



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Thiago Gonçalves Cavalcanti

**ISOLAMENTO E UTILIZAÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* NA
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS**

JOÃO PESSOA

2017

Thiago Gonçalves Cavalcanti

**ISOLAMENTO E UTILIZAÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* NA
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito para obtenção do título de Biotecnologista.

Orientadores:

Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

Rafael de Almeida Travassos

JOÃO PESSOA/PB

2017

Catálogo na publicação
Biblioteca Setorial do CCEN/UFPB
Josélia M.O. Silva – CRB-15/113

- C377i Cavalcanti, Thiago Gonçalves.
Isolamento e utilização de pseudomonas aeruginosa na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos / Thiago Gonçalves Cavalcanti. – João Pessoa, 2017.
55 p. : il. color.
- Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba.
Orientador(a): Profº. Drº. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.
Coorientador(a): Profº Dr. Rafael de Almeida Travassos
1. Métodos biológicos. 2. Pseudomonadaceae. 3. Biorremediação.
4. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 5. Cossustrato. I. Título.

Thiago Gonçalves Cavalcanti

**ISOLAMENTO E UTILIZAÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* NA
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: 02 de junho de 2017

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (DB/CBiotec/UFPB)

(Orientador)



Prof.ª Dr.ª Sharline Florentino de Melo Santos (DEQ/CT/UFPB)

(Examinadora)



MSc. Ana Caroline de Liam Silva (PPgPNSB/CCS/UFPB)

(Examinadora)

“Sabemos mais sobre o movimento dos corpos celestes
do que o solo sob os nossos pés.”

Leonardo Da Vinci (1452 – 1519)

Dedico este trabalho à minha família, por todo apoio, carinho e presença em toda minha jornada na graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ednaldo Braga Cavalcanti e Mônica Gonçalves Cavalcanti por terem permitido que eu tivesse a oportunidade de ingressar em uma Universidade Federal, e por ter tido o luxo de ter apenas os estudos como atividade principal além de sempre me apoiarem e incentivarem em minhas decisões, além de terem me educado da melhor forma possível.

Ao meu irmão Ednaldo Braga Cavalcanti Filho, pela irmandade, cumplicidade, apoio e companheirismo.

A Natiany Kerulene Rodrigues Lé, pelo apoio, companheirismo e paciência durante toda a graduação.

Aos meus amigos, que compartilharam e também auxiliaram direta e indiretamente este trabalho.

Aos meus professores do Centro de Biotecnologia, que foram de fundamental importância para minha formação profissional.

Em especial aos meus professores Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes e Kristerson Reinaldo de Luna Freire, que me acompanharam por toda minha graduação, aos quais agradeço imensamente pelos ensinamentos, amadurecimento e auxílio na tomada de decisões, assim como a amizade conquistada durante todo esse período.

Pela realização deste trabalho, agradeço imensamente:

À meu orientador, professor Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes pela oportunidade e por toda atenção dedicada a me orientar e apoiar durante o TCC.

Ao meu coorientador, professor Rafael de Almeida Travassos, pela oportunidade e atenção durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Ian Porto Gurgel do Amaral pela revisão dos textos em língua inglesa referentes a este trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de microbiologia ambiental (LAMA), pelo auxílio durante os experimentos.

À minha banca avaliadora, Ester Ribeiro Gouveia e Sharline Florentino de Melo Santos, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

À Embrapa algodão pelo fornecimento da torta.

À Universidade Federal da Paraíba, pela oportunidade da formação acadêmica.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas dos 16 HPAs prioritários da USEPA.....	13
Figura 2 – Passos da biossíntese de piocianina (adaptado de MAVRODI et al., 2001).....	17
Figura 3 – Pontos considerados para coleta das amostras de solo nos postos de gasolina: área central próxima às bombas (A) e entorno (B).	23
Figura 4 – Reator do experimento de biorremediação. O recipiente no interior foi empregado no ensaio de respiração microbiana.....	29
Figura 5 – Quantificação das bactérias heterotróficas cultiváveis	37
Figura 6 – Estimativa de carbono mineralizado por meio da respiração microbiana.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização do solo empregado nos experimentos de biodegradação	20
Tabela 2 – Propriedades do óleo lubrificante empregado nos ensaios	22
Tabela 3 – Caracterização química da torta de amendoim	22
Tabela 4 – Origem das linhagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizadas neste estudo	23
Tabela 5 – Características das sementes no teste de seleção de plantas	27
Tabela 6 – Condições dos reatores para na remoção de fenantreno e pireno no solo empregando a associação do bioaumento com o bioestímulo*	29
Tabela 7 – Média do diâmetro dos halos de inibição (mm) formados pelos isolados. O resultado expressa a repetição em pelo menos duas vezes no teste de atividade antimicrobiana*	33
Tabela 8 – Fonte de PAH preferencial e média da degradação do fenantreno e pireno pelos diferentes consórcios e resíduos agropastoris*	34
Tabela 9 – Índice de germinação das sementes expostas a diferentes concentrações de petroderivados	35
Tabela 10 – Índice de germinação (%) das sementes antes e após a biorremediação	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRA	Capacidade de retenção de água
FEN	Fenantreno
FTB	Fotoblastismo
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPA-AMM	Hidrocarboneto policíclico aromático de alta massa molecular
HPA-BMM	Hidrocarboneto policíclico aromático de baixa massa molecular
I _G	Índice de germinação
MM	Meio mineral mínimo
PIR	Pireno
TPH	<i>Total petroleum hydrocarbons</i> (hidrocarbonetos totais do petróleo)
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFC/g	Unidades formadoras de colônia por grama
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro

Observação: as abreviaturas, siglas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
3.1 O petróleo e derivados	13
3.2 A biorremediação de solos.....	14
3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
3.4 Resíduos como cossustratos.....	18
3.5 Ensaio de ecotoxicidade empregando sementes.....	19
4 METODOLOGIA.....	20
4.1 Solo, contaminante e cossustrato	20
4.1.1 Solo	20
4.1.2 Contaminante	21
4.1.3 Cossustrato.....	22
4.2 Microrganismos: isolamento, identificação e aclimação	23
4.3 Teste de antagonismo e confecção de consórcio	25
4.4 Seleção de plantas e ensaio de ecotoxicidade	26
4.5 Ensaio de degradação de HPA.....	28
4.6 Ensaio microbiológicos	30
4.7 Monitoramento.....	31
4.8 Tratamento estatístico	31
5 RESULTADOS	32
5.1 O solo.....	32
5.2 Linhagens microbianas	32
5.3 Hidrocarbonetos do petróleo.....	32
5.4 Confecção dos consórcios.....	33
5.5 Remoção do fenantreno e pireno pelos consórcios.....	33
5.6 Seleção das sementes	34
5.7 Ensaio de ecotoxicidade	36
5.8 Quantificações microbianas	36

6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE A – PRODUÇÃO GERADA POR ESTA PESQUISA	53

RESUMO

A associação entre bioaumento e bioestímulo é considerada uma das estratégias mais eficazes na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). A confecção de consórcios permite aumentar a densidade microbiana, quando o número de microrganismos na área impactada não é suficiente para manter a degradação de forma eficiente enquanto a adição de fontes nutricionais alternativas estimulam a microbiota, quando a relação C:N:P se encontra prejudicada. Este trabalho teve por objetivo isolar bactérias Gram-negativas não fermentadoras de ambientes hostis para serem aplicadas na forma de consórcio e estimuladas pela adição de resíduo de processamento do amendoim, na remoção de fenantreno e pireno de um solo arenoso contaminado com uma mistura de óleo lubrificante contendo aproximadamente 50 mg/Kg dos HPAs. Objetivou-se também identificar sementes para avaliar a fertilidade do solo após a biorremediação. De um total de 7 isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, três foram consorciadas e testadas empregando a adição da torta de amendoim. Os ensaios de biodegradação ocorreram em reatores de polietileno preenchidos com 200g de solo e 20 ou 40 mg/Kg da torta de amendoim. Após 60 dias sob incubação à temperaturas ambiente, os percentuais de remoção obtidos no fenantreno e pireno foram entre 76,9 e 80,4%, com degradação preferencial do consórcio pelo pireno. A adição da torta aumentou significativamente a remoção dos contaminantes. Entretanto, em todos os casos, a melhor condição do processo ocorreu quando os menores teores da torta foram adicionados, independentemente do teor presente do contaminante (40 ou 80 mg/Kg), ressaltando a importância do reuso de resíduos agropastoris na função de adjuvantes da biorremediação. Aleatoriamente escolhidas, sementes de milho, mostarda e maxixe-do-norte apresentaram os melhores resultados na avaliação da fertilidade do solo após a biorremediação.

Palavras-chave: Biorremediação. Bioaumento. Bioestímulo. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. Cossustrato.

ABSTRACT

The association between bioremediation and biostimulation is considered one of the most effective strategy in the bioremediation of soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The consortia allow the increase of microbial density when the number of microorganisms in the impacted area is not sufficient to maintain degradation efficiently while the addition of alternative nutritional sources stimulate the microbiota when the C: N: P ratio is impaired. This work aimed to isolate non-fermenting Gram-negative bacteria from hostile environments and to investigate the effects of the addition of peanut cake in the removal of phenanthrene and pyrene from a lubricating oil-contaminated soil containing approximately 50 mg/Kg of PAHs. We also aimed to identify plants seeds for ecotoxicity assays to evaluate soil fertility after bioremediation. From seven *Pseudomonas aeruginosa* strains three were selected and tested using the addition of peanut cake. The biodegradation tests occurred in polyethylene reactors filled with 200g of soil and 20 or 40 mg/Kg of peanut cake. After 60 days at room temperature, the removal percentages obtained in phenanthrene and pyrene were between 76.9 and 80.4%, with preferential degradation of pyrene by the consortium. Addition of peanut cake significantly improved the removal of contaminants. However, in all cases, the best condition of the process occurred when the lowest contents of the cake were added, independently of the contaminant content (40 or 80 ml/Kg), emphasizing the importance of the reuse of agro-industrial waste in the function of bioremediation adjuvants. Randomly chosen, corn, mustard and cackrey seeds showed the best results in evaluating soil fertility after bioremediation.

Keywords: Bioremediation. Bioaugmentation. Biostimulation. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Cosubstrate.

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 70% da descarga de contaminantes na natureza, de origem antropogênica, são representados por hidrocarbonetos do petróleo. A natureza recalcitrante da maioria destes compostos, especialmente os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), promove impactos significativos no solo, cuja microbiota presente representa a chave para a recuperação da área contaminada. Estes compostos estão classificados em dois grupos, HPAs de baixa massa molecular, quando possuem dois ou três anéis condensados e HPAs de alta massa molecular, contendo 4 ou mais anéis, conferindo natureza persistente para estas moléculas (WILKE et al., 2007; LEE et al., 2008).

Baseado nesta premissa, a biorremediação é um processo que visa acelerar a taxa de degradação dos HPAs no solo e das diferentes metodologias possíveis no processo, duas estratégias são mais empregadas: bioaumento e bioestímulo. A combinação das duas técnicas possibilita a interação maior entre a microbiota, favorecendo a cooperação metabólica e relações de cometabolismo (HAMDI et al. 2007; NIKOLOPOULOU; KALOGERAKES, 2008).

Partindo deste princípio, a adição de pequenas quantidades de cossustratos ao solo contaminado pode contribuir para o aumento da velocidade de biodegradação de compostos persistentes, sem causar efeitos adversos significativos, particularmente relacionados às impurezas presentes. Diferentes classes de moléculas podem ser utilizadas com este propósito, dentre elas, ressalta-se o potencial dos subprodutos de processos do setor agroindustrial, em função da grande disponibilidade, servindo como fonte preferencial de carbono para síntese de moléculas importantes ao processo, tema recente e ainda pouco explorado (NASCIMENTO; OLIVEIRA; FRANÇA, 2013; VASCONCELOS; OLIVEIRA; FRANÇA, 2013).

Historicamente, a maioria dos coprodutos de processos agroindustriais é descartada, por muito deles serem considerados resíduos. Neste contexto, uma destinação mais nobre em detrimento ao descarte, implica de forma positiva para a valorização do produto, atribuindo funcionalidade e contribuindo para a solução de duas questões ambientais importantes do século XXI: a eliminação de contaminantes e o reuso de coprodutos industriais (XUE; LANDIS, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Remover fenantreno e pireno de um solo arenoso empregando estratégias de biorremediação por meio da associação de um consórcio composto por três linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* e adição de torta de amendoim na função de cossubstrato.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Isolar linhagens hidrocarbonoclásticas de *P. aeruginosa* de áreas impactadas;
- ❖ Selecionar linhagens bacterianas com potencial biorremediador;
- ❖ Determinar as interações ecológicas negativas entre os isolados;
- ❖ Obter diferentes consórcios bacterianos baseados em estudos de antibiose;
- ❖ Selecionar sementes para testes de ecotoxicidade em solos contaminados por petroderivados;
- ❖ Avaliar a fitotoxicidade dos contaminantes e seus metabólitos, antes e após o tratamento microbiológico.

