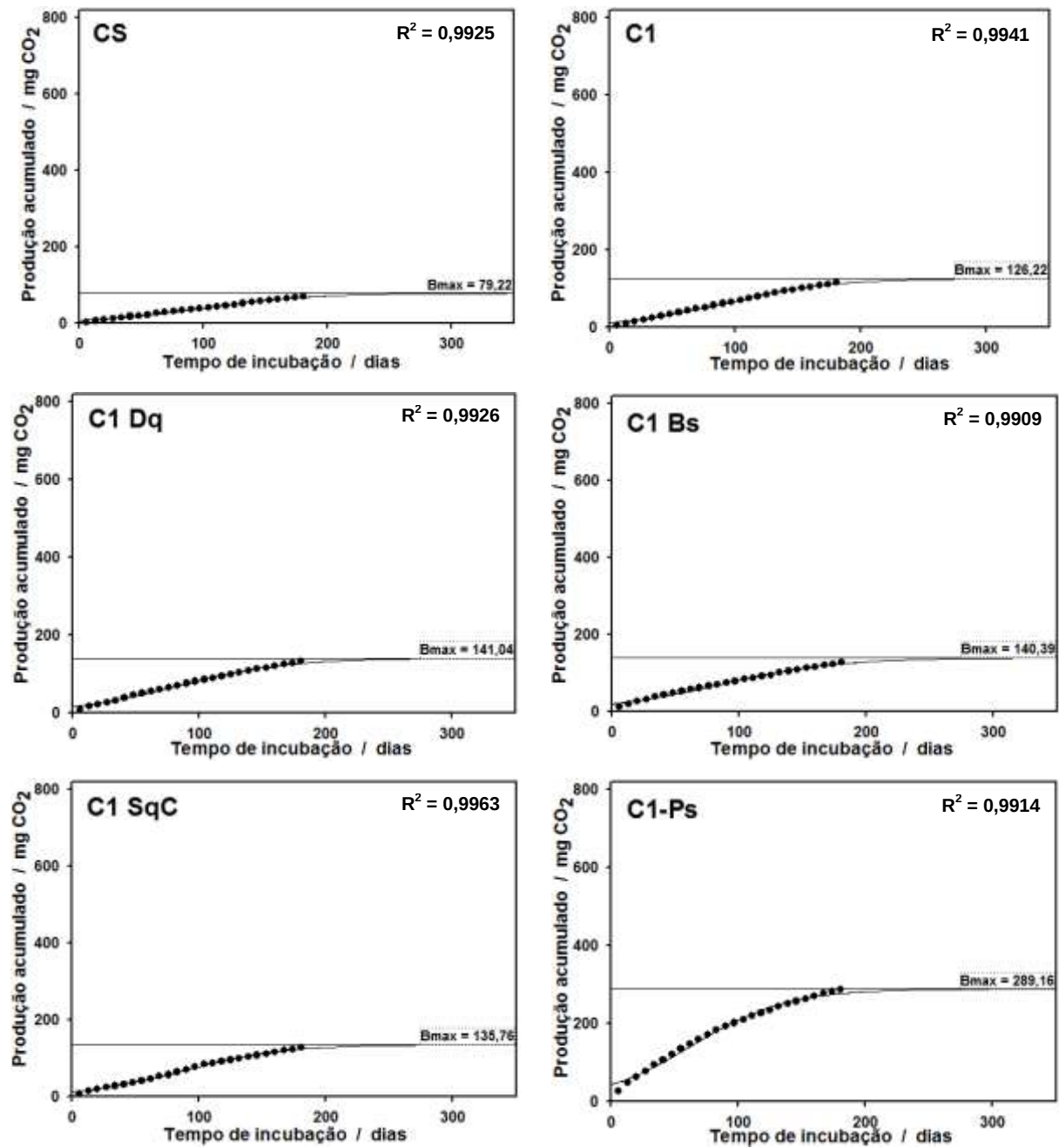


Figura 21 - Produção de CO₂ acumulada pelo tempo de incubação de cada sistema respirométrico ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) e Montagnoli et al. (2009).

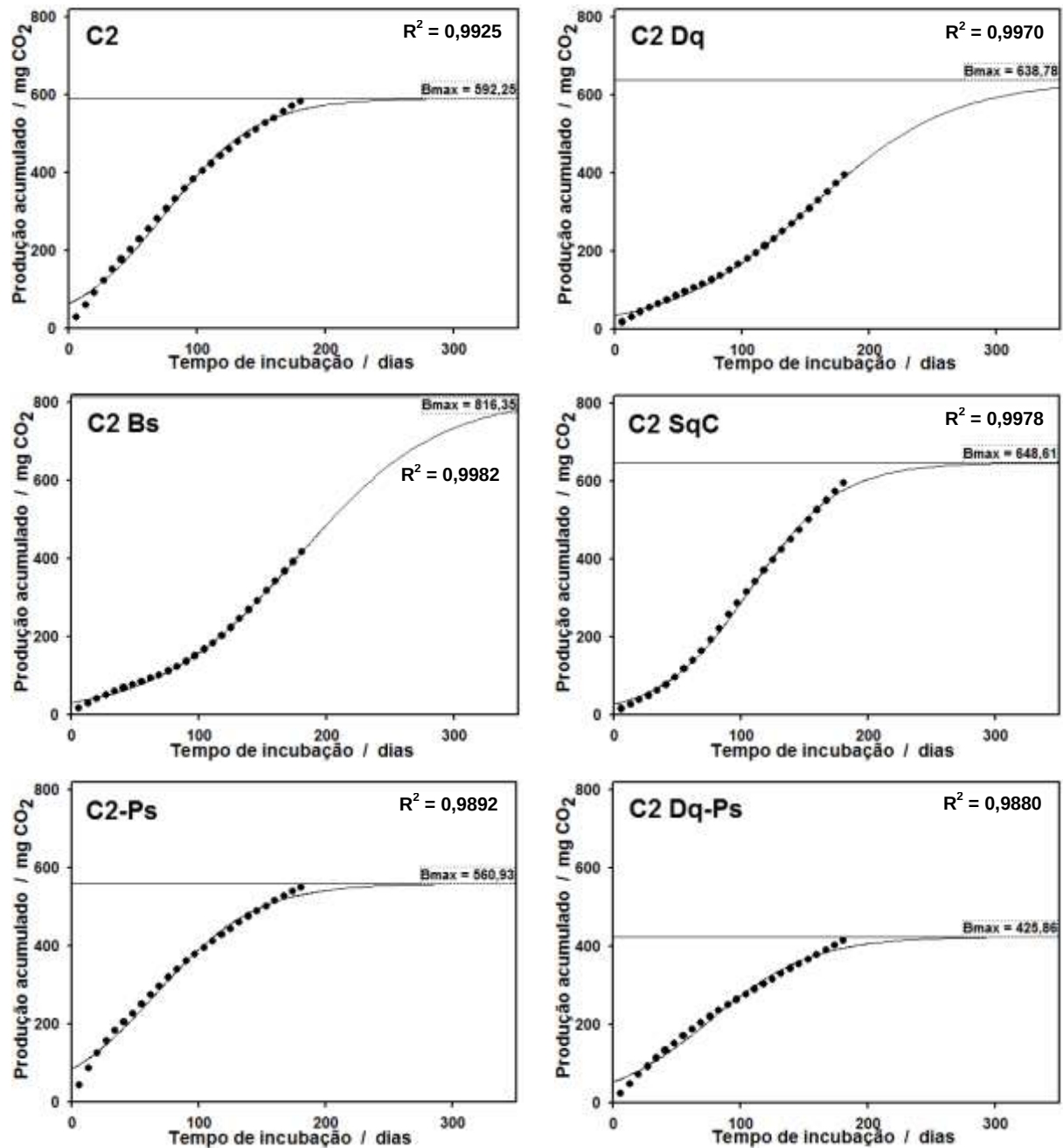


Figura 21 - Produção de CO₂ acumulada pelo tempo de incubação de cada sistema respirométrico ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) e Montagnoli et al. (2009).

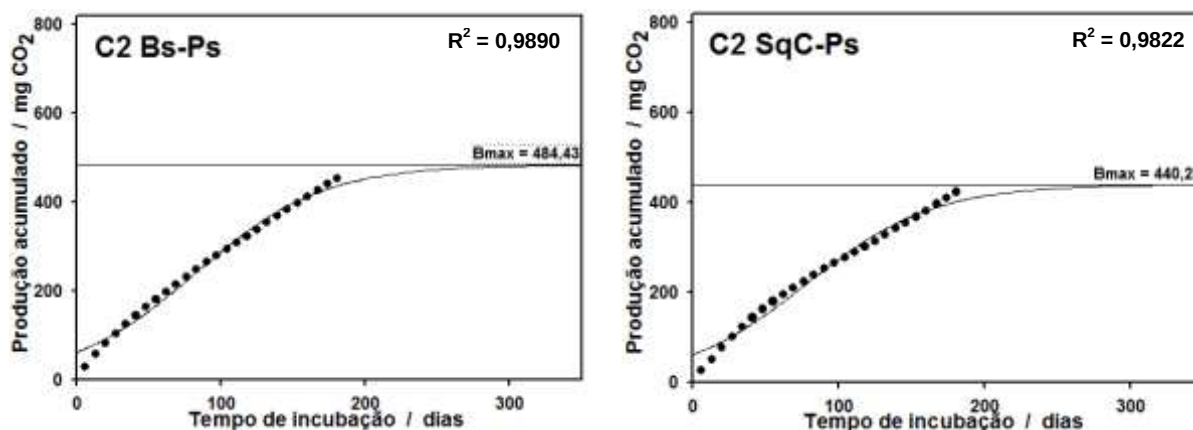


Figura 21 - Produção de CO₂ acumulada pelo tempo de incubação de cada sistema respirométrico ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) e Montagnolli et al. (2009).

Com o ajuste dos dados demonstrado na Figura 21, foram gerados dois parâmetros importantes pela análise: valor máximo de biodegradação previsto (Bmax) e tempo estimado para o valor máximo de biodegradação previsto (BmaxT). A partir disso, foi possível prever o máximo possível de CO₂ que seria produzido e o tempo final de biodegradação de cada biotratamento realizado (Tabela 11).

O valor de Bmax é estabelecido quando a curva gerada pelo modelo se estabiliza e não ocorre mais aumento significativo no parâmetro B, definido na equação como produção acumulada de CO₂, ao longo do tempo. Foi considerado como aumento significativo valores de $B < 0,99 \times B_{\max}$. Na Figura 21 está representado o ajuste dos dados, onde a linha Bmax indica o valor máximo que a curva ajustada alcançará. O tempo de término de biodegradação foi considerado, então, como o tempo de produção de CO₂ igual a $B = 0,99 \times B_{\max}$ (MONTAGNOLLI et al., 2009).

Comparando-se os valores de Bmax (Tabela 11), tem-se uma maior produção de CO₂ total esperada para os sistemas C2, com maior volume de OLU. Já a respiração basal do solo, obtida no ensaio CS, apresentou um valor máximo de biodegradação previsto igual a 72,22 mg de CO₂.

Ao analisar o tempo que se leva para que o valor de Bmax seja alcançado (BmaxT), nota-se que, nos sistemas C2 contendo surfactantes (C2 SqC, C2-Ps, C2 Dq-Ps, C2 Bs-Ps e C2 SqC-Ps), o processo de biodegradação foi realizado em um tempo mais curto, permitindo concluir que estas substâncias promoveram um ganho de eficiência para o tratamento. Com isso foi possível uma biodegradação em

menor tempo, conforme reportado também nos estudos de Jain et al. (1992), Kosaric (2001). Christofi e Ivshina (2002), Calvo et al. (2009), Whang et al., 2008 e Montagnolli (2011).

Tabela 11 - BRminT, Bmax, BmaxT e R² dos modelos matemáticos ajustados às produções semanal e acumulada de CO₂ – respirometria

Sistema	Semanal (MEMBRÉ et al., 1996)		Acumulado (SCHIMDT et al., 1985)		
	BRminT	R²	Bmax	BmaxT	R²
	<i>dias</i>		<i>mg CO₂</i>	<i>dias</i>	
CS	*	*	79,216	302	0,9925
C1	198	0,3481	126,219	283	0,9941
C1 Dq	254	0,6021	141,0368	277	0,9926
C1 Bs	192	0,5351	140,3919	301	0,9909
C1 SqC	224	0,1951	135,7563	268	0,9963
C1-Ps	247	0,8807	289,1593	234	0,9914
C2	352	0,9382	592,2487	240	0,9925
C2 Dq	**	**	638,78	409	0,997
C2 Bs	**	**	816,35	432	0,9982
C2 SqC	454	0,8606	648,614	267	0,9978
C2-Ps	336	0,8933	560,9314	247	0,9892
C2 Dq-Ps	440	0,9412	425,863	259	0,988
C2-Bs-Ps	511	0,7808	484,4281	283	0,989
C2-SqC-Ps	445	0,7319	440,2291	277	0,9822
*Não ocorreu ajuste aos dados deste sistema					
**Não houve ajuste para estes sistemas					

No entanto, os sistemas C2 Dq e C2 Bs, que apresentaram comportamentos de biodegradação diferentes (Figuras 20 e 21) e não se ajustaram ao modelo de produção semanal (Tabela 11), seguirão com atividade por mais de um ano (409 e 432 dias, respectivamente). Neste contexto, Norman et al. (2002) relataram que a adição de surfactantes pode promover a formação de substratos antes indisponíveis pela emulsificação e solubilização da fase oleosa, aumentando assim o tempo total de biodegradação. Com análise ecotoxicológica é possível explicar esses perfis de

biodegradação e seus altos valores de BmaxT, ao confirmar o efeito tóxico nestas amostras de solo.

4.3.1.1.1. Comparação entre os modelos matemáticos

A validação dos modelos pode ser feita quando ambos os ajustes atinjam resultados coerentes e semelhantes em um dos parâmetros estimados (HILLS; TRUCANO, 1999). Sendo assim, o parâmetro do tempo final do processo de biodegradação foi analisado nos dois modelos propostos. Para isso foi feita a comparação entre BRminT do modelo ajustado à produção semanal de CO₂ (MEMBRÉ et al., 1996) e BmaxT daquele com os dados de produção acumulada (SCHIMDT et al., 1985), conforme demonstrado na Figura 22.

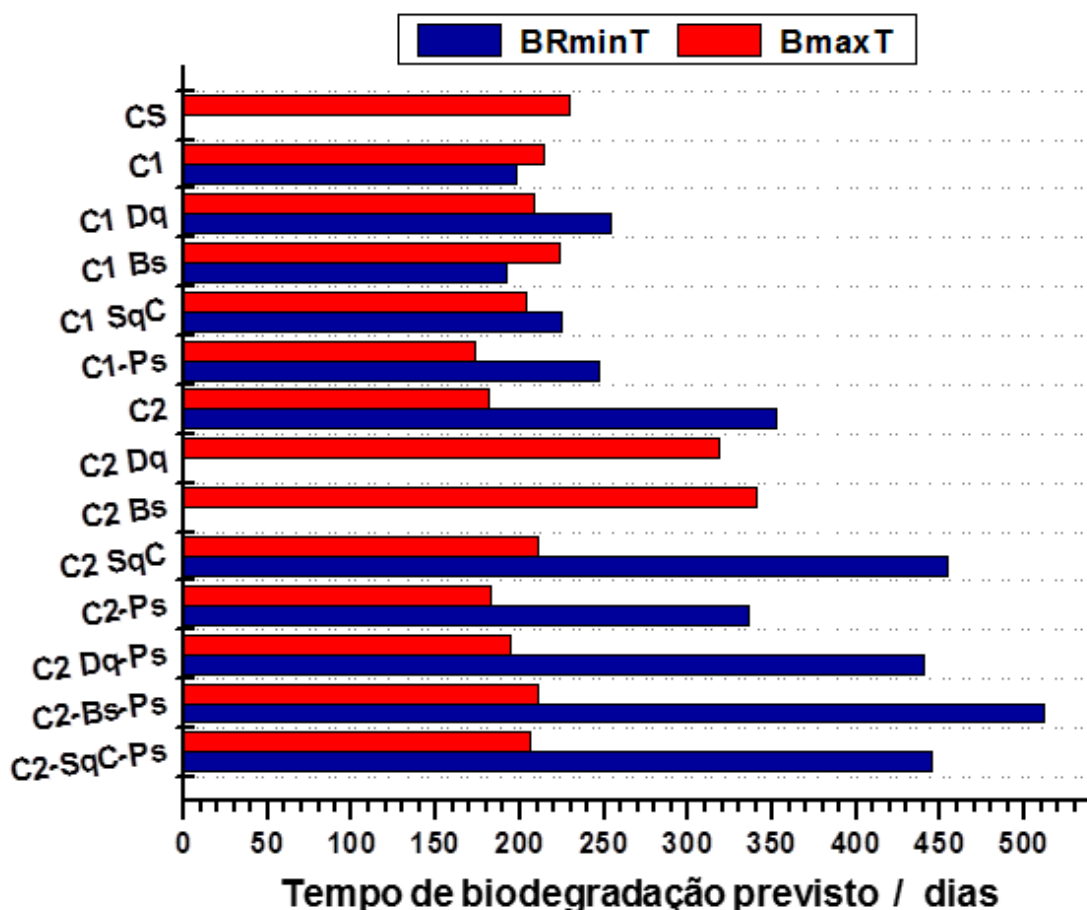


Figura 22 - Comparação entre os valores de tempo final de biodegradação previsto pelos dois modelos para os dados de produção de CO₂. BRminT – semanal (MEMBRÉ et al., 1996); BmaxT – acumulada (SCHIMDT et al., 1985).

Observou-se que não foi possível estabelecer comparação com os modelos correspondentes aos sistemas CS, C2 Dq e C2 Bs, pois o ajuste do modelo de Membré et al. (1996) a esses dados não ocorreu ou foi inadequado.

Na Figura 22, é possível observar que as semelhanças entre os dois ajustes resumem-se apenas para os ensaios com menor volume de OLU (C1, C1 Dq, C1 Bs, C1 SqC e C1-Ps). O ajuste obtido foi coerente entre os dois modelos propostos, o suficiente para prever o comportamento destes processos de biodegradação em sistemas de respirometria de Bartha, sob as condições do estudo.

No caso das amostras de solo com maior concentração de OLU (C2, C2 SqC, C2-Ps, C2 Dq-Ps, C2 Bs-Ps e C2 SqC-Ps), os dois modelos propostos diferiram. Porém, não permitiu estabelecer relações entre eles a partir do tempo estimado para o término da biodegradação (Figura 22). Assim, novas abordagens estatísticas podem ser utilizadas a fim de comparar os resultados obtidos nestes tratamentos. Ainda, o monitoramento da biodegradação por um maior período de tempo, possivelmente, favorecerem a relação entre estes dois ajustes. A continuação da leitura de produção de CO₂ nos respirômetros após 181 dias trará maior suporte de dados na análise de modelagem, o que permitirá maior precisão em determinar o tempo final de biodegradação de maneira coincidente entre os dois modelos.

4.3.2. Colorimetria

O método colorimétrico utilizando o indicador redox DCPIP possibilitou estimar a biodegradação pela leitura de absorbância em 600 nm, em função do tempo. A diminuição na concentração de DCPIP em seu estado oxidado (DCPIP_{ox}) está registrada na Figura 23. Na Tabela 12, estão apresentadas as porcentagens de descoloração calculadas em relação ao controle do meio.

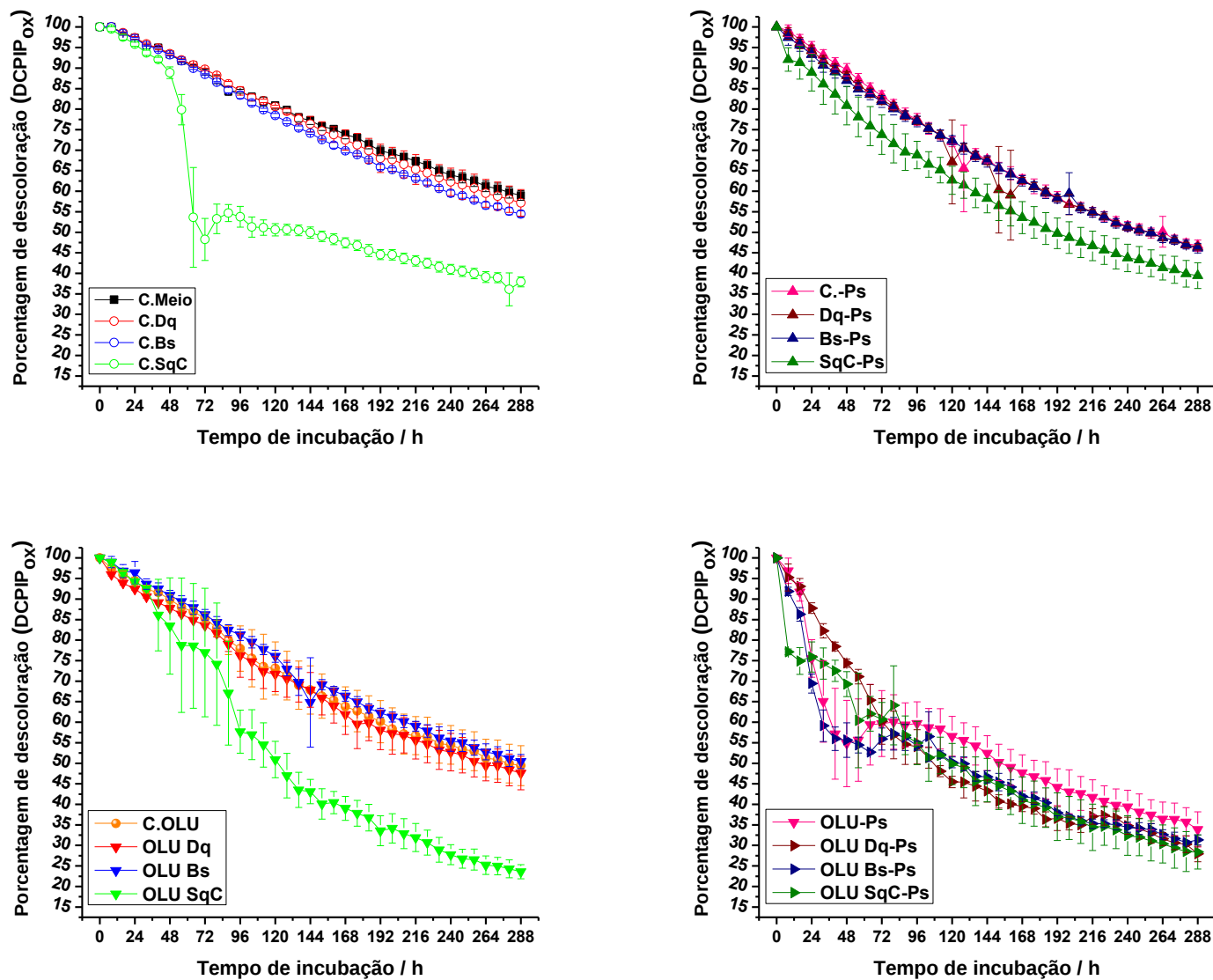


Figura 23 - Redução na concentração do indicador DCPIP_{ox} em função do tempo..

Tabela 12 - Porcentagem de descoloração pela concentração de DCPIP_{ox}

Ensaio	Porcentagem de descoloração	Ensaio	Porcentagem de descoloração
C. Dq	6,42%	OLU Dq	21,30%
C. Bs	11,32%	OLU Bs	20,38%
C. SqC	39,17%	OLU SqC	62,30%
C. -Ps	22,55%	OLU-Ps	47,90%
Dq-Ps	23,84%	OLU Dq-Ps	54,93%
Bs-Ps	24,80%	OLU Bs-Ps	49,78%
SqC-Ps	35,80%	OLU SqC-Ps	52,82%
C. OLU	19,19%		

De acordo com os resultados de colorimetria expressos na Tabela 12 e na Figura 23, foi possível observar os diferentes comportamentos de atividade microbiana nos ensaios realizados. Dentre as menores taxas encontram-se os ensaios de controle do detergente (C.Dq) e do ramnolipídio (C.Bs), concluindo que ambos não foram assimilados pelos micro-organismos visto que a redução na concentração de DCPIP_{ox} foi de apenas 6,42% e 11,32%, respectivamente. Em contrapartida, o Tween80 apresentou aceitação imediata do metabolismo microbiano, pois o ensaio C.SqC, contendo somente o surfactante químico como fonte de carbono, foi capaz de diminuir em até 39,17% a concentração do indicador em 288 h.