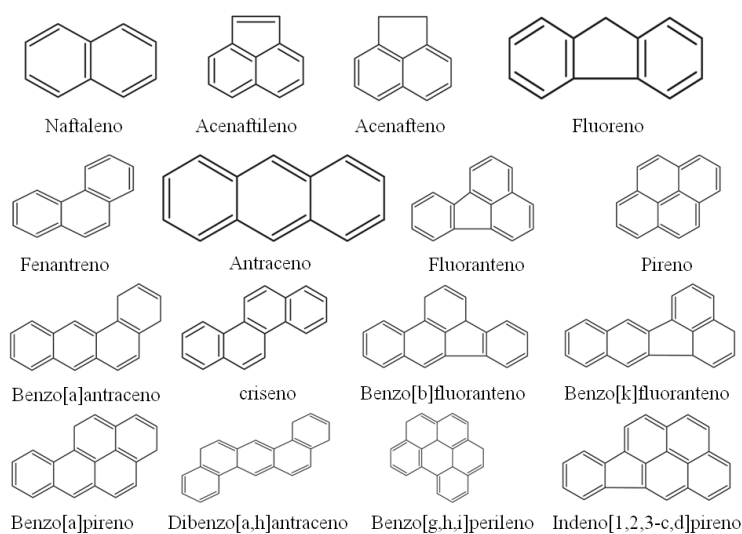
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 O petróleo e derivados

O petróleo compreende uma mistura tóxica de hidrocarbonetos, lineares, ramificados e aromáticos, originada naturalmente a partir da conversão anaeróbica de matéria orgânica, depositada em sedimentos de baixa permeabilidade, em condições específicas de pressão e temperatura (MOHAMED et al. 2006; WILCKE, 2007). O óleo cru sofre diferentes tratamentos e a partir do seu refino, diversos derivados são obtidos. A exploração comercial do produto, iniciada nos Estados Unidos em meados do século XIX, constituiu um dos maiores pilares da atividade humana em toda sua história, garantindo benefícios significativos para a sociedade, dentre os principais a melhoria na qualidade de vida (CHEREMISINOFF; ROSENFELD, 2009).

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) compõem uma importante classe de moléculas mutagênicas e carcinogênicas, formadas pela combustão incompleta de substâncias orgânicas, porém a maior porção encontrada na natureza é derivada dos processos que envolvem o óleo, isto é, do refino à queima (MUCKIAN et al. 2007). A agência ambiental estadunidense (USEPA) lista dezesseis HPAs prioritários (Figura 1) por serem compostos representativos da classe, em termos de toxicidade, apresentando riscos para a saúde humana e ambiental (RAVINDRA; SOKHI; VAN GRIEKEN, 2008).

Figura 1 – Estruturas químicas dos 16 HPAs prioritários da USEPA



Fonte: Vasconcelos (2011)

Os HPAs são classificados em dois grupos de acordo com o número de anéis: de baixa massa molecular (HPA-BMM), dotados de dois ou três anéis e de alta massa molecular (HPA-AMM), com quatro ou mais anéis (DAUGULIS; McCracken, 2003). O arranjo e algumas propriedades físico-químicas, tais como baixa solubilidade e estabilidade molecular, permitem que estes compostos se liguem fortemente aos agregados do solo, impedindo o acesso microbiano, dificultando sua degradação, sendo assim, classificados como compostos de persistentes a recalcitrantes (KANALY; HARAYAMA, 2000; GONG et al. 2007; JACQUES et al. 2008).

O Ministério da Habitação, Planejamento e Meio Ambiente holandês considera a soma da concentração de 10 HPAs padrões em duas categorias distintas (naftaleno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno, benzo[k]fluoranteno e indeno[1,2,3-c,d]pireno). Os valores de referência, isto é, o padrão natural no solo, é 1 mg/Kg e não representa risco à saúde ambiental. Por outro lado, a partir de 40 mg/Kg, considera-se valor de intervenção, necessitando imediata ação de estratégias visando a remediação da área impactada (NEDERLAND, 2006).

3.2 A biorremediação de solos

Entende-se por biorremediação o processo cujo objetivo é acelerar a taxa de biodegradação de um grande número de contaminantes, permitindo a recuperação do solo em um curto espaço de tempo. Em complemento, a biorremediação consiste uma alternativa atraente e de baixo custo e se fundamenta no estímulo da atividade metabólica microbiana para a conversão dos xenobióticos em metabólitos não ou menos tóxicos e biomassa (CHAÎNEAU et al. 2005).

Dentre as maiores vantagens da biorremediação de solos contaminados por óleo destacam-se: o custo, a possibilidade de aplicação em conjunto a outros métodos de remoção e a aceitação pública. Por outro lado, o acúmulo de metabólitos tóxicos se caracteriza como a principal desvantagem do processo (CHAILLAN et al. 2004). As principais estratégias de biorremediação envolvem: 1- o bioestímulo, quando a relação C:N:P se encontra prejudicada e a microbiota são oferecidos fertilizantes e/ou fontes adicionais de carbono melhor assimiláveis; ou 2- o bioaumento, quando a densidade microbiana não é suficiente para manter a degradação de forma eficiente, uma vez que se encontra inibida, em razão da concentração e natureza do contaminante e seus

metabólitos (VASCONCELOS, 2011). Essas técnicas estão associadas com diferentes estratégias microbianas, tais como a síntese de moléculas com propriedades tensoativas, pelas quais auxiliam a remoção dos contaminantes do solo. É importante destacar que as interações ecológicas positivas entre diferentes grupos microbianos potencializam o bioprocessamento como um todo (JACQUES et al. 2007; SENEVIRATNE et al. 2008).

De modo geral, consórcios microbianos são bastante aplicados na biorremediação, cuja maior vantagem se atribui à cooperação metabólica e ao cometabolismo. No entanto, a literatura sugere que a associação das técnicas de bioaumento e bioestímulo seria uma alternativa mais interessante, dadas as vantagens que este tipo de combinação pode trazer para a biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos (HAMDI et al. 2007, NIKOLOPOULOU; PASADAKIS; KALOGERAKIS, 2007).

No contexto da remoção de hidrocarbonetos do petróleo no solo, os principais fatores envolvidos são: a temperatura na faixa de mesofilia, o pH entre 7,4-7,8, a umidade entre 15-20% ou 60-70% da capacidade de retenção do solo, o revolvimento constante do solo e as concentrações de nitrogênio e fósforo necessárias para aumento da biomassa (VASCONCELOS, 2011).

3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa (SCHROETER, 1872; MIGULA, 1894; 1900 *apud* SHORTER BERGEY'S MANUAL, 1994) é um bacilo ubíquo, Gram-negativo, aeróbio e monotríquico, tendo faixa de temperatura de crescimento estabelecidas entre 25-42°C e a água doce e fresca como habitat preferencial. No entanto a bactéria já foi isolada de diferentes ambientes, incluindo solo (CHAUAN et al., 2008), plantas (ZAGO et al., 2001), alimentos (TSORAEVA; MARTINEZ, 2000), fezes (DUBOIS, 2001), rizosfera (PIRNAY et al., 2002), piscinas (BORGMANN-STRAHSEN, 2003), saunas (McNEIL, 2003), aquíferos sob cemitérios (ESPÍNDOLA, 2004), água destilada para diluir drogas administradas por via intravenosa e água mineral engarrafada (LEGANI et al., 1999), dentre outros.

Uma das características mais marcantes da bactéria, desenvolvida em meios de cultura é o odor adocicado semelhante à uva, relacionado à produção de 2-aminoacetofenona, composto também presente na fruta (SCOTT-THOMAZ, 2010). Entretanto, os maiores reconhecimentos da espécie são atribuídos à versatilidade

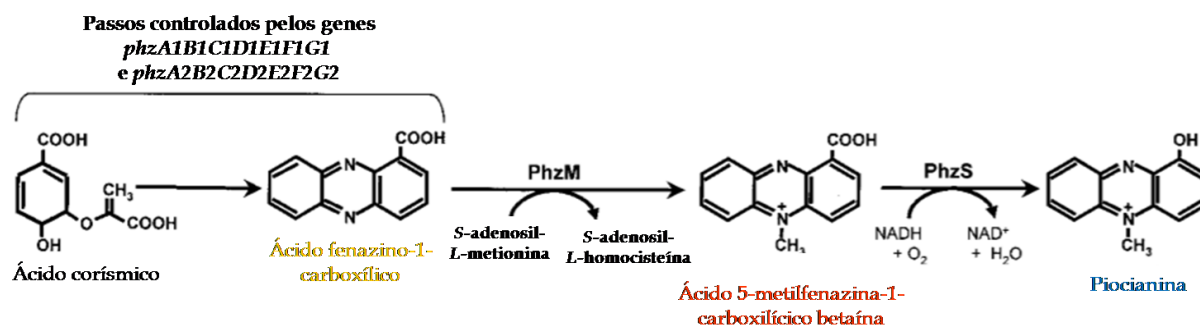
metabólica e à produção de pigmentos. Suas melhores estratégias são a capacidade de metabolizar, independente do suprimento de nutrientes, bem como possuir um poderoso arsenal de estratégias de sobrevivência, por exemplo, pigmentos e produção de biofilme (DE VOS et al., 1997).

As pressões seletivas exercidas pelo ambiente, tais como hospitais e áreas impactadas por xenobióticos (aquelas que recebem rejeitos domésticos ou efluentes de fábricas de têxteis e celulose, as refinarias de petróleo e os postos de gasolina, dentre outros), promovem alterações em nível molecular, resultando em tolerância, resistência e multirresistência a antibióticos, degermantes, metais pesados, altas concentrações de sais e uma miríade de diferentes moléculas tóxicas a outros microrganismos (CHIKERE et al, 2011). Mesmo tida como modelo de bactéria oportunista, acredita-se que todas as propriedades que fazem a bactéria persistir em ambientes hostis são fatores de seleção natural e não necessariamente fatores de virulência, tornando *P. aeruginosa* um dos organismos mais adaptáveis conhecidos (ALONSO et al., 1999).

A versatilidade nutricional e metabólica é garantida por um genoma com tamanho de 6,3 Mpb, permitindo ser cultivada em meios desprovidos de fatores de crescimento e utilizar mais de 90 moléculas como fonte de carbono e energia e conferindo vantagens seletivas à *P. aeruginosa* sob condições desfavoráveis para outros microrganismos (SCOTT-THOMAZ, 2010). Neste contexto, a habilidade de transformar moléculas orgânicas em biomassa e energia faz da bactéria um excelente agente de biorremediação (ALEXANDER, 1999).

A espécie sintetiza ao menos seis diferentes pigmentos: fluoresceína (amarelo-esverdeado) e pioverdina (verde), fluorescentes e com função de sideróforos (LEISINGER; MARGRAFF, 1979; DAS; MA, 2013), piorrubina A e B (vermelho-ferrugem) e piomielina (marrom-clara), possivelmente sintetizadas nos eventos contra estresses oxidativos (FERGUSON et al., 2007; ABU et al., 2013) e finalmente piocianina (azul ou azul-esverdeado), pigmento fenazínico fluorescente, cujo mecanismo parece envolver participação na redução do íon Fe^{3+} , visto que o metal é um fator de crescimento crucial para a bactéria (JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2014).

A piocianina foi o primeiro composto fenazínico natural descrito e é formada por duas subunidades de N-metil-1-hidroxifenazina. O pigmento é sintetizado exclusivamente por 90-95% das linhagens de *P. aeruginosa* em concentrações que podem variar de 0,31 a 80 $\mu\text{g/mL}$ (EL-SHOUNY; AL-BAIDANI; HAMZA, 2011; HASSANI et al., 2012). A Figura 2 ilustra a biossíntese de piocianina.

Figura 2 – Passos da biossíntese de piocianina (adaptado de MAVRODI et al., 2001)

Uma combinação de aminoácidos utilizados em conjunto com o glicerol, assim como os íons Mg²⁺, SO₄²⁻, K⁺, PO₄³⁻ e Fe²⁺ são essenciais para a produção do pigmento (INGLEDEW; CAMPBELL, 1969). A molécula precursora, ácido corísmico, é derivada da via do ácido chiquímico. A conversão do ácido corísmico em ácido fenazino-1-carboxílico (PCA, de cor amarela) é controlado por sete genes codificados por dois operons. Em seguida, dois passos são sugeridos para a síntese de piocianina, regulados por outros dois genes, *phzM* e *phzS*, a partir do PCA. No primeiro é formado o ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína (de cor vermelha), catalizado pela metiltransferase fenazina-específica (PhzM), uma S-adenosilmetionina transferase metil-dependente. Já o segundo passo é catalisado pela mono-oxigenase flavina dependente (PhzS), envolvendo a hidroxilação da betaína do ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína em 1-hidróxi-5-metil fenazina, isto é, piocianina, de cor azul brilhante (MAVRODI et al., 2001; JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2014).

A síntese de piocianina é mediada pelo fenômeno de *quorum-sensing*, processo dependente da densidade celular, regulado pela secreção e assimilação de moléculas denominadas por autoindutores. Há relatos de que o pigmento por vezes também pode assumir este papel. Das e Ma (2013) discutiram a participação da piocianina como um autoindutor durante a síntese de biossurfactantes e em seu estudo, observaram índices de emulsificação de três petroderivados entre 60-75 e 25-40%, quando foram sintetizados, respectivamente, 10,89 e 4,81 µg/mL do pigmento, quando 10 vezes menos biossurfactante foi produzido, comparada à primeira linhagem.

3.4 Resíduos como cossustratos

A natureza persistente dos HPAs dificulta sua remoção no solo, e o estímulo da microbiota é uma das estratégias de biorremediação mais aplicadas. A suplementação do meio com fontes de carbono mais assimiláveis configura uma opção de baixo custo, uma vez que a disponibilidade de grandes quantidades de cossustratos pode promover o acesso da microbiota aos hidrocarbonetos, resultado de vários eventos metabólicos microbianos, tais como síntese de compostos tensoativos, moléculas empregadas na comunicação celular e indução de tolerância da microbiota aos compostos tóxicos presentes (ORTIZ; VELASCO; ROVAH, 2006; LEE et al., 2007).

O acesso da microbiota ao contaminante, aliado ao aumento da biomassa refletem no aumento da taxa de sua transformação. Neste contexto, o cometabolismo é a via metabólica preferencial durante a degradação microbiana dos HPAs em solo e a concentração do cossustrato está envolvida diretamente com os efeitos sinérgicos ou antagonísticos ao processo (BAGGI, 2000).

Diferentes substâncias podem ser empregadas como cossustratos, por exemplo glicerol (CHEN; CHEN; CHANG, 2007) e óleo de amendoim (MAO et al., 2013). Entretanto, como desvantagens do seu uso estão a competição com as indústrias de alimentos e farmacêutica. Assim, a introdução de resíduos de processos industriais, sem que haja necessidade de tratamentos prévios, agrega valor e garante sustentabilidade e uma destinação mais nobre ao material (VASCONCELOS, 2011).

Diferentes resíduos industriais se mostraram eficazes como adjuvantes do processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo, contribuindo para a remoção de mais de 85% do TPH e HPAs, ao exemplo do glicerol bruto, coproduto da produção do biodiesel (NASCIMENTO; OLIVEIRA; FRANÇA, 2013), ou do lodo e esterco de vaca (AGAMUTHU; TAN; FAUZIAH, 2013). Ressalta-se que particularmente os resíduos agropastoris são bons promissores porque representam vantagens sobre demais coprodutos, em razão da grande disponibilidade e pelo baixo custo. Na literatura facilmente se encontram exemplos de cossustratos desta natureza, empregados nas formas de cobertura ou suplemento, nos tratamentos de solo impactados por óleo, tais como o composto da produção de cogumelos comestíveis (AGAMUTHU; TAN; FAUZIAH, 2013) e os mais empregados, resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de milho e cana-de-açúcar (MOLINA-BARAHONA et al., 2004), o feno, vagens de ervilha e bagaço de trigo (SHAHSAVARI et al., 2013).

A utilização de resíduos orgânicos na biorremediação representa um potencial extremamente importante, contribuindo entre outras vantagens, para a diminuição da descarga de lixo nos aterros sanitários ou à redução da emissão de gases do efeito estufa, pela queima indiscriminada. Porém o reuso de resíduos agropastoris como cossustratos carece de mais entendimento e investigações nesse sentido podem auxiliar na compreensão das diversas lacunas que ainda existem.

3.5 Ensaios de ecotoxicidade empregando sementes

A fitotoxicidade é definida como o resultado da ação de substâncias tóxicas presentes no meio sobre os processos de desenvolvimento de vegetais (ARAÚJO; MONTEIRO, 2005). A determinação da fitotoxicidade é uma importante ferramenta, complementar a um estudo de biorremediação de solos, visando a avaliação da biodisponibilidade de xenobióticos tóxicos, tais como HPAs remanescentes e seus metabólitos. Diferentes parâmetros podem ser avaliados, dentre eles o índice de germinação de sementes, que avalia a relação entre a germinação e o crescimento da radícula (REYNOSO-CUERVAS et al., 2008).

O processo de germinação é um mecanismo complexo iniciado com o intumescimento da semente, culminando na emergência da radícula e do cotilédone. A germinação pode ser influenciada por diferentes aspectos, tais como umidade, pH e a concentração de sais do meio (HAMDI et al., 2007). Certos hidrocarbonetos do óleo podem estimular o crescimento das plantas e uma seleção prévia de sementes pode otimizar o tempo para a definição de plantas mais sensíveis. Ressalta-se ainda que o tipo e tamanho da semente exercem influência sob a resposta do teste. As sementes pequenas e escuras de plantas eudicotiledônias são mais sensíveis que as sementes grandes e claras de plantas monocotiledônias (TIQUIA; TAM; HODGKISS, 1996). Logo, as características das sementes escolhidas devem estar bem conhecidas, especialmente com respeito ao seu tempo de germinação e fotoblastismo, considerando que o teste é realizado em ausência de luz.

Como uma das maiores vantagens do método destacam-se o fato das plantas germinarem independente da sazonalidade, além disso, podem revelar potenciais candidatos para aplicação em processos de remoção de hidrocarbonetos empregando fitorremediação (REYNOSO-CUERVAS et al., 2008).

4 METODOLOGIA

4.1 Solo, contaminante e cossustrato

4.1.1 Solo

Foi utilizado um solo arenoso circunvizinho à uma região de mangue, com histórico de contaminação por hidrocarbonetos. Para a caracterização físico-química foram analisados 7 parâmetros, sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização do solo empregado nos experimentos de biodegradação

Propriedade ou analito	Solo ¹	Referência
pH em água	7,9±0,1	EMBRAPA (1979)
CRA (%)	49,9±0,1	Vasconcelos; Oliveira e de França (2011)
Umidade (%)	16,1±0,1	EMBRAPA (1979)
Nitrogênio total (mg.Kg ⁻¹)	2.365,0	USEPA 315.2
Percentual de sólidos	87,3	
TPH (mg.Kg ⁻¹)	11.664	USEPA 8015B
Faixa gasolina (C8-11)	< 229	
Faixa querosene (C11-14)	< 229	
Faixa diesel (C14-20)	< 229	
Óleo lubrificante (C20-C40)	11.543	
16 HPA total (mg.Kg ⁻¹)*	0,77	USEPA 8270C
Naftaleno (mg.Kg ⁻¹)	0,60	
Fenantreno (mg.Kg ⁻¹)	0,03	
Pireno (mg.Kg ⁻¹)	< 0,01	

CRA- Capacidade de retenção de água. TPH – hidrocarbonetos totais do petróleo. HPA – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

*apenas 3 HPA foram determinadas acima do limite de quantificação do método

Para determinação do pH em água, foi preparado um extrato de solo, tomando-se uma amostra de 10 g, adicionada de 25 mL de água destilada. Após 1 minuto de agitação o pH foi determinado em potenciômetro calibrado com soluções padrão com pH 4,00 e 7,00 (LABMETER pH 5-3B), em triplicata.

O ensaio de determinação da capacidade de retenção de água utilizou uma massa conhecida de solo, transferida e compactada em um funil coberto com papel de filtro

qualitativo (massa inicial seca). O funil foi então transferido para um becker com capacidade para 500 mL, e água destilada foi adicionada até pouco acima do nível do papel de filtro. Após um período de repouso de 30 minutos, o funil foi removido do Becker, esperando-se um tempo igual para o escoamento da água. Em seguida, a amostra foi transferida para um cadinho de porcelana previamente tarado (massa inicial úmida). Realizada a pesagem final, o sistema foi levado para estufa à 105°C por 24h (SOLAB, SL-100). A capacidade de retenção de água foi calculada pela Equação 1.

$$\text{CRA} = [(m_1 - m_2) / m_3] \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Em que: CRA- Capacidade de Retenção de Água; m_1 - massa inicial seca, em gramas; m_2 - massa final, em gramas e m_3 - massa inicial úmida, em gramas.

Para a determinação da umidade em base seca, amostras do solo foram transferidas para cadinhos de porcelana de peso conhecido e após a pesagem inicial, os sistemas foram levados para estufa à 105°C por 24 h. A umidade foi calculada como a diferença entre o peso úmido e o peso seco e expressado em percentual (Equação 2). O ensaio foi conduzido em triplicata.

$$U = [(m_i - m_f) / m_i] \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Em que: U- umidade; m_i - massa inicial da amostra, em gramas e m_f - massa final da amostra, em gramas, após a secagem.

As análises de teor dos hidrocarbonetos no solo, TPH e HPA e nitrogênio total foram realizadas pelo Laboratório Bioagri Industrial, localizado no município de Paulista-PE. Foram empregadas as metodologias descritas pela Agência Ambiental Estadunidense (USEPA). Os demais ensaios de caracterização foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Centro de Biotecnologia da UFPB.

4.1.2 Contaminante

O petroderivado utilizado como contaminante foi uma mistura de óleo lubrificante usado, estocado em tanques de metal de um estabelecimento de troca de óleo da cidade de João Pessoa, gentilmente cedida pelo seu responsável legal. A caracterização do óleo está sumarizada na Tabela 2.

Tabela 2 – Propriedades do óleo lubrificante empregado nos ensaios

Analito	Óleo	Referência
Densidade (g/L)	1,0095	Vasconcelos; Oliveira e de França (2011)
Percentual de sólidos	97,4	
TPH (mg.Kg ⁻¹)	448.000	USEPA 8015
Faixa gasolina (C8-11)	< 10.226	
Faixa querosene (C11-14)	< 10.226	
Faixa diesel (C14-20)	< 10.226	
Óleo lubrificante (C20-C40)	445.000	
16 HPA total (mg.Kg ⁻¹)*	50,1	USEPA 8270C
Naftaleno (mg.Kg ⁻¹)	45,3	
Fenantreno (mg.Kg ⁻¹)	2,10	
Pireno (mg.Kg ⁻¹)	2,73	

TPH – hidrocarbonetos totais do petróleo. HPA – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

*apenas 3 HPA foram determinadas acima do limite de quantificação do método

Todas as análises de caracterização do óleo foram realizadas pelo Laboratório Bioagri Industrial.

4.1.3 Cossustrato

A fonte alternativa de carbono empregada como adjuvante do processo foi representada pela torta do processamento de *Arachis hypogaea* (amendoim), gentilmente cedida e caracterizada pela Embrapa-Algodão (Tabela 3), lotada no município de Campina Grande-PB.

Tabela 3 – Caracterização química da torta de amendoim

Parâmetro/Analito	Resultado
Açúcares solúveis (°Brix)	24,0±0,2
Carbono total (%)	55,3±3,5
Nitrogênio (%)	7,2±0,7
Enxofre (%)	1,9±0,2

A torta de amendoim resultou do processo de extração do óleo da planta, por pressão mecânica ou por extração com solvente. Os teores de carbono, nitrogênio e enxofre na torta foram determinados por análise elementar (Perkin Elmer CHNS 2400). As amostras foram previamente cominuídas e homogeneizadas em moinho analítico de corte (IKA 11A) e cerca de 1-2 mg do produto foi utilizado para as análises, conduzidas em duplicata.

O teor de açúcares solúveis foi determinado, em °Brix, segundo método descrito por Santos (2007). Uma amostra de 1g de torta foi transferida para frasco contendo 3 mL de água destilada e em seguida o sistema foi homogeneizado, sendo deixado em repouso por 60 minutos. Após este período, a suspensão foi filtrada e a leitura em refratômetro de Abbe (Nova instruments) foi realizada, tendo o resultado multiplicado por 4, em função da diluição.

4.2 Microrganismos: isolamento, identificação e aclimatação

Um total de 7 linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* foi empregada neste estudo. As bactérias foram isoladas por métodos tradicionais em solos com histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo (Tabela 4).

Tabela 4 – Origem das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas neste estudo

Linhagem	Origem / local de isolamento^{†,‡}	PC*
TGC01**	Posto de gasolina 1	100,00
TGC02**	Posto de gasolina 2	100,00
TGC03**	Posto de gasolina 3	100,00
TGC04**	Posto de gasolina 4	100,00
TGC05**	Posto de gasolina 5	100,00
TGC06	Posto de gasolina 6	100,00
TGC07**	Posto de gasolina 7	100,00

* PC – percentual de certeza de identificação pelo kit *Bactray III*[®]

** linhagens produtoras de piocianina

Foram tomadas porções cerca de 80-100g entre a superfície e 15 cm de profundidade de solos na área central, próxima às bombas e/ou no entorno (Figura 3) de um total de sete postos de gasolina na Região Metropolitana de João Pessoa-PB. Deu-se preferência por estabelecimentos cujo estado de conservação fosse comprometido,

atendendo o seguinte critério, adotado por esta pesquisa: estado de conservação visualmente comprometido, considerando a fácil identificação de ferrugem nas bombas e/ou estruturas metálicas de sustentação, pisos quebrados ou rachados, presença de manchas de óleo e/ou vazamento de combustíveis ou de água.

Figura 3 – Pontos considerados para coleta das amostras de solo nos postos de gasolina: área central próxima às bombas (A) e entorno (B).



Fonte: adaptado de ilustração disponível em: <<http://images.modhoster.de/system/files/0049/6659/huge/tankstelle-zum-einbauen.jpg>>. Acesso em 20 mar 2017.

As amostras de solo foram acondicionadas em coletores apropriados esterilizados. O material foi encaminhado sob refrigeração para o processamento no Laboratório de Microbiologia Ambiental. Para obtenção das linhagens foi empregada metodologia descrita pela APHA, AWWA e WEF (2012), utilizando os ensaios presuntivo e confirmativo para *P. aeruginosa*. No ensaio presuntivo, cerca de 10g do solo foram transferidos para frascos cônicos com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de solução salina 0,85%. A mistura foi homogeneizada sob agitação de 150 rpm, durante 30 minutos. Em seguida, alíquotas de 10 mL da suspensão foram transferidas para tubos de ensaio contendo caldo Asparagina e incubados durante 24-48h à 30°C até turvação do meio e produção de fluorescência sob luz ultravioleta à $\lambda = 360 \pm 20 \text{nm}$ (CRS, modelo DL-01).