As maiores porcentagens de descoloração foram encontradas nos tubos contendo OLU, os surfactantes (Bs, Dq e SqC) e o inóculo de *P. aeruginosa* LBI (Ps). No entanto, a maior queda na concentração do indicador referiu-se ao ensaio OLU SqC. Neste caso, destaca-se o alto metabolismo microbiano pela degradação do próprio surfactante químico, que revelou ser uma fonte de carbono facilmente assimilável pelos micro-organismos, conforme discutido anteriormente.

Em se tratando dos tubos ausentes de surfactantes, o ensaio C.OLU apresentou baixa atividade (19,19%). Com a adição de Dq e Bs, houve um pequeno aumento no metabolismo microbiano de 1,19% (OLU Bs) e 2,11% (OLU Dq) em comparação com C.OLU. Mais uma vez, OLU SqC obteve maior valor na biodegradação com um aumento de 43,11% em relação a C.OLU.

A bioaugmentação do processo, utilizando o inóculo bacteriano, proporcionou uma maior diminuição da concentração de DCPIP_{ox} , na maioria dos casos, em razão do aumento de atividade microbiana nos ensaios. Estabelecendo comparações entre o tubo contendo óleo usado com ou sem surfactante e o tubo com OLU e Ps, tem-se que:

- C.OLU-Ps = aumentou o metabolismo em 28,71% em relação a C.OLU;
- OLU Bs-Ps = aumentou o metabolismo em 29,40% em relação a OLU Bs;
- OLU Dq-Ps = aumentou o metabolismo em 33,63% em relação a OLU Dq;
- OLU SqC-Ps = diminuiu o metabolismo em 9,48% em relação a OLU SqC.

Assim, foi possível concluir que o inóculo foi benéfico para os ensaios com Bs Dq, que demonstraram melhora semelhante em seus processos. Entretanto, o ensaio com o Tween80, novamente, não seguiu o mesmo padrão e a sua atividade diminuiu pela inoculação das bactérias.

4.3.3. Discussão dos resultados e conclusão

Foi demonstrado pelos métodos respirométrico (Figuras 18 e 19) e colorimétrico (Figura 23) que a respiração e o metabolismo da comunidade microbiana, utilizados como indicadores de atividade biológica, são importantes ferramentas na avaliação da biodegradação de OLU.

Ensaio com respirometria e DCPIP têm sido aplicados no estudo de degradação de hidrocarbonetos de petróleo por micro-organismos por se tratar de métodos precisos, simples e sensíveis (BALBA et al., 1998; SIVIERO, 1999; VAN HAMME et al., 2000; KUBOTA et al., 2008; LOPES; BIDOIA, 2009; MONTAGNOLLI et al., 2009; LOPES et al., 2010; BIDOIA et al., 2010; TAMADA et al., 2012a) e, portanto, tornam-se importantes na avaliação da eficiência das estratégias de tratamento. Deste modo, uma análise prévia da biodegradação, em escala laboratorial, utiliza diversos parâmetros que possam interferir na eficácia do tratamento e permite otimizar o processo em relação a menores custos e tempos (LORS et al., 2012; SZULC et al., 2014).

As características físico-químicas em que se encontram os hidrocarbonetos são um fator decisivo na cinética de biodegradação, pois os micro-organismos agem, principalmente, na interface óleo-água, em ambientes aquáticos, e óleo-matriz do solo, para ecossistemas terrestres (AMUND; ADEBIYI, 1991). Em se

tratando do OLU, foi demonstrado que sua estrutura química sofre alterações quando o produto é utilizado. As altas temperaturas e a alta pressão do motor quebram as longas cadeias carbônicas presentes nesse óleo, o que facilita a ação microbiana na degradação destas moléculas (EISENTRAEGER et al.; 2002; LOPES; BIDOIA, 2009; LOPES et al., 2010; TAMADA et al., 2012a).

Pelos resultados de biodegradação obtidos, concluiu-se que o inóculo de solo utilizado (amostra C1) proporcionou a seleção de micro-organismos capazes de biodegradar o OLU. Deste modo, sabe-se que, dentre as condições do processo de biodegradação que influenciam no seu desempenho, está a presença de micro-organismos específicos capazes de utilizar o poluente como fonte de carbono (PRINCE, 1993; KARHU et al., 2009; ROSOLEN et al., 2005; ANTIC et al., 2006).

As bactérias são os agentes mais ativos na biodegradação de petróleo e atuam como principais degradadores em casos de derramamentos de petróleo (RAHMAN et al., 2002; ROB et al., 2009). Assim, o sucesso de inocular micro-organismos em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo deve-se à capacidade destes micro-organismos em assimilar o composto em seu metabolismo mais fácil e/ou mais rapidamente que outros grupos. Deste modo, os ensaios realizados evidenciaram que, ao adicionar o inóculo de *P. aeruginosa* LBI, os biotratamentos melhoraram sua eficiência na biodegradação do OLU. Portanto, os resultados confirmaram a afirmação de que a bioaugmentação representa uma alternativa de grande valor no aperfeiçoamento do processo de biorremediação (RUBERTO et al., 2003; BENTO et al., 2005; TACCARI et al., 2012; SZULC et al., 2014).

No entanto, em função do OLU ser um substrato hidrofóbico, esta característica lhe confere limitação ao metabolismo microbiano pelas suas interações com a matriz de solo. Tal limitação geralmente reflete na inibição da degradação (HARMS; BOSMA, 1997). Desse modo, foram aplicados diferentes tipos de surfactantes, a fim de promover a solubilização deste composto hidrofóbico (JAIN et al., 1992; WHANG et al., 2008). Em sua maioria, houve aumento na taxa de biodegradação do óleo pela aplicação dos tensoativos. Para o ramnolipídio produzido (Bs) e o Tween80 (SqC), o aumento na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo foi devido à melhor interação óleo-surfactante-micro-organismo que facilitou e estimulou a microbiota do solo em degradar o composto poluente (JAIN et al., 1992; WHANG et al., 2008). O aumento da biodisponibilidade

causado pelos surfactantes também foi encontrada em outros estudos (WEST; HARWELL, 1992; PROVIDENTI et al., 1995; VOLKERING et al., 1998; CALVO et al., 2002; RON; ROSENBERG, 2002; MCKEW et al., 2007).

Uma biodegradação efetiva depende da ação simultânea de micro-organismos metabolicamente versáteis e condições ambientais favoráveis ao processo (VENKATESWARAN; HARAYAMA, 1995). Todavia, nem toda alternativa de compostos tensoativos pode ser considerada viável na descontaminação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. A menor taxa de biodegradação encontrada para os ensaios com Dq revelou seu efeito prejudicial na biodegradação do OLU, provavelmente, devido à toxicidade do meio. Edwards et al. (2003), avaliando o efeito tóxico de 3 biossurfactantes e 3 surfactantes químicos, demonstraram que aqueles de origem sintética apresentaram maior toxicidade frente aos organismos-teste analisados. Neste sentido, foi observado que a toxicidade de um surfactante, provavelmente, altera a composição das populações microbianas responsáveis por realizar a degradação do hidrocarboneto (CHEN et al., 2000; COLORES et al., 2000).

Por outro lado, a biodegradação de hidrocarbonetos pode ser melhorada pela adição ou pela produção *in situ* de biossurfactantes (CALVO et al., 2009), visto que a biodisponibilidade de substâncias é determinada pela taxa de transferência de seus metabólitos para as células dos micro-organismos (JOHNSEN et al., 2005). Os resultados utilizando Bs, junto ao solo contaminado com OLU, apresentaram uma alternativa viável no aumento da biodegradabilidade deste hidrocarboneto. Além disso, a inoculação de Ps favoreceu ainda mais a atividade microbiana no processo. O gênero *Pseudomonas* é capaz não só de degradar o OLU, como também de produzir ramnolipídios *in situ*, para aumentar a biodisponibilidade do poluente (NITSCHKE et al., 2005b).

Bactérias produtoras de biossurfactantes, como *Pseudomonas*, podem também participar ativamente na maior atividade de um consórcio microbiano no solo, pois são capazes de emulsificar os hidrocarbonetos, para que outros micro-organismos realizem sua degradação (RON, RONSENBERG, 2002). Geralmente, o tempo de tratamento e o período de adaptação dos micro-organismos à contaminação são mais curtos com o uso desses biotensoativos (KOSARIC, 2001). Ainda, Norman et al. (2002) demonstraram que os ramnolipídios estimularam diferentes processo envolvidos na degradação de compostos orgânicos.

Em relação ao surfactante químico sintético, foi observado que muitas vezes os ensaios contendo SqC apresentaram altos valores de atividade microbiana do solo. Contudo, o método colorimétrico revelou também que esta molécula pode ser facilmente assimilável como fonte de carbono pela microbiota, o que demonstra que cada tipo de surfactante inferiu um efeito diferente no processo de biodegradação do OLU. Assim, foi demonstrado que o modo de ação dos surfactantes químicos e biossurfactantes podem variar. Mohanty e Mukherji (2013) demonstraram os modos distintos de atuação do Triton X-100 (surfactante químico) e do JBR-515 (biossurfactante ramnolipídio) na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. Enquanto o Triton X-100 aumentou a biodisponibilidade através da emulsificação e facilitou a assimilação direta na interface pelos micro-organismos, o JBR-515 tornou os compostos biodisponíveis por solubilização micelar.

Por fim, concluiu-se que:

- a respiração e o metabolismo microbianos foram importantes indicadores da atividade dos micro-organismos na biodegradação;
- a amostra de solo C1 obteve sucesso da seleção da microbiota capaz de degradar o OLU;
- os surfactantes utilizados promoveram a bioassubilização do OLU, permitindo maior taxa de biodegradação;
- a inoculação de *P. aeruginosa* LBI nos tratamentos possibilitou maior atividade microbiana, em função do processo de bioaumentação;
- o Tween80 (SqC), quando adicionado nas amostras, demonstrou-se como uma fonte de carbono facilmente assimilável pelos micro-organismos do solo; e
- o detergente químico (Dq) provavelmente conferiu toxicidade ao meio, já que foram observadas menores taxas de biodegradação, quando ele foi adicionado.

5. CAPÍTULO 3

Efeitos dos processos de biorremediação de solos contaminados com óleo lubrificante na composição físico-química e na ecotoxicidade dessas amostras



5.1. Introdução

Foi demonstrado que o OLU apresenta-se mais tóxico em relação aos óleos novos mesmo após o tratamento com micro-organismos, apesar de possuir maior taxa de biodegradação (LOPES et al., 2010; TAMADA et al., 2012a). Sua toxicidade quando disposto no ambiente gera grande preocupação, uma vez que os óleos usados podem ter uma vasta gama de composições. Além disso, a concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) aumenta após a utilização do lubrificante em motores automobilísticos (HENRY, 1998).

Devido a sua baixa biodegradabilidade, os hidrocarbonetos residuais e os HPA que se apresentam no solo contaminado representam misturas complexas de compostos com alto peso molecular e uma proporção substancial de uma mistura complexa não-decomposta (UCM). Devido a isso, pesquisas recentes têm como objetivo minimizar a presença de tais compostos e compreender melhor os seus efeitos ecotoxicológicos do solo. Desta forma, não só estudos de biodegradação precisam ser propostos, como também se devem conhecer as populações microbianas predominantes, a caracterização físico-química e a toxicidade do solo, após realizado o processo de biorremediação (LLADÓ et al., 2012).

O princípio dos testes ecotoxicológicos baseia-se na determinação do potencial de impacto de um poluente na biota presente em certo ambiente. Os dados obtidos podem ser utilizados na regulação do uso destes compostos químicos e no diagnóstico de tratamento, após a contaminação da área (HAGNER et al., 2010).

Portanto, testes ecotoxicológicos têm sido utilizados com relativo sucesso como uma ferramenta complementar para monitorar a eficiência na biorremediação do solo, tornando-se essencial para avaliar os riscos ecológicos em ambientes contaminados (WANG et al., 2010). No entanto, poucos trabalhos combinam a realização de ensaios ecotoxicológicos com um estudo detalhado das comunidades microbianas em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (LIU et al., 2010; SHEPPARD et al., 2011; LLADÓ et al., 2012).

Para garantir uma avaliação adequada do risco da contaminação e o monitoramento do processo de biorremediação, os testes de toxicidade, as análises químicas e moleculares e os estudos de ecologia microbiana das comunidades devem ser complementares entre si (AL-MUTAIRI et al., 2008; PLAZA et al., 2010).

Parâmetros físico-químicos e biológicos do solo afetam o desenvolvimento e/ou a sobrevivência de um organismo-teste e, portanto, testes de toxicidade são extremamente úteis para fornecer uma avaliação geral do progresso da biorremediação em solos contaminados (MARWOOD et al., 1998). Neste sentido, a germinação de sementes e o desenvolvimento das plântulas têm sido utilizados para avaliar o impacto de tratamentos realizados, quanto à recuperação de áreas contaminadas por petróleo e derivados (AMAKIRI; ONOFEGHARA, 1984).

Neste contexto, este capítulo complementa os ensaios de biodegradação, demonstrando o efeito de cada tratamento nas composições físico-química e microbiológica das amostras de solo, além de estabelecer o efeito tóxico deste solo antes e após o processo de biorremediação.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Material

5.2.1.1. Meios de cultura

5.2.1.1.1. Plate Count Agar (PCA)

O meio PCA foi utilizado para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias. Para o preparo foi pesado 23,50 g de *Plate Count Agar* e dissolvido em 1,0 L de água destilada.

5.2.1.1.2. Sabouraud

O meio Sabouraud foi utilizado para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos totais. Para o preparo, foi pesado 65,00 g de *Difco® Sabouraud Dextrose Agar* e dissolvido em 1,0 L de água destilada, juntamente com 0,400 g de cloranfenicol levogiro. O cloranfenicol foi utilizado no meio de cultura com função antibacteriana para contagem de UFC referente a fungos totais.

5.2.1.2. Soluções

5.2.1.2.1. Solução salina 0,85%

A solução salina foi preparada na concentração de 0,85% (m/v), dissolvendo 0,85 g de cloreto de sódio (NaCl) em 100 mL de água destilada.

5.2.1.2.2. Sulfato de zinco 0,05 M

Foram dissolvidos 3,60 g de sulfato de zinco (ZnSO_4) em 250 mL de água destilada. A solução foi homogeneizada em balão volumétrico e, posteriormente, armazenada em frasco de vidro.

5.2.1.3. 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 1,00 mm para retirada de sólidos grosseiros e obtenção de material homogêneo a ser utilizado em todos os procedimentos experimentais.

5.2.2. Métodos

5.2.2.1. Solo

Após ser peneirado, o solo foi utilizado para elaborar diferentes amostras em função do contaminante (OLU) e das condições de tratamento (soluções, tempo, etc.).

5.2.2.1.1. Amostras de solo – tempo zero

Inicialmente, foram avaliadas as amostras de solo no tempo zero, ou seja, anterior ao tratamento biológico. Três amostras de solo foram submetidas a estas análises: Solo “Controle”, C1 – Contaminação 1 e C2 – Contaminação 2.

No tempo zero, foram realizadas três análises distintas: (1) determinação das concentrações de macronutrientes, micronutrientes, metais pesados e outros elementos mais análises complementares; (2) avaliação da toxicidade, a partir da germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de duas espécies (*Lactuca sativa* e *Eruca sativa*); e (3) contagem de unidades formadoras de colônias para bactérias e fungos totais. Além disso, foi determinada a composição granulométrica do solo utilizado em todo o procedimento experimental (Solo “Controle”).

5.2.2.1.2. Amostras de solo – tempo final (180 dias)

Foram preparadas 10 amostras de solo com variações nas condições de tratamento biológico a que foram submetidas (Tabela 13). Estas amostras foram dispostas em sacos plásticos e foram enterrados no Jardim Experimental do Instituto de Biociências - UNESP, campus Rio Claro, seguindo o procedimento adotado para C1 e descrito no Capítulo 2.

Transcorrido o período de 180 dias, foram realizadas análises físico-químicas, microbiológicas e de ecotoxicidade. Pelos resultados obtidos foi possível estabelecer comparações entre as condições dos tratamentos biológicos adotados para os parâmetros analisados.

Tabela 13 - Amostras de solo para realização de análises no tempo final (180 dias)

Amostras de solo (tempo final)		Composição
1	Controle	Solo
2	C1	Contaminação 1 (C1)
3	C2	Contaminação 2 (C2)
4	C2 Dq	C2 e detergente químico
5	C2 Bs	C2 e biossurfactante
6	C2 SqC	C2 e surfactante químico comercial
7	C2-Ps	C2 e inóculo de <i>P. aeruginosa</i> LBI
8	C2 Dq-Ps	C2, Dq e Ps
9	C2 Bs-Ps	C2, Bs e Ps
10	C2 SqC-Ps	C2, SqC e Ps

5.2.2.2. Inóculo lixiviado para contagem microbiana

Na contagem de UFC, os inóculos lixiviados foram preparados a partir das amostras de solo (3 no tempo zero e 10 no tempo final). Este procedimento utilizou material, vidrarias e soluções previamente esterilizados em autoclave por 15 min a 121 °C. Assim, 10 g da amostra de solo foram transferidos a um frasco Erlenmeyer de 250 mL juntamente com 90 mL de solução salina 0,85% (estéril). O frasco foi mantida em agitação a 180 rpm por 60 min e, em seguida, o líquido foi filtrado com auxílio de funil e algodão estéril. O lixiviado obtido já com diluição de 10^{-1} foi extraído em frasco estéril.

5.2.2.3. Análises realizadas nas amostras de solo

Todas as análises descritas abaixo foram realizadas para as treze amostras de solo: 3 no tempo zero (solo “Controle”; C1 e C2) e 10 no tempo final (Tabela 13).

5.2.2.3.1. Análises físico-químicas

As amostras de solo foram analisadas pelo Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo (ICASA, Campinas-SP) para determinação da composição granulométrica e físico-química nas diferentes amostras (Tabela 14).

Tabela 14 - Análises realizadas nas amostras de solo

Macronutrientes	P	SB	Micronutrientes	Na	Metais pesados e outros elementos	As	Se	Análises complementares	pH
	K	Ca/Mg		Fe		Cd	Sb		H+Al
	Ca	Mg/K		Mn		Cr	S		V%
	Mg			Cu		Pb	Ba		CTC
	Al			Zn		Hg	Ag		C _{total}
	N _{total}			B		Ni	V		MO

5.2.2.3.2. Contagem de UFC

Os micro-organismos contabilizados foram divididos em dois grupos, cada um com seu meio específico de crescimento para bactérias ou fungos totais. Desta forma, foram preparados os inóculos lixiviados para cada amostra de solo. O plaqueamento foi realizado em duplicata, pelo método de *Pour Plate*, pela inoculação de 1,0 mL do inóculo lixiviado em placas de Petri e, posteriormente, sendo adicionado o meio de cultura.

Na Tabela 15 estão apresentados os meios de cultura, as diluições, as temperaturas e os tempos de incubação para cada uma das duas culturas microbianas submetidas a contagem.

Tabela 15 - Parâmetros de inoculação e incubação dos micro-organismos para contagem de UFC

Grupo microbiano	Inoculação		Incubação	
	<i>Meio de cultura</i>	<i>Diluições</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>
<i>Bactérias</i>	PCA	10 ⁻³ e 10 ⁻⁵	35 °C	48 h
<i>Fungos totais</i>	Sabouraud	10 ⁻² e 10 ⁻³	28 °C	168 h

Transcorrido o período de incubação, as unidades formadoras de colônias foram contabilizadas para cada amostra e cada grupo microbiano. Em seguida, foi obtido o valor de UFC já multiplicado pelo fator de diluição aplicado.

5.2.2.3.3. Bioensaios de toxicidade

A germinação é um fenômeno biológico da retomada do crescimento do embrião, com o subsequente rompimento do tegumento pela radícula. Do ponto de vista fisiológico, germinar é simplesmente quando o embrião sai do repouso fisiológico e entra em atividade metabólica (NASSIF et al., 1998), desde que satisfeitas as condições internas e ambientais necessárias para que o organismo possa se desenvolver. Qualquer alteração nesses parâmetros por substâncias tóxicas podem afetar o desenvolvimento do tecido vegetal (AYERS; WESTCOT, 1999).

A avaliação da toxicidade das amostras de solo foi realizada por meio de testes fitotoxicológicos por metodologias padronizadas. O método empregado baseou-se nas metodologias propostas por Morales et al. (2004), Tiquia et al. (1996), Dutka (1989) e Wang (1987). O efeito da contaminação do solo com OLU foi avaliado utilizando sementes de dois organismos-teste: *L. sativa* (alface) e *E. sativa* (rúcula), conforme apresentado na Figura 24.



Figura 24 - Espécies vegetais utilizadas como organismos-teste nos bioensaios de toxicidade (tempo zero).

Os bioensaios de toxicidade com as espécies vegetais foram avaliados pela germinação de sementes e desenvolvimento da raiz e do hipocótilo. As sementes foram adquiridas de um mesmo fornecedor (TopSeed® – Linha Azul), de mesmo lote e livre de defensivos químicos agrícolas.

5.2.2.3.3.1. Montagem dos ensaios

Para cada organismo-teste, foi realizado ensaios em triplicata com as treze amostras de solo, assim como analisado pela contagem de UFC (3 no tempo zero e 10 no tempo final). Também, foram realizados o controle positivo (CP) e o controle negativo (CN) com a amostra de solo controle sem adição de OLU. Os testes de toxicidade foram preparados em copos plásticos de 50 mL. Cada copo continha 25 g de solo, 1,0 mL de água destilada e 10 sementes do organismo-teste em análise.

Em seguida, os recipientes plásticos foram cobertos com filme de PVC a fim de não perder umidade e incubados a 20 ± 1 °C por 120 h ao abrigo da luz. No controle positivo (CP) foi adicionado 1,0 mL de sulfato de zinco 0,050 M, para testar a sensibilidade das sementes utilizadas.

5.2.2.3.3.2. Análise dos resultados

Na análise do desenvolvimento da plântula, o método consistiu inicialmente no congelamento das plântulas após 120 h de incubação. Este procedimento, além de interromper o crescimento das plântulas de modo uniforme, facilita as medições pela diminuição da rigidez dos tecidos vegetais, evitando possíveis quebras das plântulas durante a realização das medições. Para cada plântula foram tomadas medidas da raiz e hipocótilo.

Assim, foram determinados: a germinação das sementes, o alongamento da raiz e do hipocótilo ($\geq 0,1$ mm) e o índice de germinação (GI - *Germination Index*, fator de germinação de sementes e alongamento da raiz relativos ao ensaio controle negativo - CN). Pela contagem de sementes germinadas foi calculada a porcentagem de germinação relativa ao CN (%G), dada pela Equação 8 (LABOURIAU; AGUDO, 1987):

$$\%G = \left(\frac{SGa}{SGc} \right) \times 100 \quad (8)$$

em que,

SGa = número total de sementes germinadas na amostra analisada;

SGc = número total de sementes germinadas no CN.

Os resultados foram expressos pelo tamanho médio da raiz e do hipocótilo, para cada ensaio, pelo desenvolvimento relativo da raiz em relação ao CN (%R) e pelo índice de germinação (GI), conforme Equação 9.

$$\%R = \left(\frac{MRa}{MRC} \right) \times 100 \quad (9)$$

em que,

MRa = média do alongamento da raiz nas sementes germinadas na amostra analisada;

MRC = média do alongamento da raiz nas sementes germinadas no CN.

O conjunto de medidas da raiz e do hipocótilo permitiu a observação da influência da exposição à substância testada no crescimento do tecido vegetal, após 120 h, pela medição do comprimento:

O índice de germinação (GI), que combina as medidas de germinação de sementes relativa ao CN (%G) e alongamento da raiz relativo ao CN (%R), foi utilizado para avaliar a toxicidade das amostras de solo em alface e rúcula (Equação 10).

$$GI = \frac{(\%G) \times (\%R)}{100} \quad (10)$$

5.3. Resultados

5.3.1. Solo - Análises físico-químicas

5.3.1.1. Composição granulométrica

Todas as amostras de solo utilizadas no projeto partiram da mesma matriz para seu preparo. Este solo matriz foi analisado conforme sua granulometria e o resultado encontra-se na Tabela 16.