Duas alçadas dos tubos considerados positivos do teste presuntivo foram transferidas para tubos contendo o meio do ensaio confirmativo, caldo Acetamida. Após incubação à 30°C durante 24-48h, a alteração da coloração do meio de vermelho-alaranjado claro para fúccia indicou positividade para *P. aeruginosa*. Em seguida, a espécie foi confirmada em meio sólido, ágar cetrimida, pela técnica do esgotameto. Após incubação à 30°C por 48h, as colônias isoladas foram purificadas e mantidas em

ágar inclinado, sob refrigeração à 4°C, com manutenção por meio de repiques periódicos.

Duas alçadas dos tubos considerados positivos do teste presuntivo foram transferidas para tubos contendo o meio do ensaio confirmativo, caldo Acetamida. Após incubação à 30°C durante 24-48h, a alteração da coloração do meio de vermelho-alaranjado claro para fúccia indicou positividade para *P. aeruginosa*. Em seguida, a espécie foi confirmada em meio sólido, ágar cetrimida, pela técnica do esgotamento. Após incubação à 30°C por 48h, as colônias isoladas foram purificadas e mantidas em ágar inclinado, sob refrigeração à 4°C, com manutenção por meio de repiques periódicos.

A adaptação de cada linhagem à mistura de óleo lubrificante usado foi realizada por meio de incubação em meio Mineral Mínimo (MM), de composição: K₂HPO₄ (0,5g/L); (NH₄)₂SO₄ (0,5 g/L); MgSO₄ (0,5 g/L), FeCl₂ (10 mg/L); CaCl₂ (10 mg/L); MnCl₂ (0,1 mg/L) e ZnSO₄ (0,01 mg/L), pH 7,2±0,2, suplementado com 0,1g de extrato de levedura e uma gota de solução de complexo de vitamina B (Roche, São Paulo, Brasil). O pré-inóculo foi confeccionado em caldo Nutriente, a partir de cultura recente. A incubação ocorreu sob agitação de 150 rpm à 29±1°C por 24h. Após o período, uma alíquota de 1 mL foi transferida para Erlenmeyer com capacidade para 250 mL contendo 100 mL do MM, e concentrações crescentes do óleo, de acordo com a metodologia empregada por Palittapongarnpim et al. (1998), iniciando em 1% e finalizando em 10%. A incubação deu-se em repouso em ausência de luz à 28°C até serem observadas turbidez no meio e/ou colapso com alteração da cor do óleo.

Antes da transferência do inóculo para meio com maior concentração do óleo, um teste de viabilidade foi realizado, a partir da transferência de duas alçadas do meio contendo a linhagem teste desenvolvida, para um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo nutriente, incubado por 24h à temperatura ambiente.

4.3 Teste de antagonismo e confecção de consórcio

A confecção dos consórcios estava condicionada a um teste prévio de atividade antimicrobiana *in vitro*, empregando a técnica dos blocos de gelose, descrita por Vasconcelos, Lima e Calazans (2010). Este teste tem por intuito, verificar possíveis relações ecológicas negativas entre os isolados para que o consórcio seja preparado com linhagens não competidoras entre si.

Suspensões das linhagens-teste foram confeccionadas a partir de uma alçada de cultura recente, diluída até que se aproximasse ao tubo nº 1 da escala de McFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL). Em seguida, a suspensão foi inoculada sob forma de tapete na superfície de 10 mL de agar Müeller-Hinton (Acumedia, Lansing, USA) disposto sobre placas de Petri esterilizadas e incubadas por 24h. Após o período, blocos de gelose medindo 6 mm de altura por 9 mm de diâmetro, contendo crescimento microbiano, foram cortados com auxílio de um furador e posteriormente transferidos para novas placas contendo cada isolado, inoculado individualmente, sob a forma de tapete.

Em seguida os sistemas compostos pelos blocos com crescimento e tapetes recém-confeccionados, foram incubados por 18h à 37°C e os halos de inibição formados, foram medidos em milímetros. A atividade antagônica entre as linhagens foi classificada em forte quando o raio (r) ≥ 20 mm, moderado, se $10 < r < 20$ mm e fraca, se ≤ 10 mm (HAGSHENAS et al., 2015). O consórcio foi preparado com as linhagens que demonstraram halos cujo raio mediu entre 0 e 5 mm.

4.4 Seleção de plantas e ensaio de ecotoxicidade

O ensaio teve por objetivo identificar plantas potencialmente importantes como bioindicadoras do processo de biorremediação, minimizando o tempo na busca por sementes que não fossem estimuladas pelo óleo. Para isto foram confeccionados 3 sistemas contendo 10 g de solo, adicionado com óleo marítimo MF-380 ou a mistura de óleo lubrificante usado, obtendo-se uma razão óleo:solo de 1:50, 1:10 e 1:5, respectivamente. Os sistemas foram fechados e incubados por 5 dias à temperatura ambiente.

A toxicidade dos hidrocarbonetos sobre a germinação da semente e o crescimento da radícula foi conhecida por meio da determinação do Índice de Germinação (I_G) das sementes (TIQUIA; TAM; HODGKISS, 1996). Foram utilizadas 11 sementes (Feltrin, Farroupilha, Brasil ou Toca do verde, Canoas, Brasil) e suas características estão apresentadas na Tabela 5.

Antes do teste, todas as sementes sofreram três lavagens sucessivas com água destilada, visando eliminar excessos de corantes e conservantes. Durante o processo, as sementes com morfologia irregular foram eliminadas. A secagem das sementes foi realizada em papel de filtro, à temperatura ambiente por três horas.

Tabela 5 – Características das sementes no teste de seleção de plantas

Planta (sinonímia)	Tamanho médio (mm)	FTB
Monocotiledôneas		
<i>Allium cepa</i> (cebola)	2,0±0,1	0
<i>Zea mays</i> (milho)	8,8±0,7	0
Dicotiledôneas		
<i>Artemisia dracuncululus</i> (estragão)	1,1±0,2	+
<i>Brassica nigra</i> (mostarda)	1,0±0,1	+
<i>Brassica oleracea</i> (couve)	1,0±0,1	-
<i>Brassica rapa</i> (nabo)	3,0±0,1	0
<i>Cucumis anguria</i> (maxixe-do-norte)	5,6±0,8	-
<i>Cucumis melo</i> (melão)	12,2±1,0	-
<i>Cuminum cyminum</i> (cominho)	4,6±0,5	-
<i>Cynara scolymus</i> (alcachofra)	7,4±0,8	-
<i>Solanum melongena</i> (Berinjela)	3,8±0,2	+

(FTB): fotoblastismo / (+): FTB positivo / (-): FTB negativo / (0): FTB neutro / SG – sem germinação durante o período do teste

Os extratos do solo foram obtidos a partir de uma amostra de 10 g, transferida para um Becker com capacidade para 250 mL contendo 90 mL de água destilada. Em seguida, o volume de 5-8 mL do filtrado foi transferido para placas de Petri, embebendo-se suavemente um papel filtro nº 1 (Whatman, 90 mm de diâmetro), contendo entre cinco e dez sementes, distribuídas sobre a superfície. Para cada planta foram confeccionadas três placas.

O controle foi realizado com água destilada, substituindo o extrato de solo. A incubação ocorreu à 22 ±1°C, em ausência de luz, por 5 dias (Solab, SL-200) e após o período, as sementes germinadas foram contadas e o tamanho das raízes mensurados com auxílio de um paquímetro. O I_G das sementes foi determinado empregando-se a Equação 4.

$$I_G = [(S_1 \times R_1) / (S_2 \times R_2)] \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

Em que: S₁ – número de sementes germinadas no extrato de solo, R₁ – média do comprimento da raiz no extrato de solo, S₂ – número de sementes germinadas no

controle e R_2 – média do comprimento da raiz no controle. O grau de toxicidade foi classificado segundo Anastasi et al. (2009) em alto ($I_G < 50\%$), moderado (I_G entre 50-80%) e nulo ($I_G > 80\%$).

Por ser realizado em ausência de luz, houve necessidade de conhecer o fotoblastismo das sementes. Para cada planta foram preparadas duas placas de Petri como descrito anteriormente, embebendo o papel de filtro com água destilada e incubando à 22°C por 5 dias em ambiente escuro e com luz artificial (CORDAZZO; ARACAMA, 1998). Após o período, as sementes germinadas foram contadas, aplicando-se a Equação 5.

$$FTB = (Se / Sc) \quad \text{Eq. 5}$$

Em que: FTB- fotoblastismo; Se- o número de sementes germinadas no escuro e Sc- o número de sementes germinadas no claro. O FTB foi classificado como positivo se maior que 1, negativo se menor que 1 e neutro quando o valor igual a 1.

4.5 Ensaio de degradação de HPA

A determinação do percentual de remoção de fenantreno e pireno do solo pelo consórcio foi conduzida pela associação do bioaumento com bioestímulo, utilizando adição de torta de amendoim na função de cossustrato nas condições sumarizadas na Tabela 6.

O ensaio de biorremediação teve duração de 60 dias e foi realizado em reatores transparentes de polietileno, com capacidade para 500 mL, preenchidos com 200 g de solo contaminado com a mistura de óleo lubrificante usado, representando uma condição de contaminação pelos HPAs na ordem de aproximadamente 50 mg/kg, isto é, cerca de 50 vezes acima do padrão aceito para a soma dos 16 HPAs em solos naturais (Figura 4).

Tabela 6 – Condições dos reatores para na remoção de fenantreno e pireno no solo empregando a associação do bioaumento com o bioestímulo*

Reator	Óleo (mL/Kg)	Torta (g/Kg)	Relações		
			óleo:solo	torta:óleo	torta:solo
1	40	20	1:5	1:2	1:10
2	40	20	1:5	1:2	1:10
3	80	20	1:2,5	1:4	1:10
4	80	20	1:2,5	1:4	1:10
5	40	40	1:5	1:1	1:5
6	40	40	1:5	1:1	1:5
7	80	40	1:2,5	1:2	1:5
8	80	40	1:2,5	1:2	1:5
9	40	—	—	—	—
10	80	—	—	—	—

* Reatores 9 e 10 representam o controle abiótico

Figura 4 – Reator do experimento de biorremediação. O recipiente no interior foi empregado no ensaio de respiração microbiana



Crédito da figura: Thiago Cavalcanti

O pré-inóculo das linhagens empregadas no consórcio foi confeccionado a partir da transferência de 3-5 blocos de gelose, preparados como descrito no item 4.3, em frascos cônicos com capacidade para 250 mL contendo 100 mL de MM, adicionado com extrato de levedura e vitaminas. A densidade microbiana média, por bloco, correspondeu a cerca de $95 \pm 4 \times 10^6$ UFC/mm². Após o período de incubação por 24h à 29 ± 1 °C sob agitação de 150 rpm, a concentração média celular foi de aproximadamente $60 \pm 4 \times 10^8$ UFC/mL.

O volume da suspensão empregada no bioaumento foi equivalente a 5% da massa de solo adicionada no reator (PALITTAPONGARNPIM et al., 1998). Um reator controle para determinação das perdas abióticas foi confeccionado, utilizando solo esterilizado com solução de nitrato de prata a 10% (m/v). O teste foi conduzido em duplicata e os ensaios para determinação do teor dos HPA foram realizados pelo Laboratório Analytical Technology, sediado em Recife-PE, empregando metodologia da USEPA.

Para os testes de ecotoxicidade, antes e após o bioprocessamento (metodologia descrita no item 4.4), foram utilizadas sementes de três plantas: *Brassica nigra*, *Cucumis anguria* e *Zea mays*.

4.6 Ensaios microbiológicos

Os ensaios microbiológicos neste estudo compreenderam aqueles envolvendo: 1- cálculo da densidade microbiana das suspensões e blocos de gelose; 2- a confecção de pré-inóculo e inóculo; 3- a enumeração microbiana nos solos; e 4- a respiração microbiana. Em todas elas a técnica de contagem adotada foi *Pour plate*, como descrito por Genhartdt et al. (1994), empregando ágar nutriente adicionado com 50 mg/Kg de nistatina e incubação por 48h à 29 ± 1 °C. O volume transferido da amostra foi 0,1 mL, obtido após sucessivas diluições decimais e podia ser de duas origens: 1- do extrato de solo preparado com 10 g de solo e 90 mL de solução salina; ou 2- da suspensão bacteriana confeccionada para obtenção do inóculo. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo (UFC/g) ou por mililitro de amostra (UFC/mL), baseando-se na Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Os ensaios de quantificação da densidade microbiana nos reatores foram realizados nos tempos 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de processo. Já os ensaios de respiração microbiana foram conduzidos inicialmente em intervalos de 5 dias, dilatados para 15 dias após metade do experimento, empregando a metodologia descrita por Severino et al. (2004). A técnica é fundamentada titulação do NaOH 0,5 mol/L com solução de HCl 0,5 mol/L, na presença de vermelho de fenol. O volume de 25 mL da solução de hidróxido de sódio foi reservado num recipiente disposto no interior dos reatores. A diferença entre o volume de ácido necessário para neutralizar a base no reator controle e nos reatores-teste equivale à quantidade de gás carbônico produzido pelos microrganismos do solo durante a biodegradação, calculada pela Equação 6:

$$[\text{CO}_2] = \{(V_1 - V_0)\} \times 44 \div m \quad \text{Eq. 6}$$

Em que: $[\text{CO}_2]$ - quantidade de carbono mineralizado (mg de CO_2/g de solo); V_1 -volume (mL) de HCl necessário para neutralizar o NaOH no tratamento; V_0 -volume (mL) de HCl necessário para neutralizar no reator controle; 44-equivalente à massa molecular do CO_2 ; e m- massa (Kg) do solo no reator.

Considerando a retirada das amostras de solo do reator a cada quantificação da densidade microbiana durante o processo, foi corrigido de 0,2 até 0,15.

4.7 Monitoramento

Os ensaios de monitoramento do processo compreenderam as determinações de temperatura, pH e umidade em base seca. Os valores de temperatura da sala de incubação (Incoterm, modelo 7663.02.0.00) foram anotados diariamente às 10 e 17 h e comparados aos dados oficiais publicados na página eletrônica do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

As metodologias adotadas para as determinações do pH e umidade foram as mesmas descrita no item 4.1.1.

4.8 Tratamento estatístico

A comparação de médias dos ensaios de biodegradação foi realizada pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, empregando o programa SISVAR, versão 5.6.

5 RESULTADOS

5.1 O solo

Dos parâmetros analisados no solo arenoso empregado neste estudo (vide Tabela 1), o pH determinado caracterizou o solo como alcalino. Geralmente, solos de regiões próximas a mangues apresentam variações de pH entre 6,5 e 7,7. Entretanto, quando áreas semelhantes a utilizada neste estudo se encontram próximas às zonas urbanas, a tendência do pH desses solos é aumentar, em virtude, principalmente, da água estar contaminada por poluentes domésticos (SUÁREZ-ABELENDA et al., 2014).

A Capacidade de Retenção de Água (CRA) obtida foi típica de solos arenosos, em razão de sua textura, bem como do conteúdo de matéria orgânica no local (FISCHER et al., 2013). Conhecida a CRA, os ensaios de biorremediação puderam ser conduzidos com um teor de umidade estimado entre 24,5 e 28,6%, correspondente à faixa de 60-70% do valor da CRA (VASCONCELOS; DE FRANÇA; OLIVEIRA, 2011).

5.2 Linhagens microbianas

O processo de aclimação das 7 linhagens isoladas foi bem-sucedido. Dadas as condições estáticas de incubação, maior tempo entre as transferências da menor para maior concentração de óleo foi necessário, comparado quando a incubação é realizada sob agitação. Ressalta-se que as linhagens de *P. aeruginosa* produtoras de piocianina começaram a produzir o pigmento em meio mineral, a partir da concentração de 4% de óleo.

5.3 Hidrocarbonetos do petróleo

A soma dos hidrocarbonetos totais no solo do reator totalizou um valor aproximado de 460.000 mg/Kg, com destaque aos hidrocarbonetos da faixa do óleo lubrificante, natureza do principal contaminante da região da coleta. Dos 16 HPAs prioritários três foram detectados, naftaleno, fenantreno e pireno. A concentração desses HPAs se encontrava mais de 50 vezes acima do valor de referência estabelecido destes compostos para solos naturais.

5.4 Confeção dos consórcios

De acordo com o teste de atividade antimicrobiana, os diâmetros dos halos de inibição exibidos pelas linhagens variaram de 0 a 20 mm e as interações negativas mais significativas ocorreram em 4 linhagens: TGC01, TGC05, TGC06 e TGC07. A Tabela 7 sumariza a média dos halos de inibição obtidos. Desta forma, foi possível agrupar em consórcios apenas três isolados: TGC02, TGC03 e TGC04. O isolado TGC01 promoveu formação de halos de inibição contra 57% das linhagens testadas enquanto TGC07 demonstrou a maior atividade antagonista. Os isolados TGC06 e TGC05 foram designados para outro estudo.

Tabela 7 – Média do diâmetro dos halos de inibição (mm) formados pelos isolados. O resultado expressa a repetição em pelo menos duas vezes no teste de atividade antimicrobiana*

Linhasgens	TGC01	TGC02	TGC03	TGC04	TGC05	TGC06	TGC07
TGC 01	0	0	0	0	0	0	0
TGC 02	0	0	0	0	0	0	0
TGC 03	15	0	0	0	0	0	1
TGC 04	0	0	0	0	0	0	0
TGC 05	12	0	0	0	0	0	0
TGC 06	16	0	0	0	14	0	20
TGC 07	15	12	0	0	15	14	0

5.5 Remoção do fenantreno e pireno pelos consórcios

Após 60 dias de bioprocessamento e descontadas as perdas abióticas, foi observada uma remoção significativa do fenantreno e do pireno nos reatores, e o consórcio degradou preferencialmente o pireno (Tabela 8).

Em todas as condições testadas não houve diferença estatística sobre o percentual de redução do fenantreno, assim como do pireno, obtendo-se percentuais de remoção entre aproximadamente 77 e 80,5%. Entretanto, no caso do fenantreno, a associação do bioaumento com o bioestímulo demonstrou melhor resposta quando o menor teor do contaminante estava presente, independentemente da concentração de torta adicionada.

Tabela 8 – Fonte de PAH preferencial e média da degradação do fenantreno e pireno pelos diferentes consórcios e resíduos agropastoris*

Reatores/ Consórcios	Óleo (ml/Kg)	Torta (g/Kg)	% de degradação**		Δ	DP
			FEN	PIR		
1	40	20	77,5±0,1 Aa	79,9±0,1 Aa	0,4	PIR
2	80	20	76,9±0,3 Ab	79,3±0,2 Aa	0,4	PIR
3	40	40	78,1±0,3 Aa	80,4±0,3 Aa	0,4	PIR
4	80	40	76,9±0,3 Ab	79,3±0,2 Aa	0,4	PIR

* considerando as perdas abióticas de 11,7±0,1 e 12,6±0,1 quando empregados 20 e 40 mL/Kg de óleo nos reatores, respectivamente; FEN - fenantreno; PIR – pireno; Δ - variação da relação mássica inicial e final entre FEN e PIR; DP – degradação preferencial.

** Média de degradação do fenantreno e pireno seguidas da mesma letra minúscula na coluna e da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente, entre si, pelo teste de Scott-Knott, ($p \leq 0,05$).

5.6 Seleção das sementes

Das espécies avaliadas, cinco exibiram fotoblastismo negativo: *Brassica oleracea*, *Cucumis anguria*, *Cucumis melo*, *Cuminum cyminum* e *Allium fistolatum*, três apresentaram fotoblastismo neutro: *Allium cepa*, *Zea mays* e *Brassica rapa* enquanto fotoblastismo positivo foi observado em outras três espécies: *Artemisia dracunculus*, *Brassica nigra* e *Solanum melogena*. Na Tabela 9 estão apresentados os resultados dos índices de germinação (I_G).

Para os dois tipos de contaminantes testados foram observados I_G predominantemente menores que 50% em quase 50% dos testes. As eudicotiledôneas se mostraram mais sensíveis que as monocotiledôneas e em algumas sementes, especialmente expostas ao óleo marítimo MF-380, os sintomas de toxicidade foram proporcionais à concentração do contaminante.

Entre as eudicotiledôneas medindo entre 1,0 e 4,6 mm, *B. nigra*, *B. oleracea* e especialmente *A. dracunculus* e *C. cyminum*, a fitotoxicidade foi proporcional ao teor de óleo contaminante no solo, sendo mais bem evidenciado nesta última quando exposta ao óleo marítimo MF-380. É importante ressaltar que embora *A. dracunculus* e *B. nigra* tenham exibido fotoblastismo positivo, e medirem cerca de 4-5 vezes menos que *C. cyminum*, houve uma redução significativa na germinação e na elongação da raiz. Isto permitiu eleger especialmente *B. nigra* como vegetal de escolha dentre as sementes pequenas de plantas eudicotiledôneas ($I_G = 0\%$ nas duas maiores concentrações dos dois contaminantes avaliados).

Tabela 9 – Índice de germinação das sementes expostas a diferentes concentrações de hidroderivados

Plantas	Mistura de óleo lubrificante queimado			Óleo marítimo MF-380		
	Razão contaminante:solo					
	1:50	1:10	1:5	1:50	1:10	1:5
<i>C. cyminum</i>	0,0±0,0	13,3±0,5	0,0±0,0	300,0±0,5	50,0±0,5	0,0±0,0
<i>B. oleracea</i>	30,2±0,1	48,3±0,1	49,5±0,1	53,8±0,1	28,6±0,1	40,6±0,1
<i>A. Dracunculus</i>	56,8±0,2	44,7±0,2	27,3±0,2	82,9±0,2	52,2±0,2	58,4±0,2
<i>C. anguria</i>	42,2±0,8	0,0±0,0	80,2±0,8	12,9±0,8	0,0±0,0	42,6±0,8
<i>C. melo</i>	76,1±0,1	43,5±0,1	52,2±0,1	45,8±0,1	80,2±0,1	57,5±0,1
<i>B. nigra</i>	64,3±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	35,5±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0
<i>B. rapa</i>	39,7±0,1	58,8±0,1	54,7±0,1	42,5±0,1	51,8±0,1	66,2±0,1
<i>A. porrum</i>	12,0±0,1	66,3±0,1	92,0±0,1	67,4±0,1	58,9±0,1	98,9±0,1
<i>A. cepa</i>	63,5±0,1	59,4±0,1	76,1±0,1	76,7±0,1	6,3±0,1	12,7±0,1
<i>A. fistolatum</i>	55,3±0,5	65,4±0,5	7,2±0,5	67,6±0,5	63,5±0,5	6,8±0,5
<i>Z. mays</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	32,7±0,1	0,0±0,0	49,0±0,1

Classificação do efeito fitotóxico: vermelho - alta se o IG < 50%, amarelo - moderada, se 50 > IG < 80% e verde - nula, se IG > 80% (Anastasi et al. 2009).

Um padrão diferente nos sintomas de intoxicação foi observado com *B. rapa*. Enquanto a mistura de óleo lubrificante implicou numa fitotoxicidade alta, surpreendentemente as concentrações crescentes de óleo MF-380 proporcionaram uma redução desta fitotoxicidade para moderada. Para as demais sementes grandes, medindo entre 5,6 e 12,2 mm, foram observados IG sem o padrão de proporcionalidade à concentração de óleo testado, observado com as sementes menores. Adicionalmente, *C. anguria* se mostrou mais sensível do que *C. melo*.

Dentre as monocotiledôneas (*A. fistolatum*, *A. cepa*, *A. porrum* e *Z. mays*), à exceção da última os IG determinados classificaram a fitotoxicidade predominantemente como moderada. Os sintomas de toxicidade foram mais acentuados em duas sementes expostas ao óleo MF-380, quando comparado à mistura de óleo lubrificante: *A. fistolatum* e particularmente *A. cepa*, cujo efeito tóxico foi proporcional à concentração do óleo. Já para *A. porrum*, o óleo estimulou o crescimento da planta, resultando no aumento do IG a medida que a concentração de óleo também aumentou.

5.7 Ensaios de ecotoxicidade

Na Tabela 10 estão apresentados os I_G determinados de três sementes, selecionadas aleatoriamente, antes e após o tratamento.

Tabela 10 – Índice de germinação (%) das sementes antes e após a biorremediação

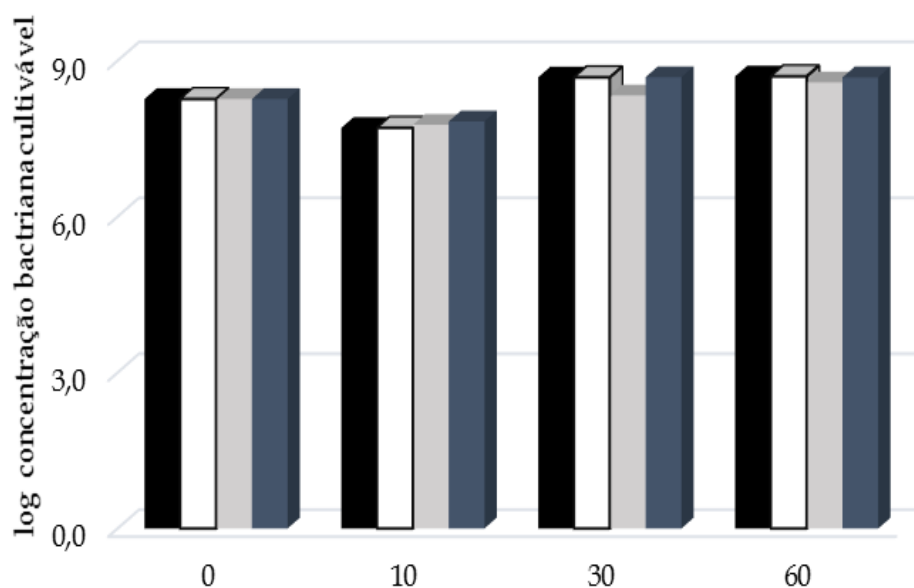
Plantas	Solo contaminado	Solo tratado			
		volume de óleo (mL/Kg) : massa de torta (g/Kg)			
		40:20	40:40	80:20	80:40
<i>Brassica nigra</i>	58,3±0,1	140,1±0,1	89,2±0,1	154,7±0,1	43,5±0,1
<i>Cucumis anguria</i>	21,6±0,8	600,0±0,8	1680,0±0,8	2250,0±0,8	0,0±0,0
<i>Zea mays</i>	0,0±0,0	31,1±0,1	96,9±0,1	134,0±0,1	57,5±0,1

Classificação do efeito fitotóxico: vermelho - alta se o $I_G < 50\%$, amarelo - moderada, se $50 > I_G < 80\%$ e verde - nula, se $I_G > 80\%$ (Anastasi et al. 2009).