Tabela 16 - Composição granulométrica e classificação do solo

Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila	Classe	Subclasse
75,0%	14,0%	2,4%	8,6%	Limo Arenoso	Arenoso

5.3.1.2. Composição físico-química

As análises nas amostras de solo foram divididas em dois tempos: antes (tempo zero) e após o tratamento biológico (tempo final – 180 dias). Os resultados da composição físico-química das amostras de solo foram obtidos para macronutrientes, micronutrientes, metais pesados e outros elementos mais análises complementares, apresentados nas Tabelas 17 e 18, respectivamente.

Tabela 17 - Caracterização físico-química das amostras de solo – Macronutrientes e análises complementares

Amostras		Macronutrientes									Análises complementares					
		P	K	Ca	Mg	Al	N _{total}	SB	Ca/Mg	Mg/K	pH	H+Al	CTC	V%	C _{total}	MO
		mg.dm ³	mmolc.dm ³				%					mmolc.dm ³		%		g.dm ³
Tempo zero	C.S.	2,0	0,1	5,0	1,0	1,0	0,010	6,1	5,0	10,0	5,3	7,0	13,2	46,3	0,1	1,0
	C1	1,0	0,1	2,0	1,0	*ND	0,011	3,2	2,0	10,0	5,5	7,0	10,3	31,2	0,2	6,0
	C2	4,0	0,1	5,0	1,0	*ND	0,040	6,2	5,0	10,0	5,8	4,0	10,2	60,9	0,2	5,0
Tempo final	C.S.	7,0	0,1	3,6	0,8	1,5	0,010	5,2	4,0	10,0	6,6	7,0	12,3	42,4	0,1	1,7
	C1	5,0	0,1	3,7	0,6	*ND	0,013	5,1	4,0	10,0	6,0	9,0	14,2	36,3	0,2	3,4
	C2	3,0	0,1	4,2	0,5	*ND	0,011	5,2	4,0	10,0	6,1	9,0	14,3	36,6	0,2	3,4
	C2 Dq	2,0	0,1	5,1	0,5	*ND	0,010	6,2	5,0	10,0	5,9	10,0	16,3	38,1	0,2	3,4
	C2 Bs	4,0	0,1	4,4	0,4	*ND	0,017	5,2	4,0	10,0	5,8	11,0	16,3	32,0	0,2	3,4
	C2 SqC	2,0	0,1	4,7	0,6	*ND	0,010	6,2	5,0	10,0	5,7	10,0	16,3	38,3	0,3	5,2
	C2-Ps	2,0	0,1	4,7	0,5	*ND	0,014	6,2	5,0	10,0	5,7	10,0	16,3	38,1	0,3	5,2
	C2 Dq-Ps	3,0	0,1	4,1	0,5	*ND	0,021	5,2	4,0	10,0	5,7	9,0	14,3	36,4	0,3	5,2
	C2 Bs-Ps	2,0	0,1	4,5	0,4	*ND	0,013	5,2	4,0	10,0	5,7	10,0	15,3	34,1	0,3	3,4
	C2 SqC-Ps	2,0	0,1	3,8	0,4	*ND	0,014	5,1	4,0	10,0	5,8	10,0	15,2	33,9	0,3	3,4
											*ND = não detectado					

A partir dos dados de macronutrientes e das análises complementares (Tabela 17), foi observado que, após 180 dias de tratamento biológico, houve diminuição na concentração de fósforo nas amostras contaminadas com OLU, em relação ao tempo inicial (C2 - t0). Também, foi demonstrada uma queda evidente nos níveis de nitrogênio visto que, antes da biorremediação, havia 0,040% para nitrogênio total (C2 - t0) e, no tempo final, o maior valor encontrado foi 0,021% para C2 Dq-Ps.

Alguns macronutrientes tiveram um aumento de concentração, após realizado o processo de biodegradação (Tabela 18). A contaminação inicial (C2 - t0) apresentava 0,90 mg.kg⁻¹ de manganês e 26,60 mg.kg⁻¹ de zinco. Porém, foi observado que todas as amostras de solo com maior volume de OLU (ensaios C2) passaram a ter maior presença destes elementos. Em C2-Ps, os índices atingiram 5,91 mg.kg⁻¹ e 53,4 mg.kg⁻¹ para manganês e zinco, respectivamente.

Na Tabela 19 encontram-se os valores para os metais pesados e outros elementos. Houve praticamente a eliminação nos níveis de níquel, uma vez que, com os tratamentos propostos, sua concentração reduziu de 13,7 mg.kg⁻¹ para valores inferiores a 0,19 mg.kg⁻¹. Logo, houve possível redução da toxicidade nas amostras de solo, pois a presença de altas concentrações altas de níquel é capaz de interferir no desenvolvimento de plantas e diminuir a biomassa microbiana (BERTON et al., 2006).

Da mesma forma, a queda dos valores de chumbo identificou que o processo de biorremediação provavelmente refletiu numa melhor qualidade ecológica pela redução do efeito tóxico do OLU no solo (Tabela 18). Foi demonstrado que o chumbo é capaz de se acumular nas partículas do solo e representa, assim, um poluente em potencial. Este metal representa um efeito fitotóxico responsável por reduzir o crescimento das plantas, escurecer o sistema radicular, inibir a fotossíntese, entre outros prejuízos (SHARMA; DUBEY, 2005).

No entanto, o elemento de maior destaque na amostra contaminada com OLU no tempo zero foi o enxofre (Tabela 18). Na amostra C2 - t0, sua concentração era de 228,8 mg.kg⁻¹, porém após 180 dias de biorremediação, foi observada uma redução de 89,5% (C2-Ps), 90,4% (C2 Dq-Ps), 92,1% (C2 Dq), 93,0% (C2 Bs-Ps), 93,9% (C2 Bs e C2 SqC-Ps), 94,8% (C2) e 95,6% (C2 SqC). Analisando estes resultados, observa-se uma relação direta com a taxa de biodegradação determinada pelo método respirométrico (Tabela 10 e Figura 19), na qual a maior

queda na concentração de enxofre no solo foi obtida pela amostra com maior atividade microbiana – C2 SqC.

5.3.2. Contagem de UFC

O resultado da contagem de UFC está demonstrado na Tabela 19 e nas Figuras 25 e 26, de acordo com as treze amostras de solo analisadas.

Tabela 19 - Número de UFC por amostra de solo e grupo microbiano

Contagem UFC	<u>Grupo Microbiano</u>	Bactérias	Fungos Totais
	<u>Meio de cultura</u>	PCA	Sabouraud
	<u>Número de UFC.mL⁻¹</u>	x 10 ⁴	x 10 ³
Amostras de solo		Resultados	
Tempo zero	Controle Solo	23,00	< 1,00
	Contaminação 1	367,50	3,20
	Contaminação 2	2,00	3,55
Tempo final (180 dias)	C5	6,05	1,55
	C1	33,00	16,00
	C2	41,40	11,15
	C2 Dq	31,30	14,70
	C2 Bs	36,40	24,15
	C2 SqC	51,50	4,95
	C2-Ps	26,50	15,85
	C2 Dq-Ps	51,00	7,40
	C2 Bs-Ps	100,50	2,06
	C2 SqC-Ps	94,00	2,70

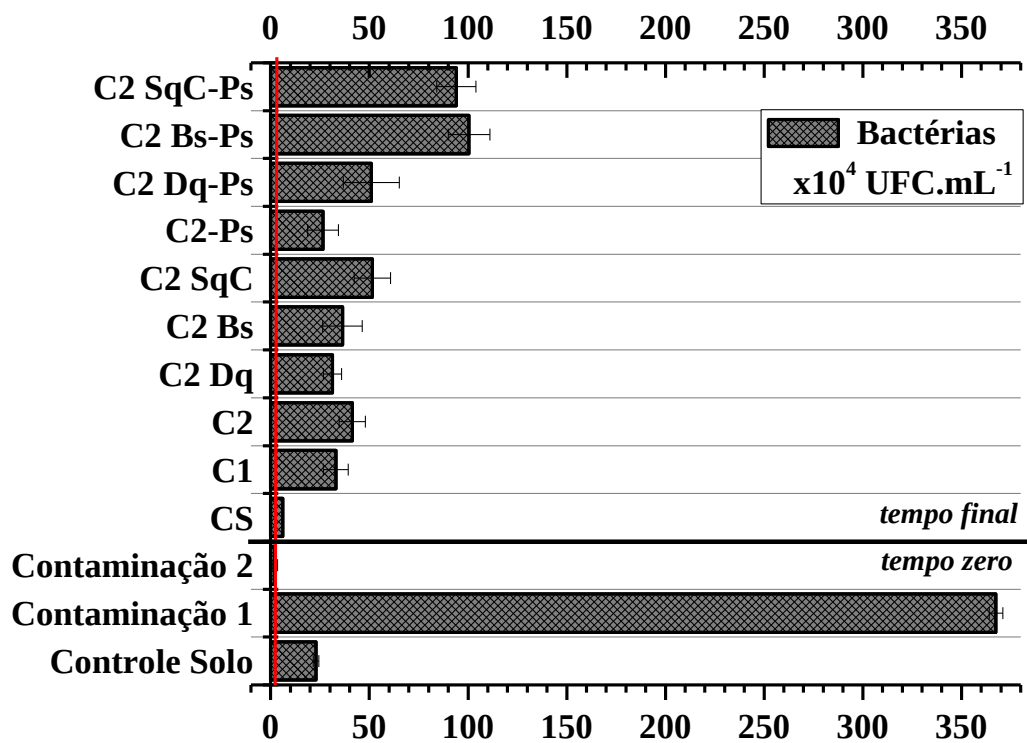


Figura 25 - Contagem de UFC de bactérias para as amostras de solo nos tempos zero e final de tratamento.

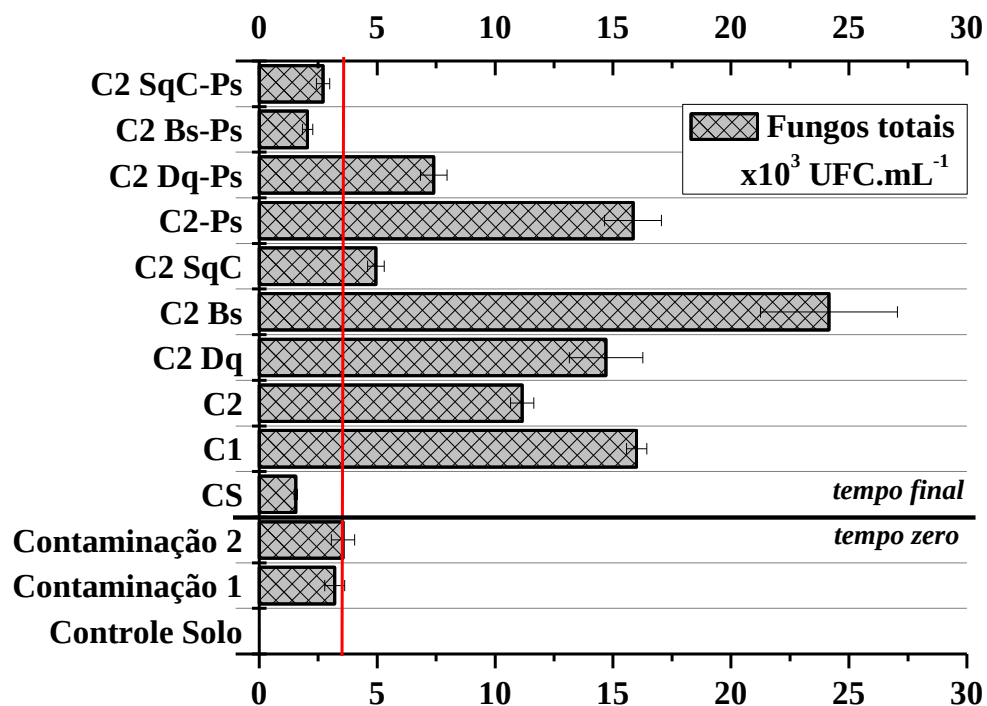


Figura 26 - Contagem de UFC de fungos totais para as amostras de solo nos tempos zero e final de tratamento.

Os resultados permitiram concluir que o grupo mais abundante nas amostras de solo foi o de bactérias (Tabela 19 e Figuras 25 e 26). A quantidade bacteriana foi, no mínimo, 6x maior que os fungos totais (C2 – t0), podendo chegar até a 1148x (C1 – t0). Em relação a ação dos micro-organismos na biodegradação de petróleo e derivados, foi demonstrado que as bactérias são os agentes mais ativos neste processo (RAHMAN et al., 2002; ROB et al., 2009).

Concluiu-se que o método de preparo do inóculo (LOPES; BIDOIA, 2009), denominado C1 – t0 (Tabela 19 e Figuras 25 e 26), obteve sucesso na seleção da microbiota capaz de biodegradar o OLU. O alto valor para bactérias ($367,5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹) e a maior presença de fungos ($3,2 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹) em relação ao solo controle (CS – t0) comprovaram esta afirmação, a qual também se confirmou pela avaliação da biodegradação.

Foi observado um pequeno número de UFC em bactérias e fungos totais na contaminação inicial com OLU (C2 – t0). Este resultado deve-se ao potencial tóxico do óleo para a comunidade microbiana no solo. As análises físico-químicas determinaram uma possível toxicidade, devido à alta concentração de metais. Assim, o impacto do OLU provocou uma imediata perturbação nos micro-organismos presentes.

Dentre os surfactantes, a contagem de UFC foi significativa em ensaios contendo ramnolipídio (Bs). Foi observado que a amostra C2 Bs-Ps obteve o segundo maior valor para bactérias ($100,5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹) e C2 Bs representou o maior resultado para fungos totais ($24,15 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹). Por outro lado, as amostras de solo com Dq não apresentaram grande quantidade de micro-organismos após o processo de biorremediação. Estes resultados também se relacionam com os dados de biodegradação e das análises físico-químicas, em que a adição de biosurfactante foi favorável à ação dos micro-organismos e na redução de metais tóxicos à biota. Em contrapartida, com a aplicação do detergente químico, a biodegradação e a diminuição destes elementos foram menores.

De acordo com Margesin et al. (2000), as alterações no número de micro-organismos são indicativos de um processo de biodegradação, contudo não podem ser consideradas como uma medida precisa das atividades reais do metabolismo microbiano. Individualmente, a quantificação de micro-organismos do solo fornece pouca informação sobre a eficiência degradativa dessas populações e, além disso,

apenas uma pequena parte dos micro-organismos de solo são isolados e estudados em laboratório (BECKER et al., 2000).

Por fim, diferentes comportamentos foram observados nos grupos microbianos analisado quando as amostras de solo continham o inóculo de *P. aeruginosa* LBI (Tabela 19 e Figuras 25 e 26). Em relação às bactérias, os ensaios demonstraram um acréscimo de UFC, pois o inóculo pode favorecer sua atividade no solo e, assim, produzir ramnolipídios *in situ* que emulsificam o OLU para que outras bactérias realizem sua biodegradação (RON, RONSENBERG, 2002). Entretanto, uma diminuição no número de fungos totais indicou que as células bacterianas adicionadas estabeleceram uma relação antagônica com os fungos do solo possivelmente competindo pela fonte de carbono disponível.

5.3.3. Bioensaios de Toxicidade

A germinação de sementes (Figura 27) e o desenvolvimento das plântulas (Figura 28) foram avaliados para alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*).

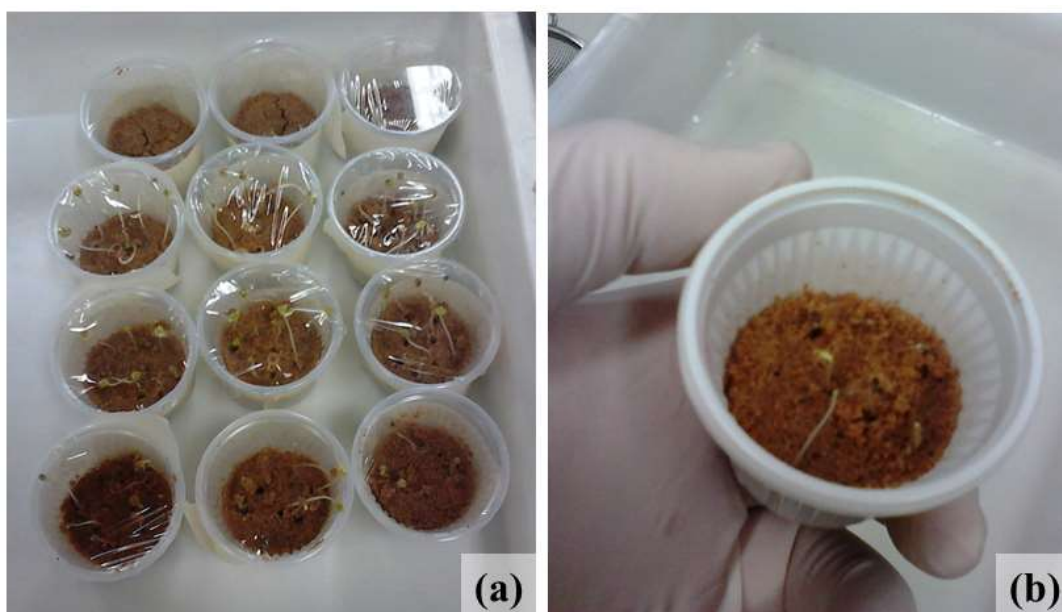


Figura 27 - Bioensaios de toxicidade. (a) Amostras de solo em triplicata. (b) Sementes germinadas após 120 h de incubação.

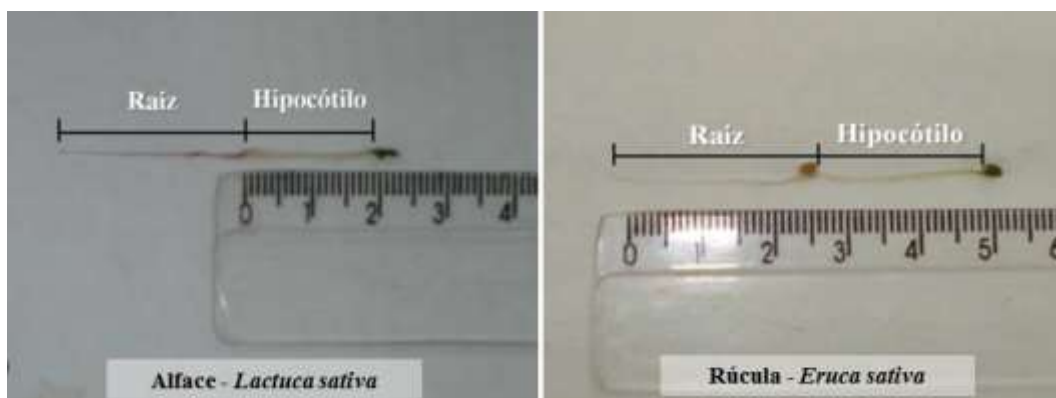


Figura 28 - Medição do hipocótilo e da raiz para os dois organismos-teste utilizados.

5.3.3.1. *Lactuca sativa*

Após 120 h de incubação no escuro, foi observado que não houve germinação no ensaio CP para ambos os tempos (Tabelas 20 e 21). Para as sementes de alface, foram determinados os índices de germinação (GI) e os cálculos de alongamento do hipocótilo e da raiz relativos ao controle negativo – CN (Figuras 29 a 32).

Tabela 20 - Porcentagem de sementes de alface germinadas (tempo zero)

<i>Lactuca sativa</i> (tempo zero)	Ensaio	Germinação
	CP	0,00%
	CN	80,00%
	C1	7,67%
	C2	0,67%

Tabela 21 – Porcentagem de sementes de alface germinadas (tempo final)

<i>Lactuca sativa</i> (tempo final)	Ensaio	Germinação	Ensaio	Germinação	Ensaio	Germinação
	CP	0,00%	C2 Dq	16,67%	C2 Dq-Ps	13,34%
	CN	50,00%	C2 Bs	16,67%	C2 Bs-Ps	40,00%
	C1	53,00%	C2 SqC	33,34%	C2 SqC-Ps	33,34%
	C2	50,00%	C2-Ps	33,34%		

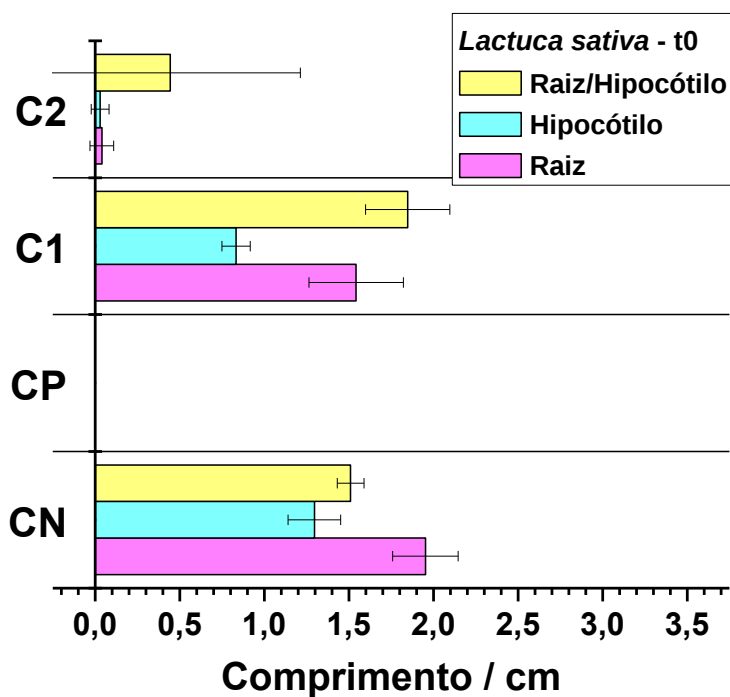


Figura 29 - Desenvolvimento das plântulas nas sementes de alface germinadas (tempo zero).

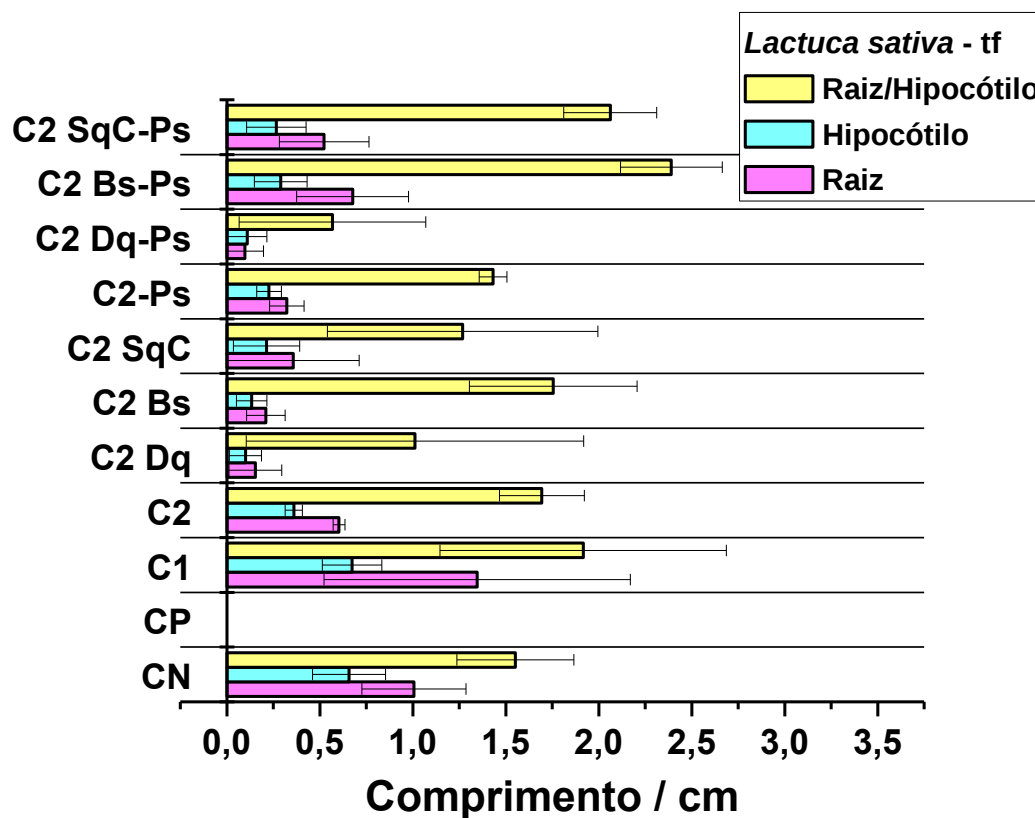


Figura 30 - Desenvolvimento das plântulas nas sementes de alface germinadas (tempo final).