Na Tabela 10, observa-se que os I_G determinados antes do tratamento indicavam a necessidade de uma intervenção no solo, especialmente no teste com *Zea mays*. Após 60 dias, foi observado que o tratamento permitiu o estabelecimento da fertilidade do solo, relacionado à concentração de cossustrato adicionado. Isto sugere que nos reatores contendo as maiores porções do óleo e torta, a microbiota parece ter preferido a torta de amendoim como fonte de carbono.

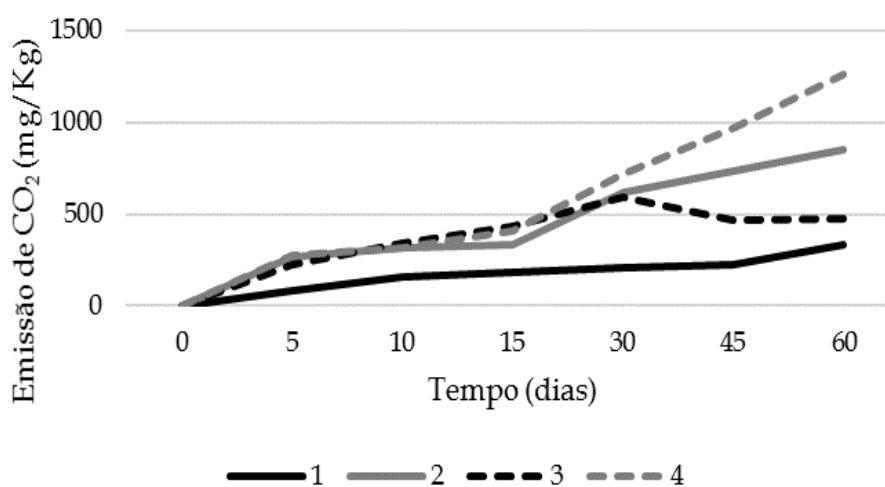
5.8 Quantificações microbianas

A quantificação dos microrganismos cultiváveis do solo revelou uma população elevada e estável ao longo dos 60 dias (Figura 5). O fato dos números estimados permanecerem cerca de 10^8 UFC/g de solo pode ser explicada pela elevada carga microbiana adicionada do consórcio, aliada à presença da torta de amendoim como uma fonte alternativa de carbono. A manutenção de uma densidade elevada ao longo de todo o processo, em especial, na sua metade final, reflete na alta taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos.

Figura 5 – Quantificação das bactérias heterotróficas cultiváveis em 60 dias de processo

Adição de óleo (mL/kg) e torta (g/Kg): 40 e 20 (preto); 80 e 20 (branco); 40 e 40 (cinza); 80 e 40 (azul)

O aumento da emissão de CO₂ nos reatores é indicativo do sucesso na mineralização destes compostos (Figura 6). O teste serviu como um parâmetro complementar para mensurar a eficiência metabólica dos consórcios. A emissão de gás foi proporcional ao teor de torta suplementado no solo dos reatores. Quando 20 g/Kg foi empregada, concentrações menores de CO₂ foram determinadas, ao passo que no emprego de 40 g/Kg de torta, as maiores emissões foram detectadas.

Figura 6 – Estimativa de carbono mineralizado por meio da respiração microbiana

Condições de óleo (mL/Kg) e de torta (g/Kg), respectivamente nos reatores: 1 – 40 e 20 (preto); 2 – 80 e 20 (cinza); 3 – 40 e 40 (preto pontilhado) e 4 – 80 e 40 (cinza pontilhado)

6 DISCUSSÃO

P. aeruginosa é uma das bactérias com maior potencial degradador de hidrocarbonetos por reconhecidamente ser hábil em utilizar mais de 90 compostos, incluindo petroderivados (MITTAL; SINGH, 2009; CORNELIS, 2013; WU et al., 2013). O emprego de consórcios permite potencializar esta característica, contribuindo, para uma remoção mais efetiva dos HPAs em solos.

O solo é a porção mais afetada de um ecossistema no que diz respeito à contaminação por HPAs. Dadas as características intrínsecas destes compostos, sua distribuição nos agregados ocorre de formas distintas. Ao passo que a concentração dos HPA-BMM aumenta de forma logarítmica, proporcionalmente à distância da fonte, nos HPA-AMM esta relação é inversamente proporcional, concentrando-se mais próximos à origem da contaminação (YUAN et al., 2015). Em complemento, os HPAs de três e quatro anéis são mais prevalentes em solos e se encontram sorvidos aos agregados (WU et al., 2013).

Os HPAs detectáveis no solo foram: naftaleno, fenantreno e pireno. Cerca de 90% do naftaleno foi reduzido em 60 dias. Nas condições do teste, esta perda pode ter sido mais relacionada à volatilização do que pela ação microbiana. Dentre os 16 HPAs prioritários, o naftaleno apresenta o mais elevado valor de pressão de vapor, $8,89 \times 10^{-2}$ mmHg, e baseado nesta premissa, este composto não foi considerado como variável de resposta. Em contrapartida, fenantreno e pireno, cujas pressões de vapor são bastante inferiores, $6,80 \times 10^{-4}$ e $4,25 \times 10^{-6}$ mmHg, respectivamente, bem como a solubilidade, 1,1 mg/L no fenantreno e 0,132 mg/L no pireno, uma menor susceptibilidade à volatilização e à dissolução é estabelecida, por conseguinte os dois HPAs são persistentes e sua remoção dos agregados do solo depende mais significativamente da ação microbiana (BOJES; POPE, 2007).

Valores positivos da relação mássica entre as concentrações inicial e final dos HPA-BMM (fenantreno) e HPA-AMM (pireno) indicam a utilização preferencial pelos HPA de alta massa molecular (KOHLMEIER et al., 2005; TOLUN et al., 2006; ZHANG et al., 2009). Logo, o uso da torta de amendoim como cossustrato promoveu o consumo preferencial do HPA mais persistente. Resultados semelhantes foram obtidos quando outros cossustratos foram empregados na biorremediação de solos contaminados por 8 mg/Kg dos 16 HPAs prioritários, tais como glicerol (BENGTSSON; ZERHOUNI, 2003) e glicerol bruto (VASCONCELOS; DE FRANÇA;

OLIVEIRA, 2011). No primeiro caso, houve degradação preferencial dos HPA-AMM, a maioria entre 20 e 40%, alguns acima de 50% e nenhum menor que 10%, enquanto o segundo resultou na remoção não inferior a 60% de todos os HPA-AMM.

Diferentemente do obtido neste trabalho, cuja redução foi superior a 80% em 60 dias de processo, Karamalidis et al. (2010) observaram que consórcios formados por linhagens de *P. aeruginosa* atingiram um percentual semelhante no intervalo de 250 dias. O fenantreno começou sendo consumido a partir do 21º dia e o pireno, após o 64º, quando grande parte dos n-alcanos havia sido degradada, entretanto, ressalta-se que nenhum composto orgânico foi adicionado como cossustrato, o que valoriza o emprego de resíduos agropastoris como adjuvantes na biorremediação de solos aplicado por este estudo, especialmente quando proveniente de oleaginosas.

Dados da literatura permitem reforçar esta hipótese. Resíduos agrícolas de plantas não oleaginosas, empregadas como cossustratos durante a remoção de hidrocarbonetos do petróleo em solo são significativamente distintos. Molina-Barahona et al. (2004) observaram uma degradação de aproximadamente 30% do TPH, nos solos suplementados com 3% de palha de milho ou 2% bagaço de cana-de-açúcar após 109 dias de processo. Por outro lado, Lee, Oh e Kim (2008), verificaram uma remoção de 13% do óleo em 30 dias, quando suplementaram o solo com serragem e feno.

A aceleração da taxa de degradação do fenantreno ocorre em parte, por sua natureza, menos persistente que HPA-AMM, porém sua remoção é mais eficiente na presença de adjuvantes, por exemplo, agentes tensoativos e/ou cossustratos (ADELAJA; KESHAVARZ; KYAZZE 2014). O fenantreno não é bem consumido quando misturado a outros hidrocarbonetos, entretanto serve de cossustrato durante a remoção dos HPA-AMM. Além disso, quando o fenantreno se encontra associado a outros HPAs em solos, seu tempo de meia vida é maior, enquanto para o pireno isto parece não ocorrer (THENMOZHI et al., 2012; SAWULSKI et al., 2015). Estudos de cinética de biodegradação do pireno revelaram que sua remoção foi mais eficiente na presença de HPA-BMM, tais como fluoranteno e fenantreno (DEAN-ROSS; MOODY; CERNIGLIA, 2002; HWANG; CUTRIGHT, 2003). Isto pode explicar a razão dos maiores percentuais de remoção do pireno do consórcio coincidir com os maiores percentuais de redução do fenantreno.

A adição de cossustratos permite maior desempenho dos consórcios, uma vez que contribuem no acesso às moléculas de natureza hidrofóbica e maior tempo de contato entre o consórcio e o contaminante (ADELAJA; KESHAVARZ; KYAZZE

2014), além de estimular a produção de biomassa por servirem de fonte alternativa de carbono (MAO, 2013) e garantir a redução da duração da fase lag da microbiota adicionada (MIYA; FIRESTONE, 2001; NIKOLOPOULOU; KALOGERAKIS, 2008). No contexto dos cossustratos de origem nos resíduos agropastoris, importantes benefícios envolvidos resultam a aceleração da taxa de degradação de hidrocarbonetos, tais como favorecimento da ação de oxigenases, resultado da aeração durante o revolvimento do solo na aplicação, fornecimento de nutrientes e aumento da concentração de ácido húmico (SIJIM; KRAAIJ; BELFROID, 2000; SHAHSAVARI et al., 2013).

Em solos arenosos, o suprimento de nitrogênio é crucial no estímulo da microbiota dentro de 72h após sua introdução (ASPRAY; GLUSZEK; CARVALHO, 2008). Os teores de nitrogênio do solo e da torta não foram inibitórios para a microbiota, contribuindo para a eficiência do tratamento. Adicionalmente, possíveis substâncias com atividade antimicrobiana presentes na torta não surtiram efeito sobre o processo. Diferentes compostos fenólicos presentes na semente de amendoim exibem um maior espectro contra microrganismos, porém Gram-negativos são menos sensíveis (SEBEI et al., 2013).

A quantificação microbiana cultivável do solo revelou uma população elevada e estável ao longo dos 60 dias, garantindo o reforço contra um fenômeno comum em estudos de biorremediação de solos empregando o bioaumento, isto é, uma fase lag mais longa, pela qual se reflete o atraso do processo (BAGGI, 2000). A manutenção de uma densidade elevada reflete no aumento da taxa de biodegradação dos HPAs e consequentemente na emissão de CO₂ (SABATÉ; VIÑAS; SOLANAS, 2004). Neste contexto, o teste da respiração demonstrou as propriedades hidrocarbonoclasticas da microbiota, assim como auxiliou na confirmação de que a torta, inicialmente adicionada para favorecer o cometabolismo, foi eficiente como substrato para desenvolvimento de novas células, com posterior manutenção no meio.

Um estudo comparativo sobre a degradação de HPAs em solos, verificou que as emissões de CO₂, resultantes da degradação do fenantreno foram superiores ao pireno, apresentando um acúmulo significativo ao final do processo, cerca de 1400 mg/Kg, discutido como resultado da oxigenação provida durante os processos de revolvimento do solo (NIEPCERON et al., 2013). Dada a escolha preferencial do pireno por parte dos consórcios empregados neste estudo, foi possível demonstrar teores similares de carbono mineralizado comparáveis aos já divulgados na literatura. Cabe ressaltar que

dada as condições dos testes, os resultados não expressam apenas o CO₂ acumulado como produto da degradação do fenantreno e do pireno. Parte deles podem ter origem nos demais compostos presentes, tais como, outros hidrocarbonetos nas diferentes frações do óleo lubrificante, assim como o óleo residual existente nos cossustrato.

Do ponto de vista fitotóxico, dois aspectos foram abordados: a seleção de sementes e a sua aplicação nos testes após o tratamento com a torta e o consórcio. Os valores do I_G atribuem categorias à fitotoxicidade: alta (entre 0 e 50%), moderada (entre 50 e 80%) e nula (acima de 80%), podendo indicar que concentrações menores do contaminante ou dos metabólitos produzidos durante a biodegradação não são mais tóxicos ou não representam mais riscos para a fertilidade do solo (ANASTASI et al., 2009). Como o teste relaciona o número de sementes germinadas com os eventos de alongação da raiz, na presença e ausência de exposição a hidrocarbonetos, implica a possibilidade de obter índices superiores a 100%, como observado em *C. cyminum* frente ao óleo marítimo MF-380 na razão óleo-solo 1:50.

No caso do *C. melo*, a variação do I_G de alto para moderado provavelmente ocorreu dada a presença de compostos voláteis mais tóxicos na fase de crescimento da raiz, como também em razão do seu tamanho (12,2±1,0 cm). Nestes casos, a germinação ocorre mais em função das reservas de energia do que os fatores ambientais. Embora seja grande, clara e conter muita reserva de amido, a semente possui um baixo teor de umidade e depende muito mais da água do solo para se desenvolver. Ressalta-se ainda que a presença do óleo pode ter formado uma espécie de película em torno da semente, impedindo que a água do solo entrasse em contato com o seu tegumento (STORCK et al., 2013).

Dentre as duas monocotiledôneas de fotoblastismo neutro testadas, *Allium cepa* revelou uma fitotoxicidade moderada, proporcional à concentração do contaminante, resultando admiravelmente um I_G nulo para a fitotoxicidade na maior concentração testada. Isto sugeriu estímulo do óleo na germinação da semente da cebola. Apesar do resultado, esta planta monocotiledônea de sementes pequenas e escuras pode ser utilizada em testes de ecotoxicidade. Por outro lado, *Zea mays* não germinou nas três concentrações examinadas. Este resultado surpreendeu, pois o milho havia germinado no ensaio de fotoblastismo, entretanto, na presença do contaminante, nem mesmo a germinação pôde ocorrer. Segundo Tiquia; Tam e Hodgkiss (1996), a germinação é um processo pelo qual, as reservas de energia na semente e a umidade são mais importantes para o rompimento do tegumento do que os constituintes no meio externo.

Deve-se considerar também que baixas concentrações de hidrocarbonetos podem provocar estresse metabólico, em razão da presença de compostos voláteis, ao passo que concentrações mais altas podem promover condições para a planta se desenvolver às custas de suas adaptações morfoanatômicas e bioquímicas (CAVALCANTI et al., 2016). Sendo assim, plantas cujo crescimento é estimulado na presença de altos teores de hidrocarbonetos também sinalizam como boas candidatas de ensaios de ecotoxicidade.

É importante ressaltar também que esta seleção não considerou a presença de possíveis metabólitos tóxicos provenientes do bioprocessamento, entretanto, a sensibilidade revelada das plantas frente ao óleo não metabolizado, serviu como orientador na exclusão de espécies, na redução do tempo da busca por sementes apropriadas.

Após o tratamento com a torta e o consórcio, as plantas testadas se mostraram boas indicadoras, no entanto, *Z. mays* foi o vegetal mais sensível do teste, cujo I_G aumentou, partindo de 0% para valores superiores a 130%. Porém, *C. anguria* foi a semente que apresentou os maiores I_G nos testes, exceto na condição com as maiores concentrações de óleo e torta, mesma condição que ocorreu com todas as sementes testadas.

Surpreendentemente, nos reatores cujos percentuais de remoção de HPAs obtidos foram considerados satisfatórios, isto é, menor teor de torta, independentemente do volume de óleo adicionado, alguns I_G revelaram um efeito tóxico alto. Isto pode ser justificado pelo fato da amostra tomada do solo para a preparação do extrato, pudesse estar mais concentrada pelo óleo do que o restante do solo distribuído no reator. Nesses casos, ocorre a possibilidade de outros compostos estarem presentes, especialmente os mais voláteis, influenciando de forma negativa o desenvolvimento das raízes (ADAM; DUNCAN, 2002).

Embora tenha sido observada uma significativa remoção dos HPAs, estes hidrocarbonetos não foram os únicos contaminantes presentes no solo, cujo teor de TPH era alto. Por outro lado, na condição menos eficiente, 80 mL/Kg de óleo e 40 g/Kg de torta, a toxicidade foi considerada de moderada a nula. Neste caso, o resultado pôde estar relacionado ao tamanho médio da semente de *Z. mays*, $8,8 \pm 0,7$ mm, quando suas reservas podem ter contribuído no aumento do I_G . Durante o processo de germinação, fatores intrínsecos da semente são mais relevantes do que as variáveis encontradas no meio externo, necessárias tardiamente, durante a fase de emergência e crescimento da radícula (TIQUIA; TAM; HODGKISS, 1996; CORDAZZO; ARACAMA, 1998).

Não menos importantes dos resultados obtidos com *Z. mays*, os IG obtidos com *B. nigra* e especialmente *C. anguria* reforçam a hipótese de que outros hidrocarbonetos e seus metabólitos tóxicos presentes podem ter influenciado de forma significativa no teste. *C. anguria* já foi apontada em um estudo prévio, como a melhor indicadora, entre os tipos de sementes testadas (VASCONCELOS; OLIVEIRA e DE FRANÇA, 2010) e embora tenha sido observada uma significativa remoção de fenantreno e pireno no solo, estes hidrocarbonetos não foram os únicos contaminantes presentes no solo, cujo teor de hidrocarbonetos totais do petróleo se aproximou de 460.000 mg/Kg (vide Tab. 1).

7 CONCLUSÕES

Nas condições estabelecidas e avaliadas por este estudo, a associação do consórcio de *P. aeruginosa* com o reuso da torta de amendoim, na função de adjuvante do processo promoveu uma significativa remoção de fenantreno e pireno, preferencialmente, por este último, quando empregadas baixas concentrações do cossustrato nos reatores.

Isto ressalta o fato que resíduos brutos, os quais podem conter traços de substâncias tóxicas formadas, derivadas ou adicionadas durante seu processamento, podem ser aplicados diretamente ao solo, sem tratamento prévio, uma vez que não potencializam o impacto à matriz contaminada, verificado pelo aumento da fertilidade a partir das sementes selecionadas para o teste de ecotoxicidade.

Os resultados deste estudo ainda enfatizam que o uso de resíduo agropastoril como cossustrato na biorremediação de solos contaminados por petroderivados atribui uma destinação nobre para este coproduto, em detrimento ao descarte, atitude muito bem acolhida pela sociedade e pela comunidade acadêmica.

Em complemento, os resultados ainda reforçam a hipótese sobre a associação das estratégias de bioaumento e bioestímulo ser mais benéfica, sob diferentes ópticas, do que o emprego de apenas um único método, no contexto da biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo.

REFERÊNCIAS

ABU, E.A.; SU, S.; SALLANS, L.; BOISSY, R.E.; GREATENS, A.; HEINEMAN, W. R.; HASSETT, D.J. Cyclic voltammetric, fluorescence and biological analysis of purified aeruginosin A, a secreted red pigment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*. v. 159, p. 1736-1747, 2013.

ADAM, G.; DUNCAN, H. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ Pollut*. v. 120, n. 2, p. 363-370, 2002.

ADELAJA, O.; KESHAVARZ, T.; KYAZZE, G. Enhanced biodegradation of phenanthrene using different inoculum types in a microbial fuel cell. *Eng Life Sci*. v. 14, n. 2, p. 218-228, 2014.

AGAMUTHU, P.; TAN, Y.S.; FAUZIAH. Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using selected organic wastes. *Procedia Environ Sci*. v. 18, p. 694-702, 2013.

ALEXANDER, M. Biodegradation and bioremediation, 2nd ed., San Diego: Academic press, 453p., 1999.

ALONSO, A.; ROJO, F.; MARTÍNEZ, J.L. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* shows pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin, *Environ Microbiol*. v. 1, n. 5, p. 421-430, 1999.

ANASTASI, A.; COPPOLA, T.; PRIGIONE, V.; VARESE, G.C. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: role of laccases and peroxidases. *J Hazard Mat*. v. 165, n. 1-3, p. 1229-1233, 2009.

APHA, AWWA, WEF – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Baltimore: APHA, AWWA, WEF, 2012.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. *Sci Agric*. v. 62, n. 3, p. 286-290, 2005.

ASPRAY, T.; GLUSZEK, A.; CARVALHO, D. Effect of nitrogen amendment on respiration and respiratory quotient (RQ) in three hydrocarbon contaminated soils of different type. *Chemosphere*. v. 72, n. 6, p. 947-951, 2008.

BAGGI, G. Ecological implications of synergistic and antagonistic interactions among growth and non growth analogs present in mixture. *Ann Microbiol*. v. 50, n. 2, p. 103-115, 2000.

BENGTSSON, E.; ZERHOUNI, P. Effects of carbon substrate enrichment and DOC concentration on biodegradation of PAHs in soil. *J Appl Microbiol*. v. 94, n. 4, p. 608-617, 2003.

BORGMANN-STRAHSEN, R. Comparative assessment of different biocides in swimming pool water. *Int Biodeterior Biodegrad.* n. 51, p. 291-297, 2003.

BOJES, H.K.; POPE, P.G. Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at an exploration and production sites in Texas. *Regul Toxicol Pharmacol.* v. 47, n. 3, p. 288-295, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 18 set 2003.

CAVALCANTI T. G.; VIANA, A. A. G.; GUEDES, T. P. G.; FREIRE, A. S.; TRAVASSOS, R. A.; VASCONCELOS, U. Seed options for toxicity tests in soil contaminated with oil. *Can J Pure Appl Sci.* v. 10, n. 3, p. 4039-4045, 2016.

CHAILLAN, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y-H.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res Microbiol.* v. 155, n. 7, p. 587-595, 2004.

CHAÎNEAU, C. H.; ROUGEUX, G.; YÉPRÉMIAN, C.; OUDOT, J. Effect of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in soil. *Soil Biol Biochem.* v. 37, n. 8, p. 1490-1497, 2005.

CHAUAN, A.; FAZLURRAHMAN; OAKESHOTT, J.G.; JAIN, R.K. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Ind J Microbiol.* v. 48, n. 1, p. 95-113, 2008.

CHEN, B-Y.; CHEN, W-M.; CHANG, J-S. Optimal biostimulation strategy for phenol degradation with indigenous rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *J Hazard Mat.* v. 139, n. 2, p. 232-237, 2007.

CHEREMISINOFF, N. P.; ROSENFELD, P. The petroleum industry. In: CHEREMISINOFF, N. P.; ROSENFELD, P. Handbook of pollution prevention and cleaner production - Best practices in the petroleum industry. 1st. ed. Norwich: William Andrew, 2009. Chapter 1, p. 1-97.

CHIKERE, C.B.; OKPOKWASILI, G.C.; CHIKERE, B.O. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in soil. *Biotech.* v. 1, n. 1, p. 117-138, 2011.

CORDAZZO, C.V; ARACAMA, C.V. Influência do dimorfismo de sementes de *Senecio crassiflorus* (Poir.) DC (*Asteraceae*) na germinação e crescimento das plântulas. *Atlântica.* v. 20, n. 1, p. 121-130, 1998.

CORNELIS, P. Iron transport systems and iron homeostasis in *Pseudomonas*. In: Chakraborty, R., Braun, V., Hantke, K., Cornelis, P. (eds.) Iron uptake in bacteria with emphasis on *E. coli* and *Pseudomonas*. Springer: Dordrecht, 2013, p. 68.

DAS, P.; MA, L.Z. Pyocyanin pigment assisting biosurfactant-mediated hydrocarbon emulsification. *Int Biodeterior Biodegrad.* v. 85, p. 278-283, 2013.

DAUGULIS, A. J.; McCRACKEN, C. M. Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor by two strains of *Sphingomonas* sp. *Biotechnol Lett.* v. 25, n. 17, p. 1441-1444, 2003.

DEAN-ROSS, D.; MOODY, J.; CERNIGLIA, C.E. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated soils. *FEMS Microbiol Ecol.* v. 41, n. 1, p. 1-7, 2002.

DE VOS, D.; LIMA Jr, A.; PIRNAY, J.P.; DUINSLAEGER, L.; REVETS, H.; VANDERKELEN, A.; HAMERS, R.; CORNELIS, P. Analysis of epidemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates by isoelectric focusing of pyoverdine and RAPD-PCR: modern tools for an integrated anti-nosocomial infection strategy in burn wound centers. *Burns*, v. 23, n. 2, p. 379-386, 1997.

DUBOIS, V.; ARPIN, C.; MELON, M.; MELON, B.; ANDRE, C.; FRIGO, C.; QUENTIN, C. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of Cefepime-Amikacin therapy and analysis of β -lactam resistance. *J Clin Microbiol.* v. 39, n.6, p. 2072-2078, 2001.

EL-SHOUNY, W.A.; AL-BAIDANI, A. R. H.; HAMZA, W. T. Antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wound-infections. *Int J Pharm Med Sci.* v. 1, n. 1, p. 01-07, 2011.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: SNLCS, 1979.

FERGUSON, D.; CAHILL, O. J.; QUILTY, B. Phenotypic, molecular and antibiotic resistance profiling of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from two Irish hospitals. *J Med Biol Sci.* v. 1, p. 1-15, 2007.

FISCHER, T.; YAIR, A.; VESTE, M.; GEPPERT, H. Hydraulic properties of biological soil crusts on sand dunes studied by C-P/MAS-NMR: A comparison between an arid and a temperate site. *Cadena.* v. 110, n. 1, p. 155-160, 2013.

GENHARTDT, P.; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A.; KIEG, N.R. Methods for general and molecular bacteriology. 1st ed. Washington: American Society for microbiology, 1994. 791p.

GONG, Z.; ALEF, K.; WILKE, B-M.; LI, P. Activated carbon adsorption of PAHs from vegetable oil used in soil remediation. *J Hazard Mat.* v. 143, n. 4, p. 372-378, 2007.