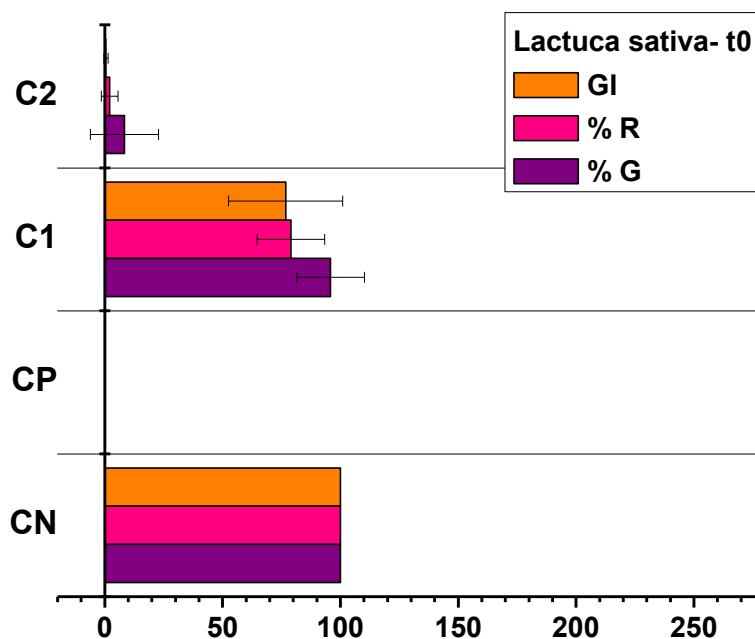


Figura 31 - Germinação e desenvolvimento das sementes de alface germinadas em relação ao controle negativo (tempo zero).

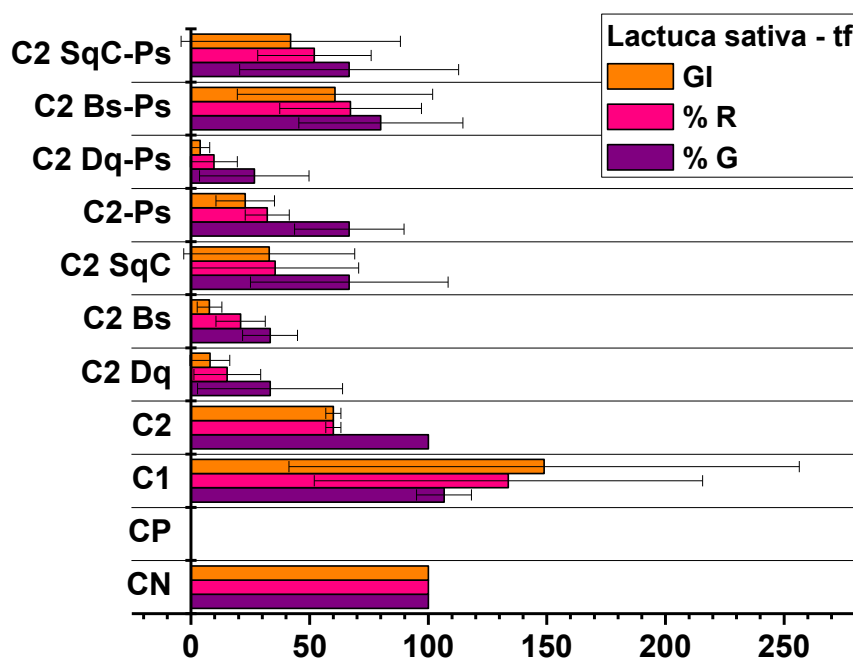


Figura 32 - Germinação e desenvolvimento das sementes de alface germinadas em relação ao controle negativo (tempo final).

Avaliando os valores de GI obtidos para os bioensaios de toxicidade com sementes de alface (Figuras 31 e 32), tem-se que a amostra mais tóxica foi a contaminação inicial (C2 – t0). A maior presença de metais pesados tóxicos, como chumbo e níquel (Tabela 18), promoveu um resultado de 0,17%, toxicidade que também refletiu na pequena presença de fungos e bactérias (Tabela 19). Realizado o processo de biorremediação, a mesma amostra de solo (C2) apresentou um alto desempenho na diminuição da toxicidade após 180 dias com GI igual a 59,93%.

O maior valor de GI foi obtido pelo ensaio utilizado como inóculo (C1). Anteriormente, sua toxicidade já era pequena em relação ao solo controle (75,72%) devido à baixa concentração de OLU. Assim, transcorrido os 180 dias de tratamento, esta amostra demonstrou-se não só ausente de toxicidade, como também trouxe benefícios à germinação de sementes e ao desenvolvimento das plântulas de alface (142,69%).

O inóculo Ps nos tratamentos atuou de diferentes maneiras, de acordo com a característica do ensaio. Nos ensaios contendo contendo Bs (C2 Bs-Ps) e SqC (C2 SqC-Ps), ocorreu maior redução na toxicidade. A amostra sem surfactante foi mais tóxica, conforme resultado de 21,41% em C2-Ps. Além disso, em C2 Dq o efeito fitotóxico diminuiu de 5,08% para 2,56% na amostra C2 Dq-Ps.

Em se tratando do Dq, ficou demonstrado que este detergente foi extremamente tóxico quando presente nas amostras de solo contaminadas com OLU. Mesmo após 180 dias de tratamento, a inibição no desenvolvimento das sementes de *L. sativa* foi alta, estando próximo do ensaio da contaminação no tempo zero (C2 – t0). Este resultado confirma as hipóteses obtidas nos testes de biodegradação e de contagem de UFC, em que se esperava maior fitotoxicidade.

Inversamente, a adição de SqC não apenas favoreceu a biodegradação, como foi capaz de reduzir a toxicidade nas amostras de solo em 23,62% e 34,66% para os ensaios sem (C2 SqC) e com o inóculo bacteriano (C2 SqC-Ps), respectivamente. Do mesmo modo, sistemas contendo Bs reduziram ainda mais o efeito tóxico, atingindo até 53,77% para GI em C2 Bs-Ps.

5.3.3.2. Eruca sativa

Após 120 h de incubação no escuro, foi observado que não houve germinação no ensaio CP para ambos os tempos (Tabelas 22 e 23). Para as sementes de rúcula, também foram determinados os índices de germinação (GI) e

os cálculos de alongamento do hipocótilo e da raiz relativos ao controle negativo - CN (Figuras 33 a 36).

Tabela 22 - Porcentagem de sementes de rúcula germinadas (tempo zero)

<i>Eruca sativa</i> (tempo zero)	Ensaio	Germinação
	CP	0,00%
	CN	93,33%
	C1	86,67%
	C2	0,67%

Tabela 23 - Porcentagem de sementes de rúcula germinadas (tempo final)

<i>Eruca sativa</i> (tempo final)	Ensaio	Germinação	Ensaio	Germinação	Ensaio	Germinação
	CP	0,00%	C2 Dq	10,00%	C2 Dq-Ps	10,00%
	CN	33,34%	C2 Bs	16,67%	C2 Bs-Ps	36,67%
	C1	60,00%	C2 SqC	16,67%	C2 SqC-Ps	40,00%
	C2	13,34%	C2-Ps	13,34%		

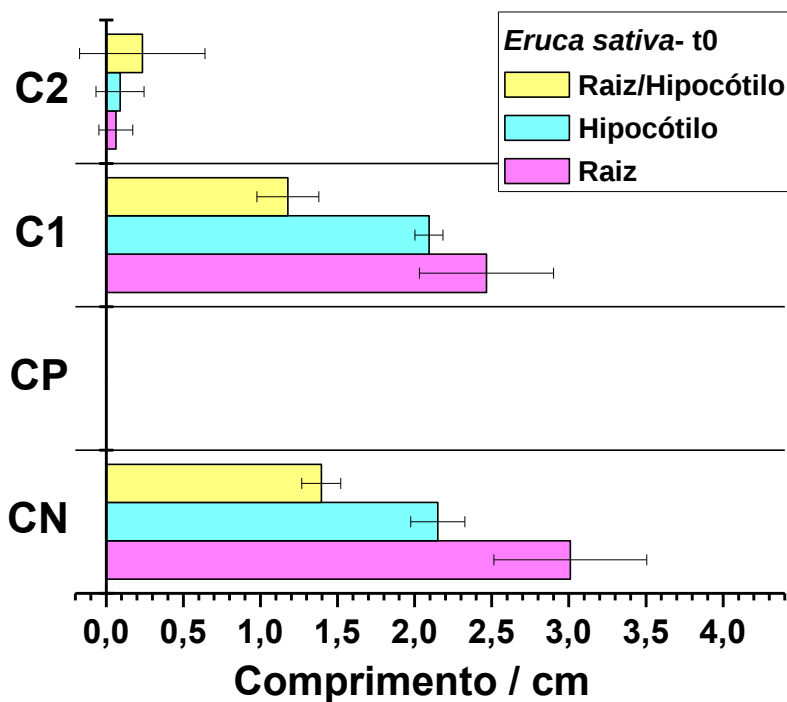


Figura 33 - Desenvolvimento das plântulas nas sementes de rúcula germinadas (tempo zero).

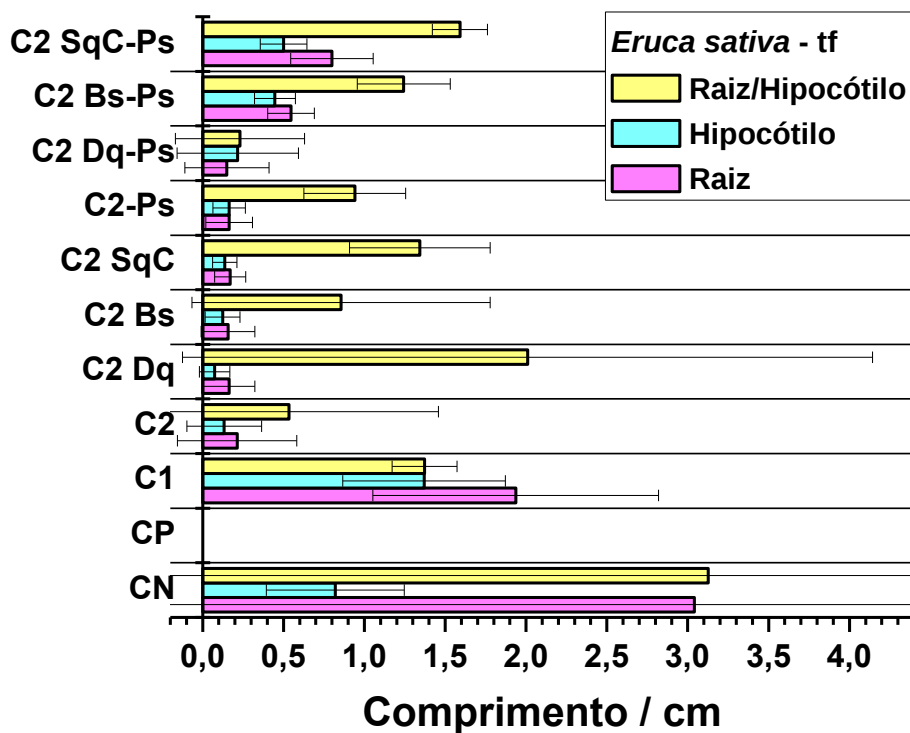


Figura 34 - Desenvolvimento das plântulas nas sementes de rúcula germinadas (tempo final).

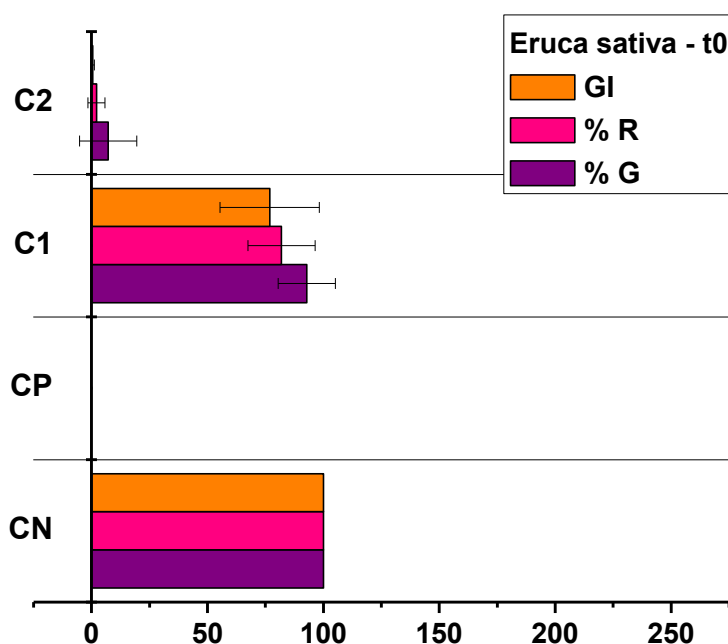


Figura 35 - Germinação e desenvolvimento das sementes de rúcula germinadas em relação ao controle negativo (tempo zero).

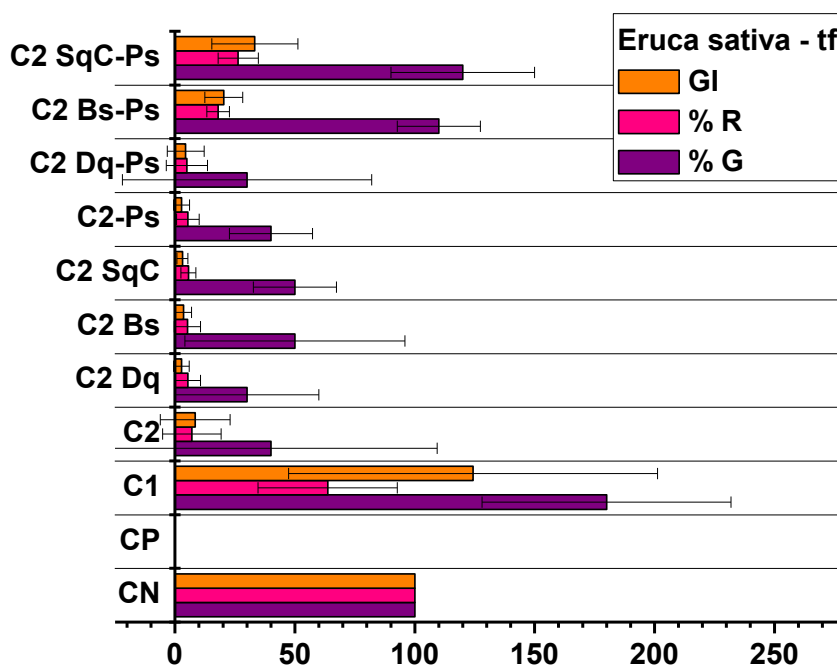


Figura 36 - Germinação e desenvolvimento das sementes de rúcula germinadas em relação ao controle negativo (tempo final).

Os resultados de GI com sementes de rúcula (Figuras 35 e 36) assemelharam-se muito aos obtidos com sementes de alface. A amostra de solo com maior fitotoxicidade foi C2 – t0 (0,15%), porém a queda no efeito tóxico não foi tão proeminente após a biorremediação, atingindo GI de apenas 2,81%. Desta forma, sem adição de surfactantes e inóculo bacteriano, o impacto praticamente se manteve após 180 dias pela atenuação natural.

O resultado com maior valor foi novamente C1 (114,67%) e sua análise no tempo zero também representava pouca toxicidade (C1 – t0, 76,10%). Juntamente aos dados de alface (Figuras 31 e 32), foi confirmada a capacidade dos micro-organismos selecionados em biodegradar o OLU e reduzir a toxicidade do meio, tornando-se, neste caso, favorável à germinação e ao desenvolvimento das sementes.

A inoculação de Ps implicou nos mesmos efeitos, sendo benéfico para os sistemas Bs e SqC e prejudicial na avaliação toxicológica das amostras contendo Dq em ausência de surfactante (C2-Ps).

Elevada toxicidade foi demonstrada mais uma vez nos ensaios C2 Dq e C2 Dq-Ps, revelando que a aplicação de Dq não foi uma estratégia ecologicamente viável para utilização no solo contaminado com OLU. Por sua vez, a utilização de Bs e SqC combinada com bioaugmentação, melhorou não só o tratamento pela melhor atividade microbiana na biodegradação, como também foram potenciais alternativas para remediação de ambientes terrestres impactados por OLU.

5.3.3.3. Discussão dos resultados e conclusão

O OLU está entre os poluentes antropogênicos de maior periculosidade devido à sua toxicidade e ao seu difícil manejo (KANOKKANTAPONG et al., 2009). Utilizando bioensaios com germinação e desenvolvimento de sementes, Lopes e Bidoia (2010) e Tamada (2012a) demonstraram que, embora o OLU seja de fácil assimilação pelos micro-organismos no solo, seu efeito tóxico é preocupante. Após seu uso, a composição do óleo retirada de cada motor é variável e há uma maior concentração de HPA em relação ao produto novo, sendo que estas moléculas aromáticas possuem alto potencial mutagênico e carcinogênico (HENRY, 1998; WHITE; CLAXTON, 2004). Além disso, é possível encontrar outros elementos perigosos, como metais pesados e bifenil policlorados - PCB (KANOKKANTAPONG et al., 2009).

O elevado potencial tóxico do OLU foi observado na pequena presença de fungos e bactérias na contaminação inicial do solo C2 – t0 (Tabela 19 e Figuras 25 e 26) e, principalmente, evidenciado pelos bioensaios de toxicidade, com valor de GI menor que 0,2% para as duas espécies vegetais (Figuras 31 e 35).

Neste sentido, sabe-se que as moléculas aromáticas presentes nos compostos oleosos, derivados de petróleo, são as responsáveis pela toxicidade aguda no solo (DORN; SALANITRO, 2000). E, após seu uso no motor, o OLU concentra HPA e outros compostos altamente perigosos à biota (HENRY, 1998), assim como alta concentração de alguns metais pesados e outros elementos, conforme demonstrado pela Tabela 18.

A eficiência da biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos está diretamente ligada não somente à degradação destes compostos, como também à diminuição da toxicidade inicial na área impactada (DORN; SALANITRO, 2000). Portanto, a maioria dos tratamentos propostos foi ecologicamente eficiente, uma vez que promoveu a degradação do OLU pela atividade microbiana e apresentou menor fitotoxicidade, em relação ao potencial toxicológico inicial (C2 – t0).

Seguindo este padrão de viabilidade, os resultados das análises físico-químicas, da contagem microbiana e dos bioensaios de toxicidade endossam a melhor eficácia nas maiores taxas de atividade microbiana observadas nos tratamentos contendo ramnolipídio (Bs) e Tween80 (SqC). Entretanto, esta afirmação não se aplica aos ensaios realizados com o detergente químico (Dq), cuja toxicidade permaneceu alta, mesmo após 180 dias de tratamento.

Comparando-se os biossurfactantes com os surfactantes químicos em relação à sua toxicidade, Edwards et al. (2003) estudaram três tensoativos sintéticos e três surfactantes microbianos. A partir de testes com organismos invertebrados, os autores demonstraram que os biossurfactantes eram menos tóxicos do que os surfactantes de origem sintética. Também, Lima et al. (2011) confirmaram que os diferentes surfactantes de origem bacteriana possuem uma toxicidade significativamente inferior do que o surfactante aniônico SDS.

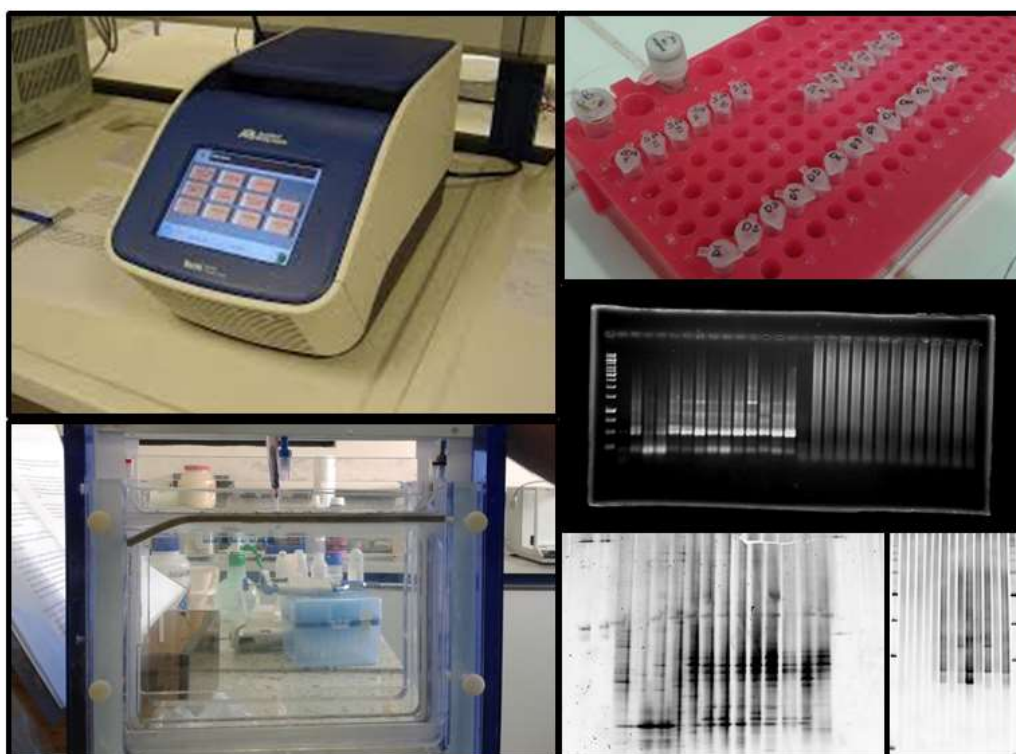
Somado a isso, foi observado também que a toxicidade de um surfactante provavelmente altera a composição das populações microbianas responsáveis por realizar a degradação do hidrocarboneto (CHEN et al., 2000; COLORES et al., 2000).

Por fim, Al-Mutairi et al. (2008) concluíram que, mesmo após significativa redução nos níveis de hidrocarbonetos de petróleo pelo tratamento biológico, a análise toxicológica revelou aumento do efeito tóxico inicial. Durante o processo de biodegradação, variações das propriedades toxicológicas também podem ocorrer. A degradação incompleta e a formação de metabólitos intermediários tóxicos podem resultar num aumento de toxicidade do solo durante a biorremediação (LOEHR; WEBSTER, 1997; LOIBNER et al, 2003; AL-MUTAIRI et al., 2008; STELIGA et al., 2012).

A partir dos resultados obtidos, confirmou-se que a avaliação dos parâmetros físico-químicos e biológicos e a realização de biosensaio de toxicidade são fatores-chave na determinação da eficácia do processo de biorremediação, não considerando apenas a diminuição na concentração dos hidrocarbonetos no ambiente e/ou os altos índices de atividade microbiana.

6. CAPÍTULO 4

Alteração da comunidade microbiana do solo contaminado com óleo lubrificante usado após processo de biorremediação



6.1. Introdução

O cultivo de micro-organismos e técnicas independentes de cultivos são as metodologias que permitem explorar a diversidade microbiana presente no solo (KIRK et al., 2004). Atualmente, sabe-se que um grama de solo pode conter até 10^9 células microbianas, distribuídas em milhares de espécies distintas, em que apenas 0,1% a 10% possa ser cultivável (TORSVIK; ØVREÅS, 2002). Dessa maneira, a obtenção de informações sobre biodiversidade, ecologia, dinâmica e riqueza da comunidade microbiana, em determinado ambiente, pode ser conquistada por meio de técnicas independente de cultivo, sendo estas baseadas em métodos moleculares, os quais tem como principal objetivo a extração do DNA total deste ambiente, para posteriores análises (KIRK et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2011)

Estas novas metodologias aumentaram a capacidade de correlacionar os dados microbiológicos com os fatores físico-químicos, distância geográfica e cobertura vegetal, permitindo inferências mais robustas a respeito das comunidades microbianas (KIRK et al., 2004).

O desenvolvimento e a adaptação de técnicas da biologia molecular, como as baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), têm permitido a identificação destes organismos de forma independente da morfologia, e também de forma independente de cultivo, levando a um maior conhecimento dos seres constituintes da microbiota (AVIO et al., 2009).

Atualmente, diversas são as metodologias desenvolvidas para estudo da comunidade microbiana no ambiente, sendo o ponto de partida a extração do DNA e/ou RNA total diretamente das amostras ambientais (SINGH et al., 2006; ANDREOTE et al., 2009). Metodologias conhecidas como *fingerprint* estudam a estrutura da comunidade, a partir de um perfil de produtos de amplificação por PCR, que podem ser diferenciados a partir de alterações nas concentrações de guanina (G) e citosina (C), por meio de uma metodologia intitulada de gel de eletroforese em gradiente desnaturante – DGGE (MUYZER et al., 1993), ou por restrição com endonucleases específicas destes fragmentos, utilizando a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminal - T-RFLP (LIU et al., 1997). Outra metodologia amplamente difundida é a de PCR quantitativo - qPCR (WEIS et al., 1992), na qual os genes alvos estudados são amplificados e quantificados ao

mesmo tempo, obtendo-se ao final valores de número de cópias do gene por grama de solo amostrado em cada ambiente.

Na análise dos resultados obtidos por PCR-DGGE, verifica-se que cada banda identificada no gel representa um grupo de micro-organismo com a mesma sequência de nucleotídeos ou sequências similares com o mesmo comportamento de desnaturação (SINGH et al., 2006). Essa técnica é adequada na comparação de duas ou mais comunidades microbianas (MUYZER et al., 2003). No caso das amostras apresentarem padrões de bandas distintos no gel, certamente as comunidades analisadas são diferentes entre si (BOON et al., 2000).

Nesta última etapa do estudo, verificou-se o efeito da aplicação das soluções de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com OLU e alterações na estrutura da comunidade microbiana, por PCR-DGGE, para Bactéria e Fungo.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Material

Foram analisadas 13 amostras de solo de modo semelhante às análises de ecotoxicidade descritas no Capítulo 3. Três amostras no tempo zero e outras dez no tempo final compunham o conjunto de amostras de solo submetidas às técnicas moleculares (Tabela 24).

Tabela 24 - Amostras de solo para realização de análises moleculares nos tempos zero e final (180 dias)

Amostras de solo (tempo zero)			Amostras de solo (tempo final – 180 dias)		
1	t0 CS	Solo	4	CS	Solo
2	t0 C1	Contaminação 1 (C1)	5	C1	Contaminação 1 (C1)
3	t0 C2	Contaminação 2 (C2)	6	C2	Contaminação 2 (C2)
			7	C2 Dq	C2 e detergente químico
			8	C2 Bs	C2 e biossurfactante
			9	C2 SqC	C2 e surfactante químico comercial
			10	C2-Ps	C2 e inóculo de <i>P. aeruginosa</i> LBI
			11	C2 Dq-Ps	C2, Dq e Ps
			12	C2 Bs-Ps	C2, Bs e Ps
			13	C2 SqC-Ps	C2, SqC e Ps

6.2.2. Métodos

Esta etapa do trabalho foi realizada em conjunto com o Prof. Dr. Fernando Dini Andreote no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Ciências do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba-SP.

6.2.2.1. Extração de DNA total das amostras de solo

As amostras de solo para a análise foram submetidas à extração de DNA com o kit comercial *PowerSoil® DNA Isolation* (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Em balança analítica, foi pesado 0,500 g de cada amostra e adicionado em tubos *PowerBead* de 2,0 mL. Foram adicionados 60 µL da solução C1, invertendo o tubo várias vezes, e, posteriormente, foi agitado em agitador de tubos na velocidade máxima por 10 min e centrifugado a 10.000 g por 30 s. O sobrenadante, de aproximadamente 450 µL, foi transferido para um novo tubo, adicionado 250 µL da solução C2, agitado por 5 s e incubado a 4 °C por 5 min. Transcorrido este período, centrifugou-se a 10.000 g por 1 min e então 600 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foram adicionados 200 µL da solução C3, seguido com agitação por 5 s e incubação a 4 °C por 5 min. Logo após, centrifugou-se a 10.000 g por 1 min e transferiu-se 750 µL do sobrenadante a um novo tubo; adicionou-se 1200 µL da solução C4, agitou-se por 5 s, carregou-se 675 µL da solução no tubo contendo a coluna e, então, centrifugou-se por 1 min a 10.000 g. A solução coletada no tubo foi descartada e 675 µL foi carregado na coluna e centrifugado por 1 min a 10.000 g. A solução coletada no tubo foi novamente descartada e o restante foi aplicado na coluna, centrifugado da mesma maneira que nas condições anteriores. Em seguida, adicionou-se 500 µL da solução C5 na coluna e centrifugou-se a 10.000 g por 30 s; descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente o tubo vazio por mais 1 min a 10.000 g. Realizada esta etapa, a coluna foi transferida para um novo tubo com a adição de 100 µL da solução C6 no centro da coluna. Por fim, estes tubos foram centrifugados por 30 s a 10.000 g e obteve-se o DNA extraído das amostras de solo.

O resultado das extrações foi avaliado por meio de uma alíquota de 5 µL do DNA extraído, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), corado com *GelRed* (Biotium Inc., Hayward, CA) em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM

ácido acético glacial, 1 mM EDTA). A corrida das amostras no gel foi realizada em campo elétrico de 80 V, por aproximadamente 30 min. Utilizou-se como marcador padrão de massa molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o gel foi, posteriormente, visualizado e fotografado em luz UV.

6.2.2.2. Amplificação de genes específicos do DNA extraído por PCR

A metodologia de PCR, seguida por DGGE, foi aplicada a fim de comparar a diversidade e a estrutura das comunidades bacteriana e fúngica em função dos diferentes tratamentos do solo contaminado. O procedimento baseou-se no estudo de Haichar et al. (2008), com adaptações. O DNA extraído das treze amostras de solo foi submetido a reações de PCR para amplificação de genes-alvo específicos a partir de *primers* e condições descritas na Tabela 25, utilizando termociclador modelo *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems).

Tabela 25 - Lista de *primers* utilizados para amplificação de diferentes alvos a partir do DNA total

<u>Primer</u>	<u>Sequência (5'-3')</u>	<u>Alvo</u>	<u>Referência</u>
1492R	ACC.TTG.TTA.CGA.CTT	Gene 16S DNAr	LANE et al., 1991
27F	AGA.GTT.TGA.TCM.TGG.CTC.AG	Gene 16S DNAr	LANE et al., 1991
1387R	CGG.TGT.GTA.CAA.CCG.GGA.ACG	Gene 16S DNAr	HEUER et al., 1997
968-GC	GCG.CCG.GGG.AGC.GCC.CCG.GGC.GGG. GCG.GGG.GCA.CGG.GGG.GAA.CGC.GAA.G	Gene 16S DNAr	HEUER et al., 1997
Ef4	CGA.AGG.GTT.GTA.TTT.ATT.AG	Gene ITS	ANDERSON et al., 2003a
ITS4	TCC.TCC.GCT.TAT.TGA.TAT.GC	Gene ITS	ANDERSON et al., 2003a
ITS2	GCT.GCG.TTC.TTC.ATC.GAT.GC	Gene ITS	ANDERSON et al., 2003b
ITS1f-GC	CCC.GCC.GCG.GGG.CGC.GGC.GGG.GGG. CGG.GGC	Gene ITS	ANDERSON et al., 2003b

A amplificação do gene 16S DNAr, para o grupo de Bactéria, foi realizada com os *primers* 1492R e 27F, a partir do seguinte ciclo: desnaturação inicial de 4 min a 94° C; seguida de 35 ciclos de 30 s a 94° C, 1 min a 63° C, 1 min a 72° C; e uma extensão final de 10 min a 72° C; resultando em 25 µL de produto de PCR (Tabela 26). Na segunda reação para o grupo de Bactéria, utilizaram-se os *primers* 1387R e 968-GC e os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial de 4 min a 94° C; seguida de 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 56° C, 2 min a 72° C; e uma

extensão final de 10 min a 72° C; resultando em 50 µL de produto de PCR (Tabela 26).

Tabela 26 - Protocolo de amplificação da primeira reação de PCR para o grupo de Bactéria

PCR1 - Bactéria	Concentração final	Volume por reação (µL)	Volume total (µL)
Água Milli-Q		14,15	212,3
Amostra		2,00	
PCR buffer	1X	2,50	37,5
MgCl ₂	3,75 mM	3,75	56,3
BSA	100,00%	0,25	3,8
dNTPs	0,20 mM	2,00	30,0
<i>forward primer</i>	0,20 pmol/µl	0,05	0,8
<i>reverse primer</i>	0,20 pmol/µl	0,05	0,8
Taq polimerase	0,05 U/µl	0,25	3,8
Total		25	345,0

Tabela 27 - Protocolo de amplificação da segunda reação de PCR para o grupo de Bactéria

PCR2 - Bactéria	Concentração final	Volume por reação (µL)	Volume total (µL)
Água Milli-Q		33,60	504,0
Amostra		1,00	
PCR buffer	1X	5,00	75,0
MgCl ₂	2,50 mM	5,00	75,0
Formamida	100,00%	0,50	7,5
dNTPs	0,20 mM	4,00	60,0
<i>forward primer</i>	0,40 pmol/µl	0,20	3,0
<i>reverse primer</i>	0,40 pmol/µl	0,20	3,0
Taq polimerase	0,05 U/µl	0,50	7,5
Total		50	735,0

Por outro lado, o grupo de Fungo baseou-se na amplificação da região interespaçadora ITS, sendo realizada a primeira reação a partir *primers* Ef4 e ITS4 e o seguinte ciclo: desnaturação inicial de 5 min a 94° C; seguida de 35 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 55° C, 90 s a 72° C; e uma extensão final de 5 min a 72° C; resultando em 25 µL de produto de PCR (Tabela 28). Na segunda reação para Fungo, utilizaram-se os *primers* ITS2 e ITS1f-GC e os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial de 5 min a 94° C; seguida de 35 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a

55° C, 90 s a 72° C; e uma extensão final de 5 min a 72° C; resultando em 50 µL de produto de PCR (Tabela 29).

Tabela 28 - Protocolo de amplificação da primeira reação de PCR para o grupo de Fungo

PCR1 - Fungo	Concentração final	Volume por reação (µL)	Volume total (µL)
Água Milli-Q		13,93	208,9
Amostra		2,00	
PCR buffer	1X	2,50	37,5
MgCl ₂	3,75 mM	3,75	56,3
BSA	100,00%	0,25	3,8
dNTPs	0,20 mM	2,00	30,0
<i>forward primer</i>	0,40 pmol/µl	0,10	1,5
<i>reverse primer</i>	0,40 pmol/µl	0,10	1,5
Taq polimerase	0,08 U/µl	0,38	5,6
Total		25	345,0

Tabela 29 - Protocolo de amplificação da segunda reação de PCR para o grupo de Fungo

PCR2 - Fungo	Concentração final	Volume por reação (µL)	Volume total (µL)
Água Milli-Q		33,50	502,5
Amostra		1,00	
PCR buffer	1X	5,00	75,0
MgCl ₂	2,50 mM	5,00	75,0
Formamida	100,00%	0,50	7,5
dNTPs	0,20 mM	4,00	60,0
<i>forward primer</i>	0,40 pmol/µl	0,20	3,0
<i>reverse primer</i>	0,40 pmol/µl	0,20	3,0
Taq polimerase	0,06 U/µl	0,60	9,0
Total		50	735,0

Após a obtenção dos *amplicons*, os produtos da PCR (segunda reação) foram avaliados em gel de agarose 1,2% (m/v), seguido de coloração em brometo de etídeo com visualização e registro fotográfico em luz UV.

6.2.2.3. Análise da estrutura da comunidade microbiana pela técnica de PCR-DGGE

As análises de DGGE foram efetuadas com o *phorU2 system* (Ingeny, Leiden, Holanda) em um gel de poliacrilamida 6,0%, com um gradiente de desnaturação de 45-65% para o grupo de Bactéria.

Para o preparo do gel, os respectivos gradientes de 45% (*Low*) e 65% (*High*) foram realizados misturando-se as soluções A (0%, acrilamida 6,0%) e B (80%, acrilamida 8,0%, ureia 5,6 M e formamida deionizada 32%), além de 75 µL de persulfato de amônia (APS) 20% e 12 µL de TEMED, em cada uma das soluções. Em seguida, as soluções foram utilizadas na montagem do gel com auxílio de bomba misturadora; e, após 50 min, o *stacking* foi confeccionado a partir de 7 mL da solução A, 45 µL de APS 20% e 10 µL de TEMED, sendo aguardado mais 60 min para sua polimerização. Assim, foram aplicados no gel 8,0 µL do produto de PCR, obtido de acordo com a Tabela 27, juntamente com 3,0 µL de tampão de carregamento.

As condições da eletroforese foram de 60 °C por 16 h a 90 V em tampão TAE 0,5 x. Realizado este passo, o gel de poliacrilamida com as amostras foi corado com *SYBR-gold* (Invitrogen, Breda, Holanda) em TAE 0,5 x no escuro por 120 min. As imagens resultantes foram usadas para conversão em matrizes de bandas com o software *ImageQuant TL unidimensional* - Amersham Biosciences, Amersham, UK, v.2003 (MCCAIG et al. 2001).

No caso do grupo de Fungo, as amostras aplicadas foram o produto de PCR de acordo com a Tabela 29. O procedimento experimental seguiu basicamente os mesmos passos descritos acima para o grupo de Bactéria, alterando apenas a concentração de poliacrilamida no gel = 8,0% e o gradiente de desnaturação = 35-65%.

6.2.2.4. Análises estatísticas

Os software PAST 1.90 (HAMMER et al., 2001) e CANOCO 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda) foram utilizados para a análise dos dados, utilizando como matriz de similaridade o algoritmo de Bray Curtis.

Para avaliar a similaridade entre os grupos observados também foram realizadas os métodos multivariados de Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinates Analysis* - PCoA). Esta se fundamenta em um mapeamento

linear da distância ou diferenças entre os grupos para o espaço de ordenação, ou seja, para a projeção no espaço cartesiano. Neste sentido, utiliza-se um algoritmo a fim de explicar a maior parte da variação no conjunto de dados obtidos. Logo, os conjuntos de dados de cada amostra são representados como pontos no espaço. A análise também fornece valores que estabelece o quanto de variação é explicada em cada eixo (RAMETTE, 2007).

Com o intuito de avaliar a correlação dos dados de DGGE com os parâmetros ambientais (Tabelas 17 e 18), foi realizado o Teste de Mantel. Esta análise é adequada para comparar duas matrizes calculadas para as mesmas amostras, mas que se baseiam em dois conjuntos de dados independentes, assim como realizado: (1) uma matriz de dissimilaridade espécies – DGGE, e (2) uma matriz de dissimilaridade ambiental (MANTEL, 1967). Calculou-se o coeficiente de correlação entre as posições correspondentes nas duas matrizes, e avaliou-se seu significado baseado nas permutações das amostras em uma das matrizes (RAMETTE, 2007). Para tal, foram utilizados os algoritmos de Bray-Curtis e Euclidiano para as matrizes de DGGE e dos dados ambientais, respectivamente. Em ecologia microbiana, o teste de Mantel já foi bastante utilizado com o intuito de testar as relações entre matrizes de distância moleculares e de dados geográficos para um mesmo conjunto de organismos ou de se relacionar diversidade comunidade a heterogeneidade ambiental (PARKER; SPOERKE, 1998; CHO; TIEDJE, 2000; HORNER-DEVINE et al., 2004; SCORTICHINI et al., 2006).

Aplicou-se também outro método estatístico neste sentido, a Análise de Redundância (*Redundancy Analysis* - RDA). Neste método, os principais eixos (componentes) são indicados a serem combinações lineares das variáveis ambientais (RAO, 1964). Duas tabelas são então necessárias: uma para os dados de espécies (variáveis "dependentes") e outra para as variáveis ambientais (variáveis "independentes"). Regressões lineares múltiplas são utilizadas para explicar a diferença entre estas variáveis dependentes e independentes e esses cálculos são realizados no âmbito de encontrar a melhor ordenação dos pontos (amostras), com o auxílio do Teste de Monte Carlo, efetuando 499 permutações. O interesse dessa abordagem é representar não só os principais padrões de variação de espécies (como evidenciado pela PCoA), tanto quanto eles possam ser explicados pelos parâmetros físico-químicos das amostras de solo, mas também

para apresentar coeficientes de correlação entre cada espécie e cada variável ambiental no conjunto de dados (LEPS; SMILAUER, 2003; RAMETTE, 2007).

Além disso, foram realizadas análises de similaridade relacionando a matriz gerada por DGGE e a matriz dos dados ambientais (Tabelas 17 e 18). Para cada parâmetro físico-químico obtido nas amostras de solo, foi calculada a distância de similaridade com os dados moleculares e elaborado um gráfico de regressão. Esta relação foi utilizada como embasamento dos resultados obtidos pela RDA. As medidas de similaridade utilizadas neste procedimento foram os algoritmos de Bray-Curtis e Euclidiano para as matrizes de DGGE e dos dados ambientais, respectivamente.

6.3. Resultados

6.3.1. Análise da estrutura da comunidade microbiana pela técnica de PCR-DGGE

As imagens dos dois géis de DGGE foram analisadas conforme a presença de bandas em cada amostra (MCCAIG et al. 2001). Abaixo, estão apresentados os padrões de bandas para Bactéria (Figura 37) e Fungo (Figura 38).

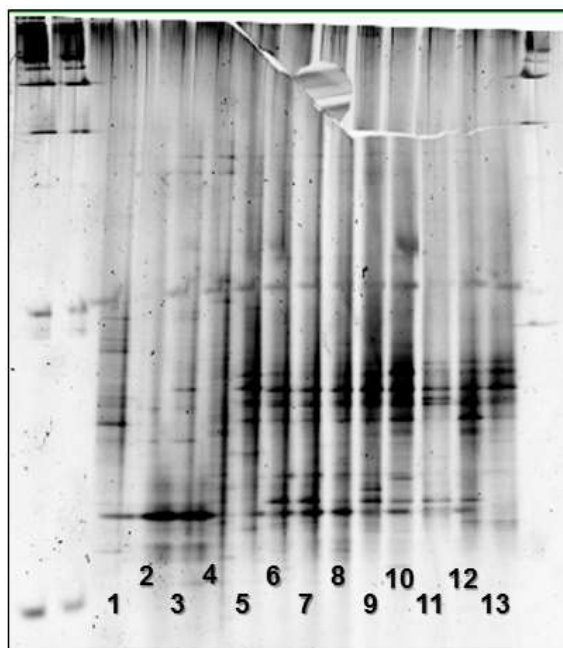


Figura 37 - *Amplicons* do gene 16S DNAr de Bactéria, após separação por DGGE. Bactérias. (1) t0 CS; (2) t0 C1; (3) t0 C2; (4) CS; (5) C1; (6) C2; (7) C2 Dq; (8) C2 Bs; (9) C2 SqC; (10) C2-Ps; (11) C2 Dq-Ps; (12) C2 Bs-Ps; (13) C2 SqC-Ps. Poliacrilamida 6,0%; gradiente desnaturante 45-65%; TAE 0,5 x; 60° C; 90 volts; 16 h.

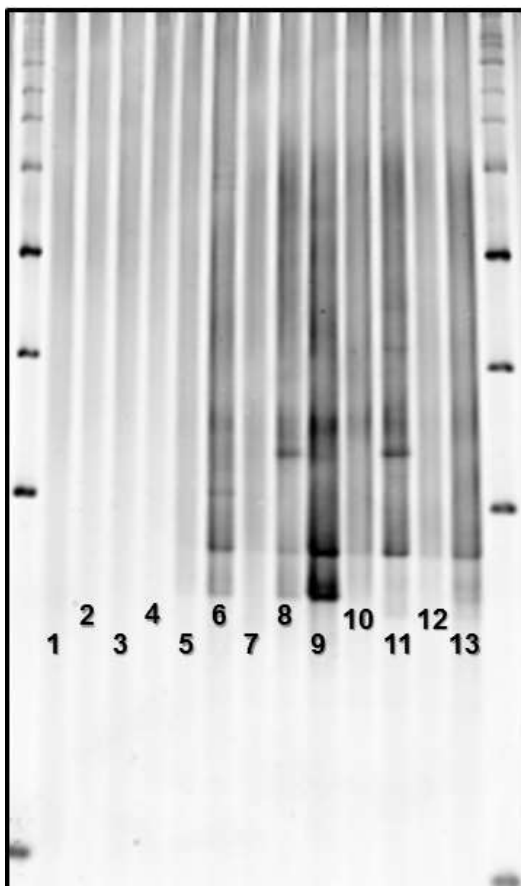


Figura 38 - *Amplicons* da região interespaçadora ITS de Fungo, após separação por DGGE. (1) t0 CS; (2) t0 C1; (3) t0 C2; (4) CS; (5) C1; (6) C2; (7) C2 Dq; (8) C2 Bs; (9) C2 SqC; (10) C2-Ps; (11) C2 Dq-Ps; (12) C2 Bs-Ps; (13) C2 SqC-Ps. Poliacrilamida 8,0%; gradiente desnaturante 35-65%; TAE 0,5 x; 60° C; 90 volts; 16 h

Ao observar o gel de DGGE para Bactéria (Figura 37), pode-se notar a presença de inúmeras bandas distribuídas entre as amostras de solo. Destaca-se a menor quantidade de bandas apresentadas nos quatro primeiros ensaios que representam: t0 CS, t0 C1, t0 C2 e CS.

Já o gel de DGGE de Fungo, não apresentou nenhuma banda nos quatro primeiros ensaios, citados acima. Além disso, a amostra de solo C1, denominada como 5 na Figura 38, também não indicou presença de banda.

6.3.2. Análises estatísticas

As análises estatísticas realizadas com as imagens de DGGE estão, inicialmente, aplicadas ao grupo de Bactéria (Figura 37) e, em seguida, para Fungo (Figura 38).

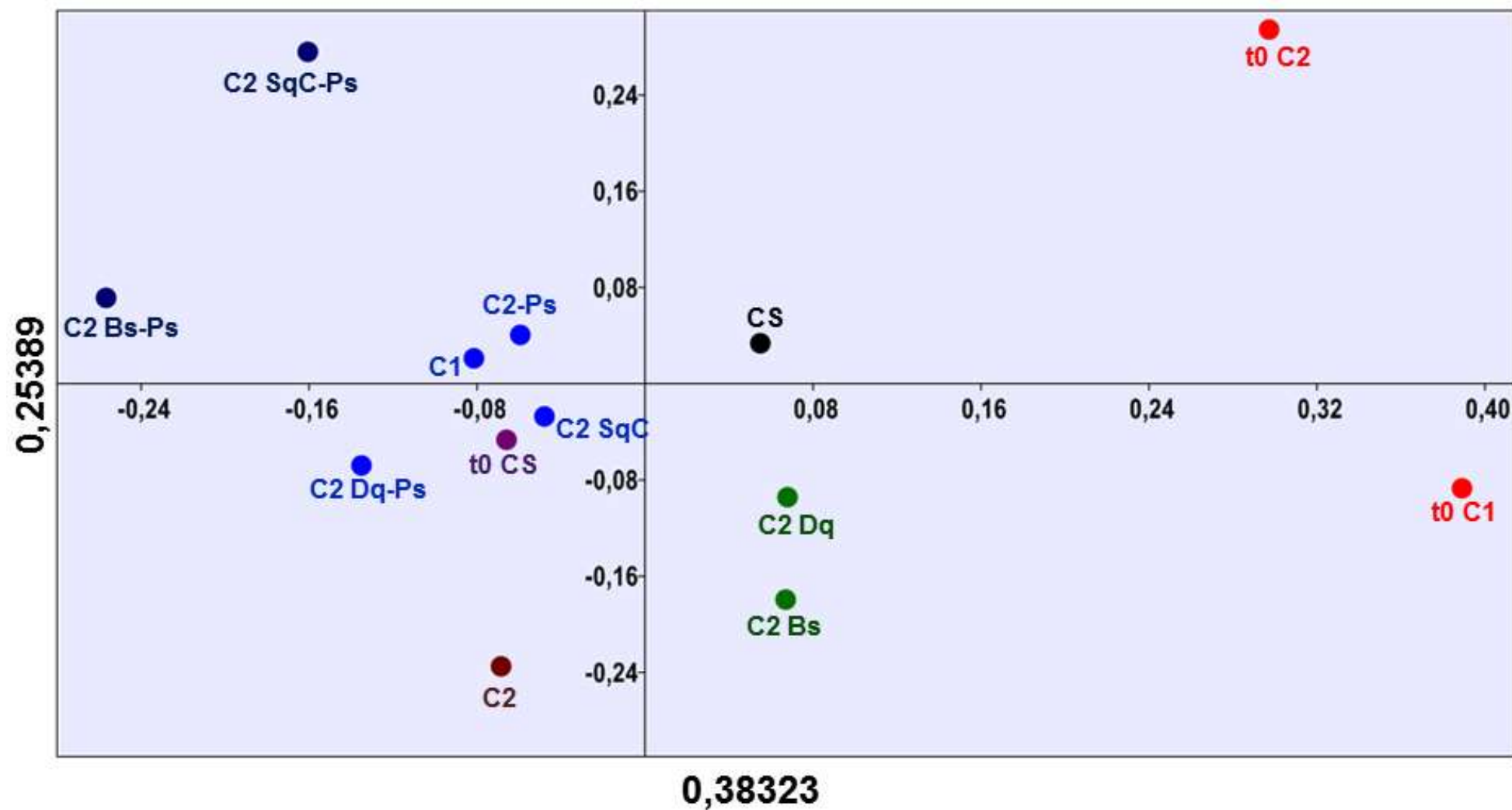


Figura 39 - Análise de coordenadas principais (PCoA) dos grupos formados com base na análise de DGGE para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA). Software PAST 1.90.

Na Figura 39, está apresentada a análise coordenadas principais (PCoA) para as bactérias. Para melhor visualização e compreensão, as amostras foram agrupadas em conjuntos de cores de acordo com suas distâncias no plano e com sua representatividade. Assim, estão dispostas da seguinte forma:

● t0 CS	● C1, C2 SqC, C2-Ps, C2 Dq-Ps
● CS	● C2 Bs-Ps, C2 SqC-Ps
● t0 C1, t0 C2	● C2 Dq, C2 Bs
● C2	

O algoritmo Bray-Curtis foi utilizado a fim de explicar a variação no conjunto de dados obtidos. Neste sentido, a explicação dada pelos eixos para esta variação foi de 63,712%.

Na interpretação da PCoA (Figura 39), considera-se a regra do cosseno baseada no eixo central. Assim, quando o ângulo entre os pontos com o eixo central ($x, y = 0$) for menor que 90° , estas amostras apresentam correlação positivo (ângulo $0^\circ = +1$). Em ângulos maiores que 90° , a correlação entre elas é negativa (ângulo $180^\circ = -1$). Por fim, quando existe um ângulo reto entre os pontos com o eixo central, as amostras não possuem correlação entre si – neutro (ângulo $90^\circ = 0$).

Deste modo, os perfis de DGGE que mais se diferenciam do restante são t0 C1 e t0 C2, sendo que ambos se tratam de solo contaminado com OLU no tempo zero. Em comparação com o solo controle no tempo inicial, foi observado que as amostras contaminadas possuíam uma correlação negativa com t0 CS ($> 90^\circ$), demonstrado na Figura 39. Logo, a comunidade bacteriana sofreu alteração em sua estrutura em função da presença do poluente. Este resultado corresponde à conclusão de Andreoni et al. (2004) que a microbiota é muito sensível mesmo a baixa concentração de um contaminante e, portanto, responde rapidamente quando ocorre uma perturbação no ambiente.

Modificações na estrutura da comunidade bacteriana no solo contaminado foram apresentadas após 180 dias de biorremediação. Na Figura 39, C2 está negativamente correlacionado com seu perfil estabelecido anteriormente (t0 C2). Esta diferença demonstra a dinâmica da comunidade de bactérias que, neste ensaio, obteve alta atividade de biodegradação durante o processo com redução da toxicidade inicial. Além disso, a amostra C2 foi tida como padrão de comparação com os tratamentos realizados, representando o modelo de atenuação natural do

solo, já que não houve aplicação de surfactantes e nem inoculação de micro-organismos.

Por outro lado, as amostras C1, C2 SqC, C2-Ps, e C2 Dq-Ps foram aqueles que mais se aproximaram da estrutura da comunidade original de t0 CS ($< 90^\circ$). A resposta de C1 é devido à baixa concentração de OLU em razão deste ensaio ser utilizado como prévia seleção dos micro-organismos capazes de metabolizar o hidrocarboneto (LOPES; BIDOIA, 2009; MONTAGNOLLI et al., 2009). Esta amostra C1 não demonstrou valores altos para atividade microbiana e para efeitos tóxicos frente aos organismos-teste e, deste modo, sua composição de comunidade bacteriana se assemelha àquela encontrada em t0 CS. Contudo, destaca-se novamente a alteração de sua estrutura, após o biotratamento em relação ao tempo inicial, representado por t0 C1 (Figura 39).

No caso de C2 SqC e C2-Ps, observou-se que, apesar de estarem entre os valores mais altos de biodegradação, houve pouca redução na toxicidade destas amostras. Sabendo que o solo utilizado era arenoso, a concentração de micro-organismos presentes esperava-se ser pequena, conforme demonstrado pelas Figuras 25 e 26 e pela Tabela 19. Assim sendo, as comunidades que se correlacionaram mais positivamente com t0 CS não significa serem aquelas com maior eficiência de tratamento. O perfil encontrado em C2 Dq-Ps endossa este resultado, indicando que a alta toxicidade das amostras pode direcioná-las a uma estrutura de comunidade bacteriana semelhante. Tal fato fundamenta-se tanto nos ensaios de biodegradação, quanto nos testes de ecotoxicidade, pois a amostra C2 Dq-Ps demonstrou baixo metabolismo microbiano e o mais alto valor de toxicidade após 180 dias.

Resultados próximos de biodegradação e ecotoxicidade foram encontrados em C2 Dq e C2 Bs. Estas amostras agrupam-se entre as mais tóxicas e de menor potencial biodegradativo dentre as estudadas. No entanto, C2 Dq e C2 Bs não se correlacionam positivamente na PCoA com C2 Dq-Ps ($\geq 90^\circ$), conforme apresentado na Figura 39. O fato de utilizar o processo de bioaugmentação, inoculando *P. aeruginosa* LBI em C2 Dq-Ps, provavelmente estabeleceu uma perturbação nas relações ecológicas microbianas que direcionaram para estes resultados. Esta estratégia utilizada em biorremediação permite reduzir o período de adaptação da microbiota promovendo a multiplicação da biomassa e, consequentemente, da atividade enzimática envolvida no processo (ALEXANDER, 1999). Assim, há um

desequilíbrio na comunidade com o favorecimento de algumas populações microbianas em detrimento de outras (LIU et al., 2011; LLADÓ et al., 2012).

Por fim, C2 Bs-Ps e C2 SqC-Ps encontram-se agrupadas entre si ($< 90^\circ$) e em uma posição de não correlação com o processo de atenuação natural da contaminação - C2 (Figura 39). Dentre os tratamentos realizados, estas amostras foram as mais eficientes na redução da toxicidade e tiveram índices significativos de atividade microbiana durante a biodegradação. De acordo com estes resultados, C2 Bs-Ps e C2 SqC-Ps revelaram ser os melhores tratamentos considerando as relações ecológicas ambiente. Logo, suas estruturas de comunidade bacteriana estavam correlacionadas entre si e distantes das amostras com maior efeito tóxico e menor potencial de biodegradativo.

Buscando compreender as relações entre os atributos químicos das amostras de solo e a variabilidade das comunidades bacterianas encontradas, foi efetuada análise de Mantel. A correlação entre as matrizes dos isolados e dos atributos físico-químicos das amostras dos solos, obtida a partir do Teste de Mantel, foi de 40,05%, sendo o valor encontrado significativo a 5,0%. Isto indica que os resultados demonstraram possíveis alterações nas estruturas das comunidades entre as amostras de solo contaminadas com OLU.

Em se tratando da RDA (Tabela 30), cada parâmetro físico-químico calculado está explicado por dois índices: Lambda A (efeitos condicionais) e Lambda 1 (efeitos marginais). Ambos identificam o quanto a variável infere na distribuição dos perfis de DGGE, sendo que o primeiro possui suporte estatístico pelo valor de p . Porém, para esta análise, nenhum parâmetro apresentou efeito significativo de correlação com a matriz dos dados moleculares ($p > 0,05$).

Tabela 30 - Coeficientes de correlação dos parâmetros ambientais gerado por RDA baseado nos perfis de DGGE das amostras de solo. Software CANOCO 4.5.

Parâmetro	Lambda A	<i>p</i>	Lambda 1
Fe	10,0%	0,242	10,0%
pH	9,0%	0,346	10,0%
Pb	10,0%	0,378	9,0%
H+Al	9,0%	0,334	9,0%
Cr	9,0%	0,350	10,0%
Na	9,0%	0,328	9,0%
GI	8,0%	0,396	7,0%
Mn	9,0%	0,374	9,0%
V	6,0%	0,504	6,0%
Ni	7,0%	0,432	7,0%
P	10,0%	0,316	9,0%
MO	4,0%	1,000	8,0%

Neste sentido, outra abordagem estatística foi aplicada relacionando a matriz gerada por DGGE e a matriz dos dados ambientais. Análises de similaridade foram realizadas novamente para cada parâmetro físico-químico, resultando nas suas distâncias de similaridade, demonstradas por modelos de regressão (Figura 40).

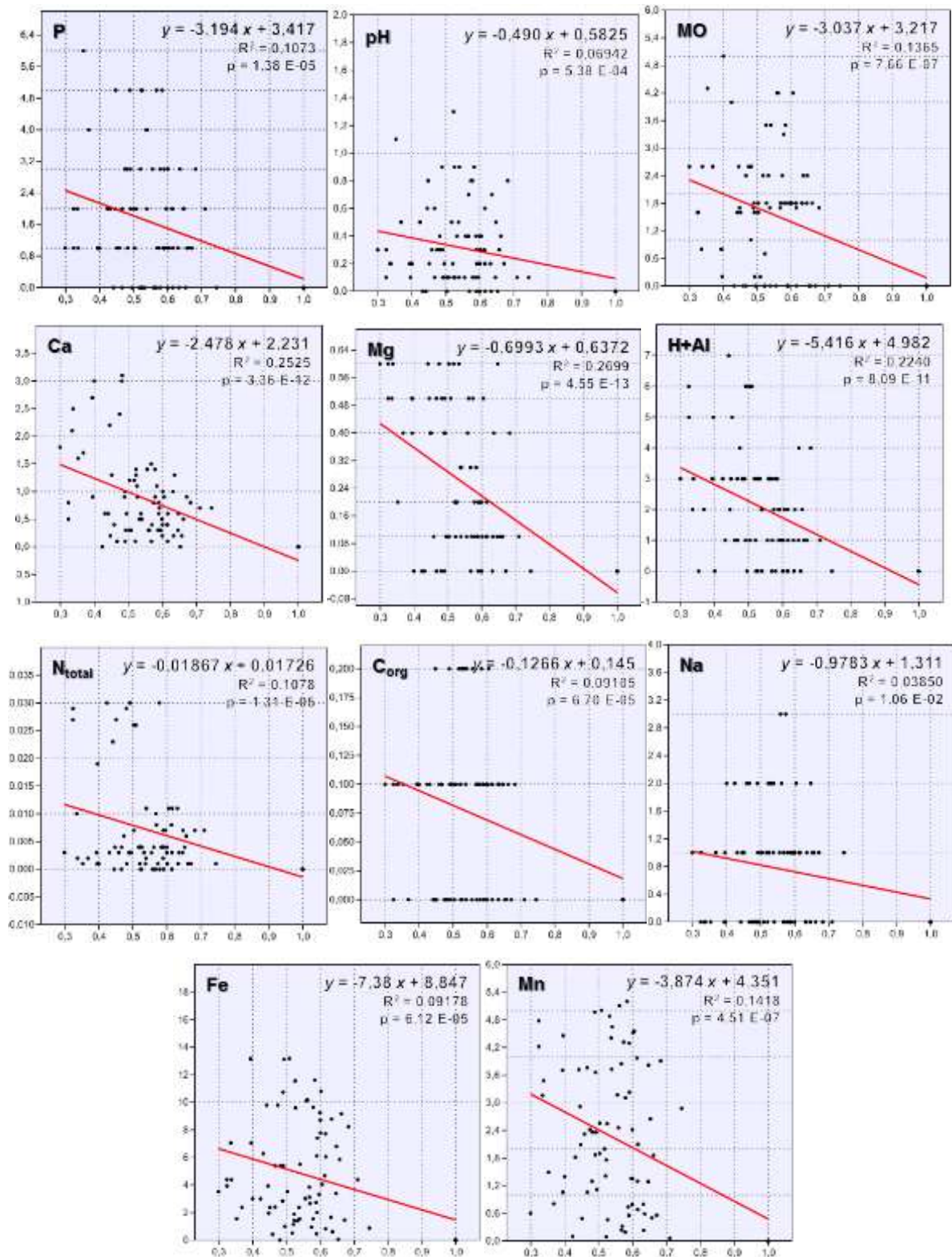


Figura 40 - Análise de similaridade dos grupos formados com base na análise de DGGE para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA). Software PAST 1.90.

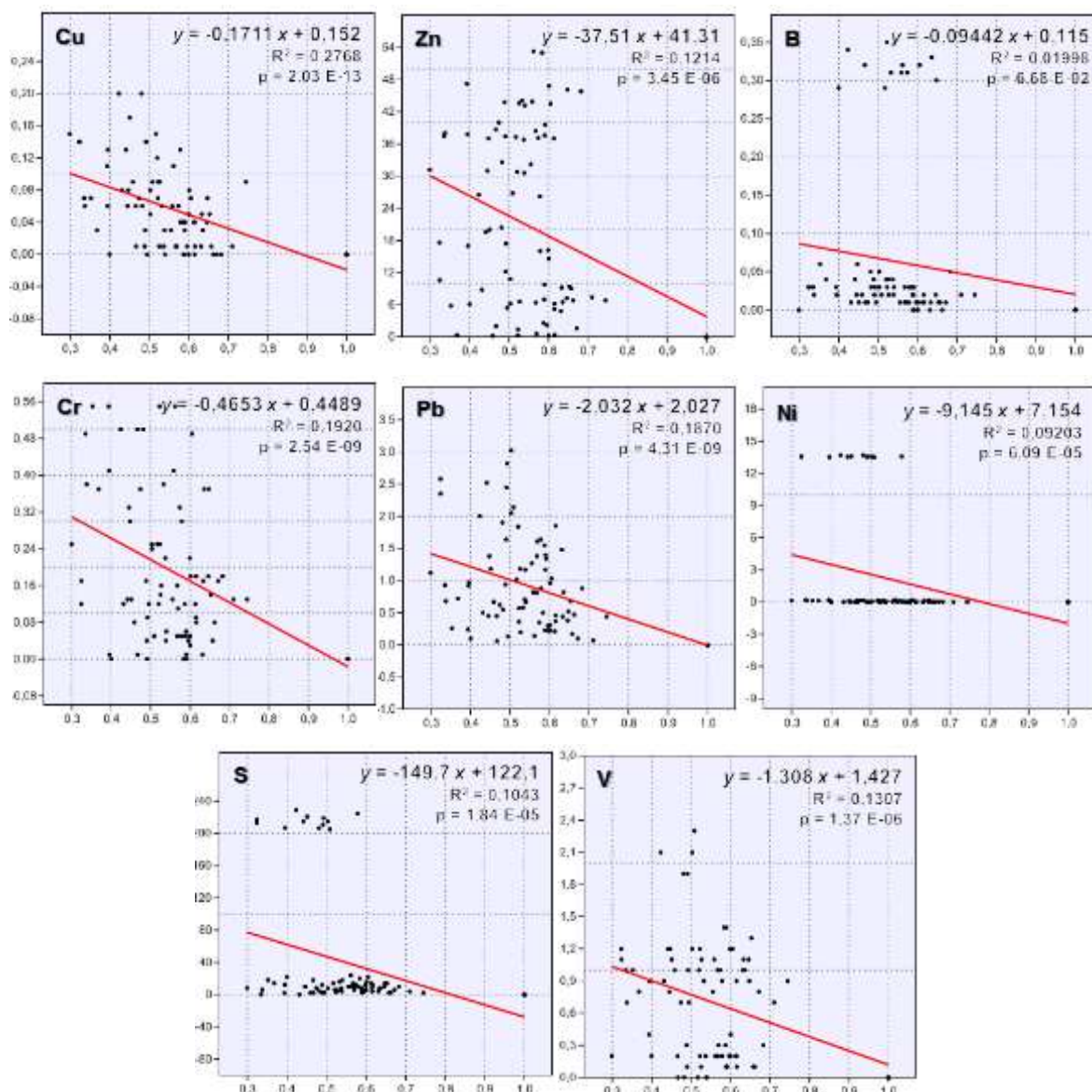


Figura 40 - Análise de similaridade dos grupos formados com base na análise de DGGE para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA). Software PAST 1.90.

Estas regressões lineares múltiplas são utilizadas para explicar a diferença entre as variáveis no âmbito de encontrar a melhor ordenação dos pontos (amostras). Pela Figura 40, observa-se que todos os modelos apresentaram $p < 0,05$. Por outro lado, o coeficiente de correlação das regressões lineares geradas (R^2) atingiu até 27,68%.

Assim, os atributos com maiores valores de R^2 foram: Cu, Mg, Ca e H+Al. Baseado neste coeficiente de correlação, tem-se que seu valor revela o quanto da variação dos dados amostrais pode ser proveniente daquele determinado parâmetro.

Assim, 22,40% da variação encontrada na análise molecular da comunidade bacteriana podem ser explicados pelo parâmetro H+Al (Figura 40), o qual se

caracteriza como indicador de toxidez do solo (FOY et al., 1978; ANIOL, 1990; BENNET; BREEN, 1991; ECHART; MOLINA, 2001). Este resultado segue de acordo com os resultados obtidos pela PCoA (Figura 39), em que o efeito tóxico das amostras de solo revelou ser um importante fator na estrutura da comunidade de bactéria.

Para a comunidade de fungos, não foi possível aplicar nenhum dos métodos estatísticos descritos em função da ausência de bandas em algumas amostras de solo. Conforme apresentado na Figura 38, t0 CS, t0 C1, t0 C2, CS e C1 não apresentaram nenhuma banda específica na imagem do gel de DGGE. Na Tabela 31, está determinado o número de bandas em cada amostra de solo obtida pela técnica de PCR-DGGE.

Tabela 31 - Número de bandas dos grupos formados com base na análise de DGGE para comunidades de fungos totais (região interespaçadora ITS)

<u>Amostra</u>	<u>Número de bandas</u>	<u>Amostra</u>	<u>Número de bandas</u>
t0 CS	0	C2 Bs	6
t0 C1	0	C2 SqC	18
t0 C2	0	C2-Ps	2
CS	0	C2 Dq-Ps	15
C1	0	C2 Bs-Ps	2
C2	9	C2 SqC-Ps	5
C2 Dq	2		

Em suma, os resultados obtidos neste estudo corroboraram com alguns trabalhos, estabelecendo que, entre os micro-organismos envolvidos na biodegradação de hidrocarbonetos (entre eles, os HPA), as bactérias desempenham um papel fundamental neste processo. Várias linhagens bacterianas são capazes de metabolizar ou co-metabolizar estes compostos orgânicos (LORS et al., 2010). Também, González et al. (2011) concluíram que os surfactantes tem efeito na dinâmica das comunidades microbiana no seu estudo com um consórcio degradador de HPA.

Lors et al. (2010), estudando a biorremediação *in situ* de solo contaminado com HPA, revelaram que a comunidade bacteriana envolvida no processo de degradação destes compostos possui alta diversidade. Foi demonstrado que houve

a persistência de um consórcio bacteriano representado por cepas Gram-negativas, pertencentes, principalmente, à Gammaproteobacteria. Dentro do grupo ainda se destacaram os gêneros *Pseudomonas* e *Enterobacter*, os quais apresentaram uma forte capacidade de degradação de HPA que se manteve ao longo do biotratamento. Posteriormente, o mesmo resultado foi observado em ensaios no laboratório (LORS et al., 2012). Isto permitiu concluir que este consórcio, persistente ao longo do tratamento biológico, é considerado um bom bioindicador para estimar o potencial de biodegradação em solos contaminados com hidrocarbonetos.

No entanto, a importância da presença dos fungos durante o processo de biorremediação em solo contaminado com hidrocarbonetos já foi destacada em alguns trabalhos (LIU et al., 2011; LLADÓ et al., 2012; 2013). Ao longo do tratamento, as interações bactéria-fungo no mecanismo enzimático de degradação dessas moléculas promovem uma dinâmica fundamental para a realização de um processo eficiente. Liu et al. (2011) revelaram que, nos primeiros momentos, as comunidades bacterianas removem a maior parte dos hidrocarbonetos saturados e parcialmente os aromáticos; em seguida, as comunidades de fungos passam a ser as responsáveis pela degradação da maioria dos metabólitos recalcitrantes, ou seja, os hidrocarbonetos residuais.

Por consequência, o conhecimento das comunidades microbianas presentes no ambiente contaminado revela-se ser uma importante ferramenta na determinação das estratégias a serem adotadas para a biorremediação *in situ* (SUN et al., 2012). Compreender como biorremediação influencia a diversidade da comunidade microbiana do solo torna-se um passo crucial para um melhor conhecimento sobre o comportamento e função dessas populações (ROS et al., 2010).

Em suma, foi possível concluir que os efeitos tóxicos específicos de cada amostra foram cruciais para a estruturação da comunidade microbiana, como demonstrado pela PCoA. Neste sentido, o teste de Mantel revelou que os parâmetros físico-químicos do solo possuem influência para os diferentes perfis encontrados. Ainda, a análise de similaridade, realizada com cada atributo individualmente, conseguiu reunir os resultados da PCoA e do teste de Mantel, pois indicou a relevância de um indicador de toxidez na variação dos dados moleculares.

Os resultados são também corroborados com Lebrowska et al. (2011), que concluíram que a introdução de micro-organismos capazes de degradar o poluente,

no caso o OLU, e de produzir biossurfactante (*P. aeruginosa* LBI) no solo contaminado aumenta a eficiência no processo de biorremediação.

Taccari et al. (2012), estudando a biorremediação de solo contaminado com óleo diesel, a partir da adição de biossurfactante e a inoculação de micro-organismos, reportaram resultados semelhantes a partir da análise da comunidade microbiana por PCR-DGGE. No início do experimento (tempo zero), o ensaio que representa a atenuação natural (t0 C2) demonstrava pouca biodiversidade pela menor quantidade de bandas no gel e estava totalmente separada dos outros, conforme demonstrado na PCoA (Figura 39). Alguns tratamentos propostos pelos autores também apresentaram baixa biodiversidade em função do efeito tóxico do hidrocarboneto, assim como discutido acima. Também, os pesquisadores notaram um perfil de agrupamento para alguns tratamentos que apresentavam padrões de bandas abundantes, revelando uma biodiversidade ampla. A presença de um maior número de micro-organismos e o seu efeito sinérgico é uma chave para a biorremediação bem sucedida (JOHNSEN et al., 2005).

Neste sentido, procedimentos moleculares adicionais, baseados em técnicas independentes de cultivo, são necessários para auxiliar a compreensão da dinâmica das comunidades de bactérias na biodegradação de OLU. Assim, diferentes hipóteses de correlação entre os dados moleculares e ambientais podem ser elucidadas de forma consistente e específica.

7. CONCLUSÕES

- *Pseudomonas aeruginosa* LBI foi capaz de produzir ramnolipídios a partir de borra de soja como única fonte de carbono;
- O biossurfactante produzido demonstrou bons resultados na emulsificação do óleo lubrificante automotivo usado, indicando seu potencial de aplicação em ambientes contaminados por este hidrocarboneto;
- O rendimento de 7,17% na produção do biossurfactante a partir do resíduo agroindustrial leva a possibilidade de produção comercial de ramnolipídios utilizando matéria-prima de baixo custo;
- A adição de surfactantes favoreceu a biodegradação do OLU com destaque ao ramnolipídio e ao Tween80. Por outro lado, o detergente químico Ecoquímica® representou pouco aumento no metabolismo microbiano;
- A inoculação de *P. aeruginosa* LBI no solo (bioaugmentação) beneficiou a biodegradação do OLU nos tratamentos propostos;
- Inicialmente, o solo contaminado com OLU apresentava-se com altas concentrações de metais pesados e enxofre que lhe conferia toxidez elevada. O impacto da contaminação foi evidenciado pela pouca presença de bactérias e fungos totais e também pela diferença nas estruturas da comunidade bacteriana em relação às outras amostras;
- O processo de tratamento biológico foi capaz de diminuir os efeitos fitotóxicos da contaminação por OLU, assim como diminuir a concentração de metais e indicar um número maior de UFC para bactérias e fungos.

Ainda, a dinâmica da comunidade microbiana durante tratamento estabeleceu um perfil diferente ao comparar com o tempo inicial;

- Os ensaios mais eficazes e ecologicamente viáveis para a descontaminação do solo contaminado com OLU foram aqueles que combinaram a bioaugmentação e a aplicação do ramnolipídio ou do Tween80;
- Os tratamentos realizados com o detergente químico apresentaram baixa quantidade de micro-organismos, demonstrando elevado efeito tóxico mesmo após 180 dias;
- A análise da comunidade microbiana por técnicas moleculares possibilitou avaliar a perturbação do impacto com o OLU e o comportamento dos tratamentos propostos em relação à estrutura de cada comunidade;
- O grupo das bactérias atuou como agente principal na biorremediação de solo contaminado com OLU;
- Novos procedimentos moleculares baseados em técnicas independentes de cultivo devem ser aplicados para melhor compreensão da dinâmica das comunidades microbianas durante a biorremediação de solo contaminado com OLU.

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWABA, M.M.; HASSOUNA, N.A.H. Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 329–345, 2009.

ABDEL-MAWGOUD, A.M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1323–1336, 2010.

ABIOVE. **Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais**. 2012. Disponível em: <<http://www.abiove.com.br/>>. Acesso em: 15 mai. 2012.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 14283**: Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro, 1999. 8 p.

ACCORSINI, F.R.; MUTTON, M.J.R.; LEMOS, E.G.M.; BENINCASA, M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 116-125, 2012.

ADMON, S.; GREEN, M.; AVNIMELECH, Y. Biodegradation kinetics of hydrocarbons in soil during land treatment of oily sludge. **Bioremediation Journal**, v. 5, p. 193-209, 2001.

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

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. Academic Press, 1994.

AL-MUTAIRI, N.; BUFARSAN, A.; AL-RUKAIBI, F. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. **Chemosphere**, v. 74, p. 142-148, 2008.

- AMAKIRI, J.; ONOFEHARA, F. Effects of crude oil pollution on the germination of *Zea mays* and *Capsicum frutescens*. **Environmental Pollution**, v. 35, p. 159-167, 1984.
- AMANI, H.; SARRAFZADEH, M.; HAGHIGHI, M.; MEHRNIA, M.R. Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 75, p. 209–214, 2010.
- AMI - Acmite Market Intelligence. **Market Report, World Surfactant Market: Markets, Products, Applications, Innovations, Chances & Risks, Competition, Prospects to 2015**. Active Market Intelligence: Germany, 2008.
- AMUND, O.O.; ADEBIYI, A.G. Effect of viscosity on the biodegradability of automotive lubricating oils. **Tribology International**, v. 24, p. 235–237, 1991.
- ANDERSON, I.C.; CAMPBELL, C.D.; POSSER, J.I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland-Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1121-1132, 2003a.
- ANDERSON, I.C.; CAMPBELL, C.D.; POSSER, J.I. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 36-47, 2003b.
- ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M.A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL'AMICO, E.; COLOMBO, M.; GIANFREDI, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAH polluted soils. **Chemosphere**, v. 57, p. 401–412, 2004.
- ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 417-432, 2009.
- ANGELOVA, B.; SCHMAUDER, H.P. Lipophilic compounds in biotechnology: interactions with cells and technological problems. **Journal of Biotechnology**, v. 67, p. 13-32, 1999.
- ANIOL, A.; GUSTAFSON, J.P. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye, and triticale. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 26, p. 701-705, 1984.
- ANON. Product review biodegradable fluids and lubricants. **Industrial Lubrication and Tribology**, v. 48, n. 2, p. 17-26, 1996.
- ANTIC, M.P.; JOVANCICEVIC, B.S.; ILIC, M.; VRVIC, M.M.; SCHWARZBAUER, J. Petroleum pollutant degradation by surface water microorganisms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 13, p. 320-327, 2006.
- APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 23-29, 2012.

- ARMANN, R.I.; LUDWIG, W. Ribossomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiology Reviews**, v. 24, p. 555-565, 2000.
- ARNAIZ, R. R. **Las Toxinas Ambientales y sus Effects Genéticos**, México, 2ª ed., 1995.
- ASA- American Soybean Association. **Soy Stats - A Reference Guide to Important Soybean Facts and Figures**. 2012. Disponível em: <<http://www.soystats.com/>>. Acesso em: 30 mai. 2012.
- ATLAS, M.R. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v. 45, n. 1, p. 180-209, 1981.
- AVIO, L.; CRISTANI, C.; STRANI, P.; GIOVANNETTI, M. Genetic and phenotypic diversity of geographically different isolates of *Glomus mosseae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 242-253, 2009.
- AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. UFPB, Campina Grande, 1999.
- BALBA, M.T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 2, p. 155-164, 1998.
- BALBA, M.T.; AL-SHAYJI, Y.; AL-AWADHI, N.; YATEEM, A. Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from oil-contaminated soil. **Soil and Sediment Contamination**, v. 11, p. 41-55, 2002.
- BAMFORTH, S.M.; SINGLETON, L; Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 723-736, 2005.
- BANAT, I.M.; MAKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BANKS, M.K.; SCHULTZ, K.E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. **Water Air and Soil Pollution**, v. 167, n. 1-4, p. 211-219, 2005.
- BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescence* isolated from a petroleum contaminated soil. **Environment International**, v. 26, p. 413-416, 2001.
- BARROS, F.F.C.; PONEZI, A.N.; PASTORE, G.M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1071-1078, 2008.
- BARTHA, R.; ATLAS, R.M. The microbiology of aquatic oil spills. **Advances in Applied Microbiology**, v. 22, p. 225-226, 1977.

- BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.
- BARTZ, W. J. OLURICANTS and the environmental. **Tribology International**, v. 31, p. 35-47, 1998.
- BECKER, S.; BÖGER, P.; OEHLMANN, R.; ERNST, A. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4945-4953, 2000.
- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.
- BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, n. 85, p. 1-8, 2004.
- BENINCASA, M. Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. **Current Microbiology**, v. 54, p. 445-449, 2007.
- BENNET, R.J.; BREEN, C.M. The aluminium signal: new dimensions to mechanisms of aluminium tolerance. **Plant and Soil**, v. 134, p. 153-166, 1991.
- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.
- BERGSTRÖM S, THEORELL H, DAVIDE H. On a metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea*, pyolipic acid, active against *Mycobacterium tuberculosis*. **Ark Kemi Mineral Geolog**, v. 23A, p. 1-12, 1946.
- BERTON, R.S.; PIRES, A.M.M.; ANDRADE, S.A.L.; ABREU, C.A.; AMBROSANO, E.J.; SILVEIRA, A.P.D. Toxicidade do níquel em plantas de feijão e efeitos sobre a microbiota do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1305-1312, 2006.
- BERTRAND, J.C.; BONIN, P.; GOUTX, M.; GAUTHIER, M.; MILLE, G. The potential application of biosurfactants in combating hydrocarbon pollution in marine environment. **Research in Microbiology**, v. 145, p. 53-56, 1994.
- BIDOIA, E.D.; MONTAGNOLLI, R.N.; LOPES, P.R.M. **Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study**. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Formatex Research Center: Espanha, v. 2, p. 1277-1288. 2010.

BOON, N.; MARLÉ, C.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W. Comparison of the spatial homogeneity of physico-chemical parameters and bacterial 16S rRNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 742-747, 2000.

BOGNOLO, F. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physiochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BORDOLOI, N.K.; KONWAR, B.K. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 495-505., 2009.

BOUDOUR, A.A.; GUERRERO-BARAJAS, C.; JIORLE, B.V.; MALCOMSON, M.E.; PAULL, A.K.; SOMOGYI, A.; TRINH, L.N.; BATER, R.B.; MAIER, R.M. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN11. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1114-1120, 2004.

BOUTIN, C.; ELMGAARD, N.; KJEER, C. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 349-369, 2004.

BRITO, G.C.B.; SOUZA, D.B.S.; VASCONCELOS, F.C.W.; BRAGA, L.C. The importance of microorganism bioprospection in areas contaminated by products derived from oil. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 3, n. 3, p. 291-310, 2010.

BROCK, T.D.; MADINGAN, M.T. **Biology of Microorganisms**, 6^a ed, Prentice-Hall, 1991.

CALVO, C.; TOLEDO, F.L.; POZO, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Biotechnology of bioemulsifiers produced by microorganisms. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 2, p. 238-243, 2004.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of The Total Environment**, v. 407, p. 3634-3640, 2009.

CAMEOTRA, S.S.; BOLLAG, J.M. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 111-126, 2003.

CAMEOTRA, S.S.; MAKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.

CAMEOTRA, S.S.; MAKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.

CAMEOTRA, S.S.; MAKAR, R.S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, p. 97-116, 2010.

- CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.
- CASAS-LIZA, J.; PINTO J.M. Optimal scheduling of a lube oil and paraffin production plant. **Computers and Chemical Engineering**, v. 29, n. 6, p. 1329-1344, 2005.
- CELIK, G.Y.; ASLIM, B.; BEYATLI, Y. Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 6, p. 867-870, 2008.
- CETESB, Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha**. Norma Técnica L6.350, Cetesb: São Paulo, 15 pp., 1990.
- CHAGAS-SPINELLI, A.C.O.; KATO, M.T.; LIMA, E.S.; GAVAZZA, S. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. **Journal of Environmental Management**, v. 113, p. 510-516, 2012.
- CHAVAN, A.; MUKHERJI, S. Treatment of hydrocarbon-rich wastewater using oil degrading bacteria and phototrophic microorganisms in rotating biological contactor: effect of N:P ratio. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, p. 63-72, 2008.
- CHEN, P.; PICKARD, M.A.; GRAY, M.R. Surfactant inhibition of bacterial growth on solid anthracene. **Biodegradation**, v. 11, p. 341–347, 2000.
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915–936, 2002.
- CHO, J.C.; TIEDJE, J.M. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5448–5456, 2000.
- COIMBRA, C.D.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. **Current Microbiology**, v. 58, p. 245-251, 2009.
- COLORES, G.M.; MACUR, R.E.; WARD, D.M.; INSKEEP, W.P. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2959–2964, 2000.
- COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADAD, R.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, n 41, p. 483-488, 2006.
- COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotenssoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v 28, n. 1, p. 34-38, 2008.
- COSTA, S.G.V.A.O.; SOUZA, S.R.; NITSCHKE, M.; FRANCHETTI, S.M.M.; JAFELICCI JR, M.; LOVAGLIO, R.B.; CONTIERO, J. Wettability of aqueous

rhamnolipids solutions produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 12, p. 125-130, 2009.

CRUZ, J.M.; LOPES, P.R.M.; MONTAGNOLLI, R.N.; TAMADA, I.S.; SILVA, N.M.M.G.; BIDOIA, E.D. Phytotoxicity of soil contaminated with petroleum derivatives and biodiesel. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 8, p. 49-54, 2013a.

CRUZ, J.M.; LOPES, P.R.M.; MONTAGNOLLI, R.N.; TAMADA, I.S.; SILVA, N.M.M.G.; BIDOIA, E.D. Toxicity assessment of contaminated soil using seeds as bioindicators. **Journal of Applied Biotechnology**, v. 1, p. 1-10, 2013b.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1339-1345, 2007.

DAWSON, J.J.C.; GODSIFFE, E.J.; THOMPSON, I.P.; RALEBITSO-SENIOR, T.K.; KILLHAM, K.S.; PATON, G.I. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 164-177, 2007.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DEVELTER, D.W.G.; LAURYSEN, L.M.L. Properties and industrial applications of sophorolipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 628-638, 2010.

DÍAZ-RAMÍREZ, I.J.; ESCALANTE-ESPINOSA, E.; FAVELA-TORRES, E.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; RAMÍREZ-SAAD, H. Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, p. 21-30, 2008.

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

DUMONT, M-J.; NARINE, S.S. Soapstock and deodorizer distillates from North American vegetable oils: Review on their characterization, extraction and utilization. **Food Research International**, v. 40, p. 957-974, 2007.

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

ECHART, C.L.; MOLINA, S.C. Aluminum phytotoxicity: effects, tolerance mechanisms and its genetic control. **Ciencia Rural**, v. 1, n. 3, 2001.

- EDWARDS, K.R.; LEPO, J.E.; LEWIS, M.A. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 1309-1316, 2003.
- EISENTRAEGER, A.; SCHMIDT, M.; MURRENHOFF, H.; DOTT, W.; HAHN, S. Biodegradability testing of synthetic ester lubricants – effects of additives and usage. **Chemosphere**, v. 48, p. 89-96, 2002.
- EL-TARABILY, K.A. Total microbial activity and microbial composition of a mangrove sediment are reduced by oil pollution at a site in the Arabian Gulf. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 176-182, 2002.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil**. 2004. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/>>. Acesso em: 16 mai. 2012.
- FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. **FAOSTAT**. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 27 jun. 2012.
- FELSE, P.A.; SHAH, V.; CHAN, J.; RAO, K.J.; GROSS, R.A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 316-323, 2007.
- FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicology Letters**, v. 140-141, p. 353-365, 2003.
- FERRARI, B.; RADETSKI, C.M.; VEBER, A.M.; FERARD, J.F. Ecotoxicological assessment of solid wastes: a combined liquid and liquid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, p. 1195-1202, 1999.
- FISH, N.M.; ALLENBY, D.J.; LILLY, M.D. Oxidation of n-alkanes: growth of *Pseudomonas putida*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 259–262. 1982
- FIÚZA, A. M. A.; VILA, M. C. C. An insight into soil bioremediation through respirometry. **Environment International**, v. 31, p. 179-183, 2004.
- FORBES, V. E.; FORBES T. L. **Ecotoxicology in Teory and Practice**. Chapman & Hall: London, 247 pp., 1994.
- FOX, S.L.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.
- FOY, C.D.; CHANEL, R.L.; WRITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review Plant Physiology**, v. 29, p. 511-566, 1978.
- FRANZETTI, A.; DI GENNARO, P.; BEVILACQUA, A.; PAPACCHINI, M.; BESTETTI, G. Environmental features of two commercial surfactants widely used in soil remediation. **Chemosphere**, v. 62, p. 1474-1480, 2006.

- FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; SMYTH, T.J.P.; BANAT, I.M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 617-627, 2010.
- FRISCHE, T. Ecotoxicological evaluation of in situ bioremediation of soils contaminated by the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). **Environmental Pollution**, v. 121, p. 103-113, 2003.
- GEORGIU, G.; LIN, S.; SHARMA, M. M. Surface active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65, 1992.
- GLOXHUBER, C. **Anionic surfactants**. In: Biochemistry, Toxicology, Dermatology, Surfactants Science Series, v. 10, Marcel Dekker: New York, 1980.
- GONZÁLEZ, N.; SIMARRO, R.; MOLINA, M.C.; BAUTISTA, L.F.; DELGADO, L.; VILLA, J.A. Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the bacterial community during the process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9438–9446, 2011.
- GÓRNA, H.; ŁAWNICZAK, L.; ZGOŁA-GRZESKOWIAK, A.; KACZOREK, E. Differences and dynamic changes in the cell surface properties of three *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from petroleum-polluted soil as a response to various carbon sources and the external addition of rhamnolipids. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3028-3033, 2011.
- GRAVES A.; LANG C.; LEAVITT M. Respirometric analysis of the biodegradation of organic contaminants in soil and water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28-29, p. 813–26, 1991.
- GUERRA-SANTOS, L.; KAPELLI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p. 302-305, 1984.
- GUMIERE, T. **Biogeografia de comunidades fúngicas em áreas cultivadas com cana-de-açúcar**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências - Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- GUNDERSON, C.A.; KOSTUK, J.M.; GIBSS, M.H.; NAPOLITANO, G.E.; WICKER, L F.; RICHMOND, J.E.; STEWART, A.J. Multispecies toxicity assessment of compost produced in bioremediation of an explosives-contaminated sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 2529-2537, 1997.
- HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.
- HAGNER, M.; PENTTINEN, O.P.; PASANEN, T.; TIILIKKALA, K.; SETÄLÄ, H. Acute toxicity of birch tar oil on aquatic organisms. **Agricultural and Food Science**, v. 19, p. 24-32, 2010.

- HAICHAR, F.Z.; MAROL, C.; BERGE, O.; RANGEL-CASTRO, J.I.; PROSSER, J.I.; BALESDENT, J.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, v. 2, p. 1221-1230, 2008.
- HAMDI, H.; BENZARTI, S.; MANUSADZIANAS, L.; AOYAMA, I.; JEDIDI, N. Solid-phase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarming. **Chemosphere**, v. 70, p. 135-143, 2007.
- HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontological electronica**, v. 4, p. 1-9, 2001.
- HANSON, K.G.; DESAI J.D.; DESAI A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, n. 10, p. 745-748, 1993.
- HARMS, H.; BOSMA, T.N.P. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 97-105, 1997.
- HAUSER, G.; KARNOVSKY, M.L. Rhamnose and rhamnolipid biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 224, p. 91-105, 1957.
- HAZRA, C.; KUNDU, D.; GHOSH, P.; JOSHI, S.; DANDIA, N.; CHAUDHARIA, A. Screening and identification of *Pseudomonas aeruginosa* AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using low-cost agro-based raw materials. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 185-198, 2011.
- HENRY, J.A. Composition and toxicity of petroleum products and their additives. **Human and Experimental Toxicology**, v. 17, n. 2, p. 111-123, 1998.
- HENKEL, M.; MÜLLER, M.M.; KÜGLER, J.H.; LOVAGLIO, R.B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207-1219, 2012.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.
- HILLS, R. G.; TRUCANO, T. G. **Statistical Validation of Engineering and Scientific Models: Background**. Sandia National Laboratories, Califórnia, 1999.
- HISATSUKA, K.; NAKAHARA, T.; SANO, N.; YAMADA, K. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 35, p. 686-692, 1971.

- HORNER-DEVINE, M.C.; LAGE, M.; HUGHES, J.B.; BOHANNAN, B.J.M. A taxa-area relationship for bacteria. **Nature**, v. 432, p. 750–753, 2004.
- HUANG, X.D.; EL-ALAWI, Y.; PENROSE, D.M.; GLICK, B.; GREENBERG, B.M. A multiprocess phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 130, p. 465–476, 2004.
- ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* sp., isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, p. 985–992, 2005.
- IQBAL, S.; KHALI, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 176–179, 1995.
- ITOH, S.; SUZUKI, T. Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, p. 2233–2235, 1972.
- JAIN, D.K.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 87–93, 1992.
- JARVIS, F.G.; JOHNSON, M.J. A glyco-lipid by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, p. 4124–4126, 1949.
- JENSEN, J. Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in the terrestrial environment. **Science of the Total Environment**, v. 226, p. 93–111, 1999.
- JUHASZ, A.; STANLEY, G.A.; BRITZ, M.L. Degradation of high molecular weight PAHs in contaminated soil by a bacterial consortium: effects on Microtox and mutagenicity bioassays. **Bioremediation Journal**, v. 4, p. 271–283, 2000.
- JOHNSEN, A.R.; WICK, L.Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 71–84, 2005.
- KANOKKANTAPONG, V.; KIATKITTIPONG, W.; PANYAPINYOPOL, B.; WONGSUCHOTO, P.; PAVASANT, P. Used lubricating oil management options based on life cycle thinking. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 53, p. 294–299, 2009.
- KAPANEN, A.; ITAVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 1–16, 2001.
- KARHU, M.; KAAKINEN, J.; KUOKKANEN T.; RÄMÖ J. Biodegradation of light fuel oils in water and soil as determined by the manometric respirometric method. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 197, p. 3–14, 2009.

- KEMP, P.F.; ALLER, J.Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, p. 161-177, 2004.
- KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, v. 170, n. 1, p. 75-86, 1995.
- KERNANSHANI, A.; KARARNANEV, D.; MARGARITIS, A. Kinetic modeling of the biodegradation of the aqueous p-xylene in the immobilized soil bioreactor. **Engineering Journal**, v. 27, p. 204–211, 2006.
- KIM, H.K.; LIM, E.J.; LEE, S.O.; LEE, J.D.; LEE, T.H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 249-253, 2000.
- KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.
- KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, p. 1731-1737, 1992.
- KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, p. 295–304, 2001.
- KUBOTA, K.; KOMA, D.; MATSUMIYA, Y.; CHUNG, SY.; KUBO, M. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-Degradation by the 2,6-DCPIP assay. **Biodegradation**, v. 19, p. 749-757, 2008.
- LABOURIAU, L. G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, p. 37-56, 1987.
- LABUD, V.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. **Chemosphere**, v. 66, p. 1863-1871, 2007.
- LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BÜLL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. (eds.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 4, p. 44-84, 2005.
- LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BÜLL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1917, 2006.
- LANE, D.J. **16S/23S rRNA sequencing**. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M., eds., John Wiley and Sons, New York, pp. 115-175. 1991.

- LANG, S.; WAGNER, F. **Structure and properties of biosurfactants**. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. (Eds.), *Biosurfactants and biotechnology*, Marcel Dekker: New York, p. 21-45, 1987.
- LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 22-32, 1999.
- LEBROWSKA, M.; ZBOROWSKA, E.; KARWOWSKA, E.; MIAŚKIEWICZ-PĘSKA, E.; MUSZYŃSKI, A.; TABERNACKA, A.; NAUMCZYK, J.; JĘCZALIK, M. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. **Ecological Engineering**, v. 37, p. 1895–1900, 2011.
- LEE, R.F. Agents which promote and stabilize water-in-oil emulsions. **Spill Science and Technology Bulletin**, v. 5, p. 117–26, 1999.
- LEE, S.H.; OH, B.I.; KIM, J.G. Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2578–2587, 2008.
- LEPS, J.; SMILAUER, P. **Multivariate analysis of ecological data using CANOCO**. United Kingdom: Cambridge University Press, v. 1, 2003.
- LEVISON, M.I. **Surfactant Production: Present Realities and Future Perspectives**. In: ZOLLER, U. (Ed.) *Handbook of Detergents, Part F: Production*. CRC Press: Boca Raton, v. 142, p. 1-38, 2009.
- LIMA, T.M.S.; PROCÓPIO, L.C.; BRANDÃO, F.D.; LEÃO, B.A.; TÓTOLA, M.R.; BORGES, A.C. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2957-2964, 2011.
- LIN, S. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.
- LIU, W.T.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4516-4522, 1997.
- LIU, W.; LUO, Y.; TENG, Y.; LI, Z.; MA, L.Q. Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 32, p. 23-29, 2010.
- LIU, P.W.G.; CHANG, T.C.; WHANG, L.M.; KAO, C.H.; PAN, P.T.; CHENG, S.S. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 1119-1127, 2011.
- LLADÓ, S.; SOLANAS, A.M.; DE LAPUENTE, J.; BORRÀS, M.; VIÑAS, M. A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for

heavy-oil-contaminated soil. **Science of Total Environment**, v. 435-436, p. 262–269, 2012.

LLADÓ, S. GRÀCIA, E.; SOLANAS, A.M.; VIÑAS, M. Fungal and bacterial microbial community assessment during bioremediation assays in an aged creosote-polluted soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v.67, p.114-123, 2013.

LOEHR, R.; WEBSTER, M.T. **Effect of treatment on contaminant availability, mobility, and toxicity**. In: LINZ, G.D.; NAKLES, D. (Eds.), *Environmentally Acceptable Endpoints in Soil: Risk-Based Approach to Contaminated Site Management Based on Availability of Chemicals in Soil*. American Academy of Environmental Engineers: Annapolis, p. 138-386, 1997.

LOIBNER, A.; SZOLAR, O.; BRAUN, R.; HIRMANN, D. **Ecological assessment and toxicity screening in contaminated land analysis**. In: THOMPSON, K.C.; NATHANAIL, C.P. (Eds.), *Chemical Analysis of Contaminated Land*. Blackwell: Oxford, p. 29-267, 2003.

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

LOPES, P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; DOMINGUES, R. F.; BIDOIA, E. D. Toxicity and biodegradation in sandy soil contaminated by lubricant oils. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 454-458, 2010.

LORS, C.; RYNGAERT, A.; PÉRIÉ, F.; DIELS, L.; DAMIDOT, D. Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. **Chemosphere**, v. 81, p. 1263–1271, 2010.

LORS, C.; DAMIDOT, D.; PONGE, J.F.; PÉRIÉ, F. Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales. **Environmental Pollution**, v. 165, p. 11-17, 2012.

LOVAGLIO, R.B.; COSTA, S.G.V.A.O; GONÇALVES, L.A.G.; CONTIERO, J. Effect of C/N ratio and physicochemical conditions on the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Libyan Agriculture Research Center Journal International**, v. 1, n. 2, p. 85-92, 2010.

LOVAGLIO, R.B.; SANTOS, F.J.; JAFELICCI JUNIOR, M.; CONTIERO. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 301–305, 2011a.

LOVAGLIO, R.B. **Produção de ramnolipídios por mutantes de Pseudomonas aeruginosa LBI**. 2011b. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

- GUMIERE, T. **Biogeografia de comunidades fúngicas em áreas cultivadas com cana-de-açúcar**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências - Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- LYCZAK, J.B.; CANNON, C.L.; PIER, G.B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes Infect**, v. 2, p. 1051-1060, 2000.
- MAIER, R.M.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources - A review. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, p. 237-241, 1999.
- MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, p. 2280-2292, 2003.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220, 1967.
- MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558-565, 2012.
- MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere** v. 40, p. 339-346, 2000.
- MARIANO, A.P.; ANGELIS, D.F.; BONOTTO, D.M. Monitoramento de indicadores geoquímicos de biorremediação. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 296-304, 2007.
- MARIANO, A.P.; BONOTTO, D.M.; ANGELIS, D.F.; PIRÔLLO, M.P.S.; CONTIERO, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 133-142, 2008.
- MARECIK, R.; WOJTERA-KWICZOR, J.; ŁAWNICZAK, L.; CYPLIK, P.; SZULC, A.; PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; CHRZANOWSKI, L. Rhamnolipids increase the phytotoxicity of diesel oil towards four common plant species in a terrestrial environment. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 223, p. 4275-4282, 2009.
- MARWOOD, T.; KNOKE, K.; YAU, K.; SUCHORSKI-TREMBLAY, A.; FLEMMING, C.; HODGE, V.; LIU, D.; SEECH, A.; LEE, H.; TREVORS, J. Comparison of toxicity detected by five bioassays during bioremediation of diesel-spiked soils. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 13, p. 117-126, 1998.

- MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS J.; TORRENTS, A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. **Microbiological Research**, v. 155, p. 249-256, 2001.
- MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, p. 13-18, 2011.
- MCCAIG, A.E.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4554-4559, 2001.
- MCKEW, B.A.; COULON, F.; YAKIMOV, M.M.; DENARO, R.; GENOVESE, M.; SMITH, C.J.; OSBORN, A.M.; TIMMIS, K.N.; MCGENITY, T.J.. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1562–1571, 2007.
- MEMBRÉ, J. M.; THURETTE J.; CATTEAU, M. Modeling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v.82, p.345-350, 1996.
- MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A.; ROBERT, M.; ESPUNY, M.J.; DE ANDRES, C.; GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v. 43, p. 1-6, 1993.
- MILLE, G.; GUILIANO, M.; ASIA, L.; MALLERET, L.; JALALUDDIN, N. Sources of hydrocarbons in sediments of the Bay of Fort France (Martinique). **Chemosphere**, v. 64, p. 1062-1073, 2006.
- MILLIOLI, V.S.; SERVULO, E.L.C.; SOBRAL, L.G.S.; CARVALHO, D.D. Bioremediation of crude oilbearing soil: evaluating the effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. **Global NEST Journal**, v. 11, p. 181–188, 2009.
- MISHRA, S.; JYOT, J.; KUHAD, R.C.; LAL, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1675-1681, 2001.
- MOHANTY, S.; MUKHERJI, S. Surfactant aided biodegradation of NAPLs by *Burkholderia multivorans*: Comparison between Triton X-100 and rhamnolipid JBR-515. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.102, p.644– 652, 2013.
- MOLDES, A.B.; TORRADO, A.M.; BARRAL, M.T.; DOMÍNGUEZ, J.M. Evaluation of biosurfactant production from various agricultural residues by *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4481-4486, 2007.
- MOLDES, A.B.; PARADELO, R.; RUBINOS, D.; DEVESA-REY, R.; CRUZ, J.M.; BARRAL, M.T. Ex situ treatment of hydrocarbon-contaminated soil using

biosurfactants from *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 9443–9447, 2011.

MOLINA-BARAHONA, L.; VEGA-LOGO, L.; GUERRERO, M.; RAMERIEZ, S.; ROMERO, I.; VEGA-JARQUIN, C.; ALBORES, A. Ecotoxicological evaluation of diesel contaminated soil before and after a bioremediation process. **Environmental Toxicology**, v. 20, p. 100-109, 2005.

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

MONTAGNOLLI, R. N. **Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 2011. 243 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

MONTAGNOLLI, R.N.; BIDOIA, E.D. **Petroleum derivatives biodegradation: environmental impact and bioremediation strategies**. Amazon, 2012.

MONTEIRO, A.S.; COUTINHO, J.O.P.A.; JÚNIOR, A.C.; ROSA, C.A.; SIQUEIRA, E.P.; SANTOS, V.L. Characterization of new biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA 72 isolated from dairy industry effluents. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, p. 553-563, 2009.

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

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.

MUKHERJEE, A.K.; BORDOLOI, N.K. Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, p. 471-478, 2011.

MÜLLER, M.M.; HÖRMANN, B.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor cultivations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 167–174, 2010.

MÜLLER, M.M.; KÜGLER, J.H.; HENKEL, M.; GERLITZKI, M.; HÖRMANN, B.; PÖHNLEIN, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids—Next generation surfactants? **Journal of Biotechnology**, v.162, p.366–380, 2012.

MULLIGAN, C.N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v 14, p 372-378, 2009.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoreses analysis of polymerase chain

reaction amplified genes encoding for 16s rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 127-141, 1998.

NAKATANI, A. S.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; LAMBAIS, M. R. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de “landfarming” de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1501-1512, 2008.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNANDES, G. D. **Informativo Sementes do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz (ESALQ)**, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 1998.

NAVARRETE, A. A. **Estrutura e diversidade de comunidades microbianas em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental**. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 114 p., 2009.

NIEVAS, M.L.; COMMENDATORE, M.G.; ESTEVES, J.L.; BUCALA, V. Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, p. 96-104, 2008.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agro industrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 81-85, 2004.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005a.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; HADAD, R.; GONÇALVES, L.A.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1562-1566, 2005b.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 621-630, 2011.

NOCENTINI, M.; PINELLI, D.; FAVA, F. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. **Chemosphere**, v. 41, p. 1115-1123, 2000.

- NOGUEZ, A.M.; ARITA, H.T.; ESCALANTE, A.E.; FORNEY, L.J.; GARCÍA-OLIVA, J.; SOUZA, V. Microbial macroecology: highly structure prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. **Global Ecology Biogeography**, v. 14, p. 241-248, 2005.
- NORMAN, R. S.; FRONTERA-SUAU, R.; MORRIS, P. J. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5096–5103, 2002.
- OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. **Terrestrial Plants: Growth Test**. OECD Guidelines for testing of chemicals: Paris, n. 208, 1984.
- OGBO, E.M. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants - *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 250-253, 2009.
- OGBOGHODO, I.A.; IRUAGA, E.K.; OSEMWOTA, I.O.; CHOKOR, J.U. An assessment of the effects of crude oil pollution on soil properties, germination and growth of maize (*Zea mays*) using two crude types-forcados light and escravos light. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 96, p. 143-152, 2004.
- OLIVEIRA, F.J.S.; VAZQUEZ, L.; DE CAMPOS, N.P.; DE FRANÇA, F.P. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 383-389, 2009.
- ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3367-3373, 1997.
- ØVREÅS, L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, v. 3, p. 236-251, 2000.
- OWSIANIAK, M.; CHRZANOWSKI, L.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A.K.; HEIPIEPER, H.J. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1497-1500, 2009.
- PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, v. 9, p. 1-55, 1986.
- PALA, D. M.; CARVALHO, D. D.; PINTO, J. C.; SANT'ANNA, G. L. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.58, p.254–260, 2006.
- PALMROTH, M.R.T.; PICHTTEL, J.; PUHAKKA, J.A. Phytoremediation of sub-arctic soil contamination with diesel fuel. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 221-228, 2002.

- PANTSYRNAYA, T.; BLANCHARD, F.; DELAUNAY, S.; GOERGEN, J.L.; GUÉDON, E.; GUSEVA, E.; BOUDRANT, J. Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media. **Chemosphere**, v. 83, p. 29-33, 2011.
- PARKER, M.A.; SPOERKE, J.M. Geographic structure of lineage associations in a plant–bacterial mutualism. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 11, p. 549–562, 1998.
- PATEL, M.K.; THEISS, A.; WORRELL, E. Surfactant production and use in Germany: Resource requirements and CO₂ emissions. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 25, p. 61-78, 1999.
- PLAZA, G.A.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R.L. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**, v. 59, p. 289-296, 2005.
- PLAZA, G.A.; NALECZ-JAWECKI, G.; PINYAKONG, O.; ILLMER, P.; MARGESIN, R. Ecotoxicological and microbiological characterization of soils from heavy-metal- and hydrocarbon-contaminated sites. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 163, p. 477–488, 2010.
- PERFUMO, A.; RANCICH, I.; BANAT, I.M. **Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry**. In: SEN, R. (Ed.), *Biosurfactants: Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer-Verlag: Berlim, v. 672, p. 135-157, 2010a.
- PERFUMO, A.; SMYTH, T.J.P.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. **Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates**. In: TIMMIS, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer-Verlag: Berlim, p. 1501-1512, 2010b.
- PRINCE, R. C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 19, p. 2514–2522, 1993.
- PRINCZ, J.I.; MOODY, M.; FRASER, C.; VAN DER VLIET, L.; LEMIEUX, H.; SCROOGGINS, R.; SICILIANO, S.D. Evaluation of a new battery of toxicity tests for boreal forest soils: assessment of the impact of hydrocarbons and salts. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n; 4, p. 766-777, 2012.
- PROVIDENTI, M.A.; FLEMING, C.A.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Effect of addition of rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 17, p. 15–26, 1995.
- RAHMAN, K.S.; BANAT, I.M.; THAHIRA, J.; THAYUMANAVAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 81, p.25-32, 2002.
- RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 62, p. 142–160, 2007.

- RAO, C.R. The use and interpretation of principal component analysis in applied research. **Sankhya A**, v. 26, p. 329-358, 1964.
- REILING, H.E.; WYSS, U.T.; SANTOS, L.H.G.; HIRT, R.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 985-989, 1986.
- REZNIK, G.O.; VISHWANATH, P.; PYNN, M.A.; SITNIK, J.M.; TODD, J.J.; WU, J.; JIANG, Y.; KEENAN, B.G.; CASTLE, A.B.; HASKELL, R.F.; SMITH, T.F.; SOMASUNDARAN, P.; JARRELL, K.A. Use of sustainable chemistry to produce and acyl amino acid surfactant. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1387-1397, 2010.
- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 44, p. 93-100, 1999.
- ROCHA, M.V.P.; OLIVEIRA, A.H.S.; SOUZA, M.C.M.; GONÇALVES, L.R. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1295-1299, 2006.
- ROCHA, M.V.P.; BARRETO, R.V.G.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B. Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, p. 366-378, 2009.
- RON, E.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 249–252, 2002.
- ROS, M.; RODRIGUEZ, I.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6916-6923, 2010.
- ROSATO, Y.B. **Biodegradação do Petróleo**. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.), Microbiologia Ambiental. Embrapa-CNPMA: Jaguariúna, cap. 14, p. 307-334, 1997.
- ROSOLEN, V.; HERPIN, U.; FRÄNCLE, S.; BREULMANN, G.; CAMARGO, P. B.; PAGANINI, W. S.; CERRI, C. C.; MELFI, A. J.; MARKERT, B. Land application of wastewater in Brazil – A scientific challenge: Chemical characterization of soil at Populina, São Paulo State. **Journal of Soils and Sediments**, v. 5, p. 112–120, 2005.
- RUST, D. **Surfactants: A Market Opportunity Study Update**. OmniTech International Ltd.: Midland, 2008.
- ROTTHAUWE, J.H.; WITZEL, K.P.; LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4704-4712, 1997.

- SABATÉ, J.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 54, p. 19–25, 2004.
- SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 12, p. 370–375, 1990.
- SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA JR., N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 02, p. 159-166, 2002.
- SASEK, V.; BHATT, M.; CAJHAML, T.; MALACHOVÁ, K.; LEDMICKÁ, D. Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, p. 336-342, 2003.
- SCHEIBEL, J.J. The evolution of anionic surfactant technology to meet the requirements of the laundry detergent industry. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 7, p. 319–328, 2004.
- SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. High performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Chromatography**, v. 693, p. 7-13, 1995.
- SCHMIDT, S. K.; SIMKINS, S.; ALEXANDER, M. Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 2, p.323-331, 1985.
- SCORTICHINI, M.; NATALINI, E.; MARCHESI, U. Evidence for separate origins of the two *Pseudomonas avellanae* lineages. **Plant Pathology**, v. 55, p. 451–457, 2006.
- SEKLEMOVA, E.; PAVLOVA, A.; KOVACHEVA, K. Biostimulation based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. **Biodegradation**, v. 12, p. 311-316, 2001.
- SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 35-52, 2005.
- SHEPPARD, J.D.; MULLIGAN, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 110-116, 1987.
- SHEPPARD, P.; ADETUTU, E.; MAKADIA, T.; BALL, A. Microbial community and ecotoxicity analysis of bioremediated, weathered hydrocarbon-contaminated soil. **Soil Research**, v. 49, p. 261–269, 2011.

- SIDDIQUI, S.; ADAMS, W.A. The fate of diesel hydrocarbons in soils and their effect on the germination of perennial ryegrass. **Environmental Toxicology**, v. 17, p. 49-62, 2002.
- SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30-39, 2009.
- SIMARRO, R.; GONZÁLEZ, N.; BAUTISTA, L.F.; MOLINA, M.C. Assessment of the efficiency of in situ bioremediation techniques in a creosote polluted soil: Change in bacterial community. **Journal of Hazardous Materials**, v. 262, p. 158-167, 2013.
- SINGH, B.K.; MUNRO, S.; REID, E.; ORD, B.; POTTS, J.M.; PATERSON, E.; MILLARD, P. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. **European Journal of Soil Science**, v. 57, p. 72-82, 2006.
- SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-121, 2007.
- SIVIERO, A.R. **Avaliação da biodegradação em solo de resíduos sólidos de fundição - areia fenólica - utilizando o método respirométrico**. 1999. 107 pp. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- SKIPPER, H.D. **Bioremediation of contaminated soils**. In: SYLVIA, D.M. (Ed.), Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall: Upper Saddle River, p. 469-481, 1999.
- SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, J.M. The evaluation of waste surface and ground water quality using *Allium* test procedure. **Mutation Research**, v 38, p. 171-179, 1997.
- SMYTH, T.J.P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Springer-Verlag: Berlim, p. 3705-3723, 2010.
- SOBERÓN-CHÁVEZ, G. **Biosynthesis of rhamnolipids**. In: RAMOS, J-L. (Ed.), Pseudomonas. Biosynthesis of macromolecules and molecular metabolism. Kluwer/Plenum: New York, p. 173-189, 2004.
- SOBRINHO, H.B.S.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SALGUEIRO, A.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LEITE, L.F.C.; SARUBBO, L.A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 912-917, 2008.
- SOUZA, P.M.S.; CORROQUÉ, N.A.; MORALES, A.R.; MARIN-MORALES, M.A.; MEI, L.H.I. PLA and organoclays nanocomposites: degradation process and evaluation of ecotoxicity using *Allium cepa* as test organism. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, p. 1052-1063, 2013.

- STALLWOOD, B.; SHEARS, J.; WILLIAMS, P. A.; HUGHES, K. A. Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 794–802, 2005.
- STELIGA, T.; JAKUBOWICZ, P.; KAPUSTA, P. Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 1–10, 2012.
- SUN, G.D.; XU, Y.; JIN, J.H.; ZHONG, Z.P.; LIU, Y.; LIU, Z.P. Pilot scale ex-situ bioremediation of heavily PAHs-contaminated soil by indigenous microorganisms and bioaugmentation by a PAHs-degrading and bioemulsifier-producing strain. **Journal of Hazardous Materials**, v. 233–234, p. 72–78, 2012.
- SYLDATK, C.; LANG, S.; MATULOVIC, U.; WAGNER, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. **Zeitschrift fur Naturforschung Section C: Biosciences**, v. 40, p. 61–67, 1985.
- SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of biosurfactants. **Biosurfactants and Biotechnology**, v. 25, p. 89–120, 1987.
- SZULC, A.; AMBROZEWICZ, D.; SYDOW, M.; LAWNICZAC, L.; PIOTROWSKA0CYPLIK, A.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. **Journal of Environmental Management**, v. 132, p. 121–128, 2014.
- TACCARI, M.; MILANOVIC, V.; COMITINI, F.; CASUCCI, C.; CIANI, M. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 66, p. 39–46, 2012.
- TAMADA, I.S.; LOPES, P.R.M.; MONTAGNOLLI, R.N.; BIDOIA, E.D. Biodegradation and toxicological evaluation of lubricant oils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, p. 951–956, 2012a.
- TAMADA, I.S.; MONTAGNOLLI, R.N.; LOPES, P.R.M.; BIDOIA, E.D. Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 43, n. 4, p. 1576–1581, 2012b.
- TANG, J.; WANG, M.; WANG, F.; SUN, Q.; ZHOU, Q. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 5, p. 845–851, 2011.
- THANOMSUB, B.; PUMEECHOCKCHAI, W.; LIMTRAKUL, A.; ARUNRATTIYAKORN, P.; PETCHLEELAHA, W.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1149–1153, 2007.

- THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I.M. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 917-925, 2008.
- THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I.M. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3366-3372, 2011.
- THERON, J.; CLOETE, E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 37-57, 2000.
- THOMPSON, I.P.; VAN DER GAST, C.J.; CIRIC, L.; SINGER, A.C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 909-915, 2005.
- TIEHM, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 258-263, 1994.
- TIQUIA, S.M.; TAM, N.F.Y.; HODGKISS, I.J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, v. 93, n. 3, p. 249-256, 1996.
- TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A.; ØVREÅS, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, v. 64, p. 53-62, 1998.
- TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Micro-organismos e processos microbiológicos como indicadores de qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V.; COSTA, L.M. (eds.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 2, p. 195-276, 2002.
- UDIWAL, K.H.; PATEL, V.M. Restoration of oil contaminated soil by bioremediation for ground water management and environment protection. **International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical Research** 1. p. 17-26, 2010.
- URUM, K.; PEKDEMIR, T.; GOPUR, M. Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 81, p. 203-209, 2003.
- VAN BOGAERT, I.; SAERENS, K.; DE MUYNCK, C.; DEVELTER, D.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 23-34, 2007.
- VAN HAMME, J.D.; ODUMERU, J.A.; WARD, O.P. Community dynamics of a mixed-bacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 441-450, 2000.

- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604-620, 2006.
- VATER, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 72, p. 12-18, 1986.
- VENKATESWARAN, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 767-775, 1995.
- VENTURA-CAMARGO, B.C.; PARISE-MALTEMPI, P.P.; MARIN-MORALES, M.A. The use of the cytogenetic to identify mechanisms of action of an azo dye in *Allium cepa* meristematic cells. **Journal of Environmental and Analytical Toxicology**, v. 1, p. 1-12, 2011.
- VOLKERING, F.; BREURE, A.M.; RULKENS, W.H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. **Biodegradation**, v. 8, p.401-417, 1998.
- XU, Q.; NAKAJIMA, M.; LIU, Z.; SHIINA, T. **Soybean-based surfactants and their applications**. In: NG, T.B. (Ed.) Soybean - Applications and Technology. InTech Press: Rijeka-Croatia, p. 341-364, 2011.
- ZHANG, Y.; MILLER, R.M. Enhancement of octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3276-3282, 1992.
- WANG, W. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 6, p. 409-414, 1987.
- WANG, Z.; FINGAS, M.F. Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. **Marine Pollution Bulletin**, v. 47, p. 423-452, 2003.
- WANG, X.; GONG, L.; LIANG, S.; HAN, X.; ZHU, C.; LI, Y. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 4, p. 433-443, 2005.
- WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5261-5267, 2007.
- WEI, Y.H.; CHOU, C.L.; CHANG, J.S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 2,p. 146-154, 2005.
- WEIS, J.H.; TAN, S.S.; MARTIN, B.K.; WITTEWER, C.T. Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. **Trends in Genetics**, v. 8, p. 263-264, 1992.
- WEN, J.; MCLAUGHLIN, M.J.; STACEY, S.P.; KIRBY, J.K. Is rhamnolipid biosurfactant useful in cadmium phytoextraction? **Journal of Soils and Sediments**, v. 10, p. 1289-1299, 2010.

- WHANG, L.M.; LIU, P.W.G.; MA, C.C.; CHENG, S.S. Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation-Effects of pH and ammonium addition. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, p. 1045-1050, 2008.
- WU, Y.; CHIANG, C.; LU, C. Respirometric evaluation by graphical analysis for microbial systems. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 92, p. 137-152, 2004.
- WYRWAS, B.; CHRZANOWSKI, L.; LAWNICZAK, L.; SZULC, A.; CYPLIK, P.; BIAŁAS, W.; SZYMANSKI, A. HOŁDERNA-ODACHOWSKA, A. Utilization of Triton X-100 and polyethylene glycols during surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel. **Journal of Hazardous Materials**, v. 197, p. 97-103, 2011.
- YIN, H.; QIANG, J.; JIA, Y.; YE, J.; PENG, H.; QIN, H.; ZHANG, N.; HE, B. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 302-308, 2009.
- YU, H.; ZHU, L.; ZHOU, W. Enhanced desorption and biodegradation of phenanthrene in soil-water systems with the presence of anionic-nonionic mixed surfactants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 142, p. 54-361, 2007.
- ZAJIC, J. E.; SEFFENS, W. **Biosurfactants**. CRC Critical Reviews in Biotechnology, v. 1, n. 2, p. 87-107, 1984.
- ZHOU, J.; XIA, B.; HUANG, H.; PALUMBO, A.V.; TIEDJE, J.M. Microbial diversity and heterogeneity in Sandy subsurface soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1723-1734, 2004.
- ZOBELL, C.E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacteriological Reviews**, v. 10, n. 1-2, p. 1-49, 1946.

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM
ÓLEO LUBRIFICANTE PELA APLICAÇÃO DE
DIFERENTES SOLUÇÕES DE SURFACTANTE
QUÍMICO E BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR
Pseudomonas aeruginosa LBI**

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Co-Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Aluno: Paulo Renato Matos Lopes

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Março/2014