HAGHSHENAS, B.; NAMI, Y.; ABDULLAH, N.; RADIAH, D.; ROSLI, R.; KHOSROUSHAHI, A.Y. Anticancer impacts of potentially probiotic acetic acid bacteria isolated from traditional dairy microbiota. *LAW – Food Sci Technol.* v. 60, p. 690-697, 2015.

HAMDI, H.; BENZARTI, S.; MANUSADŽIANAS, L.; AOYAMA, I.; JEDIDI, N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biol Biochem.* v. 39, n. 8, p. 1926-1935, 2007.

HASSANI, H. H.; HASAN, H. M.; AL-SAAD, A.; ALI, A. M.; MUHAMMAD, M. H. A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Experiment Biol.* v. 2, n. 5, p. 1389-1394, 2011.

HWANG, S.; CUTRIGHT, T.J. Effect of expandable clays and cometabolism on PAH biodegradation. *Environ Sci Pollut Res.* v. 10, n. 5, p. 277-280, 2003.

INGLEDEW, W. M.; CAMPBELL, J. J. R. A new resuspension medium for pyocyanin production. *Can J Microbiol.* v. 15, n. 6, p. 595-598, 1969.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Cienc Rural.* v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol.* v. 30, p. 1159-1168, 2014.

KANALY, R. A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol.* v. 182, n. 8, p. 2059-2057, 2000.

KOHLMEIER, S.; SMITS, T.H.M.; FORD, R.M.; KEEL, C.; HARMS, H.; WICK, L.Y. Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environ Sci Technol.* v. 39, n. 12, p. 4640-4646, 2005.

LEE, S-H; LEE, S.; KIM, D-Y.; KIM, J-G. Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. *J Hazard Mat.* v. 143, n. 1, p. 65-72, 2007.

LEE, S-H; OH, B. I.; KIM, J. G. Effect of various amendments on heavy metal oil bioremediation and soil microbial activity. *Bioresour Technol.* v. 99, n. 7, p. 2578-2587, 2008.

LEISINGER, T.; MARGRAFF, R. Secondary metabolites of the fluorescent *Pseudomonads*. *Microbiol Rev.* v. 43, p. 422-442, 1979.

LEGANI, P.; LEONI, E.; RAPUANO, S.; TURIN, D.; VALENTI, C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. *Int J food Microbiol.* v.53, n. 2-3, p. 153-158, 1999.

MAO, Y.; SUN, M.; YANG, X.; WEI, H. Remediation of organochlorine pesticides (OCPs) contaminated soil by successive hydroxypropyl- β -cyclodextrin and peanut oil enhanced soil washing–nutrient addition: a laboratory evaluation. *J Soil Sed.* v. 13, n. 2, p. 403-412, 2013.

MAVRODI, D.V.; BONSALE, R.; DELANEY, S.M.; SOULE, M.J.; PHILLIPS G.; THOMASHOW, L.S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *J Bacteriol.* v. 183, p. 6454-6465, 2001.

McNEIL, A.C. *Pseudomonas aeruginosa* urosepsis from use of a hot-water spa. *Am J Med.* v. 115, n. 7, p. 592-593, 2003.

MITTAL, A.; SINGH, P. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. *Ind J Exp Biolol.* v. 47, n. 9, p. 760-765, 2009.

MIYA, R.K.; FIRESTONE, M.K. Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *J Environ Qual.* v. 30, n. 6, p. 1911-1918, 2001.

MOHAMED, M. E.; AL-DOUSARY, M.; HAMZAH, R. Y.; FUCHS, G. Isolation and characterization of indigenous thermophilic bacteria active in natural attenuation of bio-hazardous petrochemical pollutants. *Int Biodeterior Biodegradation.* v. 58, n. 3-4, p. 213-223, 2006.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁSQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VALASCO, M.; VEJA-JARQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDONZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Appl Soil Ecol.* v. 27, n. 2, p. 165-175, 2004.

MUCKIAN, L.; GRANT, R.; DOYLE, E.; CLIPSON, N. Bacterial community structures in soil contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere.* v. 8, n. 4, p. 1535-1541, 2007.

NASCIMENTO, T.C.F.; OLIVEIRA, F.J.S.; FRANÇA, F.P. Biorremediación de um suelo tropical contaminado com resíduos aceitosos intemperizados. *Rev Int Contam Ambie.* v. 29, n. 1, p. 21-28, 2013.

NEDERLAND. Ministerie Van Volkshuisvesting Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer. Soil Protection Act, text based on the most recently published integral version of the Soil Protection Act (1996), corrected by the Bulletin of Acts, Orders and Decrees 1993 and updated by the Bulletin of Acts, Orders and Decrees 1996, 1997, 1999, 2000, 2001 and most recently amended 2005. 01 Jan 2006.

NIEPCERON, M.; MARTIN-LAURENT, F.; CRAMPON, M.; PORTET-KOLTALO, F.; AKPA-VINCESLAS, M.; LEGRAS, M.; BRU, D.; BUREAU, F.; BODILIS, J. Gammaproteobacteria as a potential bioindicator of a multiple contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils. *Environ Pollut.* v. 180, p. 199-205, 2013.

NIKOLOPOULOU, M.; KALOGERAKIS, N. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Mar Pollut Bull.* v. 56, n. 11, p. 1855-1861, 2008.

NIKOLOPOULOU, M.; PASADAKIS, N.; KALOGERAKIS, N. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophylic fertilizers. *Desalination*. v. 211, n. 1-3, p. 286-295, 2007.

ORTIZ, I.; VELASCO, A.; REVAH, S. Effect of toluene as gaseous cosubstrate in bioremediation of hydrocarbon-polluted soil. *J Hazard Mat*. v. B131, n. 1, p. 112-127, 2006.

PALITTAPONGARNPIM, M.; POKETHITIYOOK, P.; UPATHAM, E.S.; TANGBANLUEKAL, L. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. *Biodegradation*. v. 9, n. 2, p. 83-90, 1998.

RAVINDRA, K.; SOKHI, R.; VAN GRIEKEN, R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmos Environ*. v. 42, n.13, p. 2895-2921, 2008.

REYNOSO-CUERVAS, L.; GALLEGOS-MARTÍNEZ, M.E.; CRUZ-SOSA, F.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresour Technol*. v. 99, n. 14, p. 6379-6385, 2008.

SABATÉ, J.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A.M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *Int Biodegrad Biodeterior*. v. 54, n. 1, p. 19-25, 2004.

SANTOS, S.F.M. Estudo de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SAWULSKI, P.; BOOTS, B.; CLIPSON, N.; DOYLE, E. Differential degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures by indigenous microbial assemblages in soil. *Lett Appl Microbiol*. v. 61, n. 2, p. 199-207, 2015.

SCOTT-THOMAS, A.; SYHRE, M.; PATTEMOREL, P. K.; EPTON, M.; LAING, R.; PEARSON, J.; CHAMBERS, S. T. 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulmonary Med*. v. 10, p. 1-10, 2010.

SEBEL, K.; GNOUMA, A.; HERCHI, W.; SAKOUHUI, F.; BOUKHCHINA, S. Lipids, proteins, phenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of seeds of peanuts (*Arachis hypogaea* L.) cultivated in Tunisia. *Biol Res*. v. 46, n. 3, p. 257-263, 2013.

SENEVIRATNE, G.; ZAVAHIR, J. S.; BANDARA, W. M. M. S. Fungal-bacterial biofilms: their development for a novel biotechnological applications. *World J Microbiol Biotechnol*. Dordrecht. v. 24, n. 6, p. 739-743, 2008.

SEVERINO, L.S.; COSTA, F.X.; BELTRÃO, N.E.B.; LUCENA, M.A. Mineralização da torta de mamona, esterco bovino e bagaço de cana estimada pela respiração microbiana. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. v. 5, n. 1, p. 1-6, 2004.

SHAHSAVARI, E.; ADETUTU, E.M.; ANDERSON, P.A.; BALL, A.S. Plant residues - A low cost, effective bioremediation treatment for petrogenic hydrocarbon-contaminated soil. *Sci Total Environ.* v. 443, p. 766-774, 2013.

SHORTER BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 9th ed., Maryland: Williams & Wilkins, 1994.

SIJIM, D.; KRAAIJ, R.; BELFROID, A. Bioavailability in soil or sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environ Pollut.* v. 108, n. 1, p. 113-119, 2000.

STORCK, C. R.; NUNES, G. L.; OLIVEIRA, B. B.; BASSO, C. Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações. *Cienc Rural.* v. 43, n. 3, p. 537-543, 2013.

SUÁRES-ABELENDA, M.; FERREIRA, T.O.; CAMPS-ARBESTAIN, M.; RIVERA-MONROY, V.H.; MACÍAS, F.; NÓBREGA, G.N.; OTERO, X.L. The effect of nutrient-rich effluents from shrimp farming on mangrove soil carbon storage and geochemistry under semi-arid climate conditions in northern Brazil. *Geoderma.* v. 213, p. 551-559, 2014.

THENMOZHI, R.; PRAVEENKUMAR, D.; PRIYA, E.; NAGASATHY, A.; THAJUDDIN, N. Evaluation of aromatic and polycyclic hydrocarbon degrading abilities of selected bacterial isolates. *J Microbiol Biotechnol Res.* v. 2, n. 3, p. 445-449, 2012.

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

TOLUN, L.; MARTENS, D.; OKAY, O.S.; SCHRAMM, K.W. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in coastal sediments of the Izmit bay (Marmara sea): case studies before and after the Izmit earthquake. *Environ Pollut.* v. 32, n. 6, p. 758-765, 2006.

TSORAEVA, A.; MARTÍNEZ, C. R. Comparison of two culture media for selective isolation and membrane filter enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Lat Microbiol.* n. 42, p. 149-154, 2000.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 315.2. Determination of total Kjeldahl nitrogen by semi-automatic colorimetric, revision 2.0. Washington: U. S. Government Printing Office, 1993.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 8015B. Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography/Flame Ionization Detector, revision 2. Washington: U. S. Government Printing Office, 1996.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 8270C. Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 3rd ed. Washington: U. S. Government Printing Office, 1996.

VASCONCELOS, U. Tratamento microbiológico sequencial de solo proveniente de unidade de dessorção térmica. 2011. Tese (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

VASCONCELOS, U.; DE FRANÇA, F.P.; OLIVERIA, F.J.S. Removal of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *Quim Nova.* v. 34, n. 2, p. 218-221, 2011.

VASCONCELOS, U.; LIMA, M.A.G.A.; CALAZANS, G.M.T. *Pseudomonas aeruginosa* associated with negative interactions on coliform bacteria growth. *Can J Pure Appl Sci.* v. 4, n. 2, p. 1133-1139, 2010.

VASCONCELOS, U.; OLIVEIRA, F.J.S.; FRANÇA, F.P. Raw glycerol as cosubstrate on the PHAs biodegradation in soil. *Can J Pure Appl Sci.* v. 7, n. 1 p. 2203-2209, 2013.

WILCKE, W. Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soil. *Geoderma.* v. 141, n. 3-4, p. 157-166, 2007.

WU, M.; CHEN, L.; TIAN, Y.; DING, Y.; DICK, W.A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. *Environ Pollut.* v. 178, n. 7, p. 152-158, 2013.

XUE, X.; LANDIS, A. E. Eutrophication potential of food consumption patterns. *Environ Sci Technol.* v. 44, n. 12, p. 6450-6456, 2010.

YUAN, G-L.; WU, L-J.; SUN, Y.; LI, J.; LI, J-C.; WANG, G-H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of the central Tibetan Plateau, China: Distribution, sources, transport and contribution in global cycling. *Environ Pollut.* v. 203, p. 137-144, 2015.

ZAGO, V.C.P.; FONSECA, M.M.C.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. Levantamento e caracterização morfológica de isolados de *Pseudomonas* ssp. fluorescentes presentes em cultivos do SIPA- Sistema Integrado de Produção Agroecológica, seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiológica, n. 143, 2001, 35p.

ZHANG, S.; PENG, P.; HUANG, W.; LI, X.; ZHANG, G. PCDD/PCDF pollution in soils and sediments from the Pearl River delta of China. *Chemosphere.* v 75, n. 9, p. 1186-1195, 2009.

APÊNDICE A – PRODUÇÃO GERADA POR ESTA PESQUISA**Artigo publicado em periódico**

- ❖ **CAVALCANTI T. G.**; VIANA, A. A. G.; GUEDES, T. P. G.; FREIRE, A. S.; TRAVASSOS, R. A.; VASCONCELOS, U. Seed options for toxicity tests in soil contaminated with oil. *Can J Pure Appl Sci.* v. 10, n. 3, p. 4039-4045, 2016.

Artigo submetido em periódico (Waste and Biomass Valorization)

- ❖ **CAVALCANTI T. G.**; SOUZA, A. F.; FERREIRA, G. F.; SEVERINO, L. S.; MORAIS, J. P. S.; SOUSA, K. A.; VASCONCELOS, U. Use of agro-industrial waste in the removal of phenanthrene and pyrene by microbial consortia in soil

Artigo completo publicado em reunião científica

- ❖ **CAVALCANTI, T. G.**; XAVIER, R.; VIANA, A. A. G.; GUEDES T. P.; MORAIS, J. P. S.; VASCONCELOS, U. Uso de estratégias de bioaumento na remoção de hidrocarbonetos do petróleo em solo arenoso. Simpósio Nacional de Bioprocessos, 20., 2015, Fortaleza. Anais... Campinas: Galoá, 2015. v. 2.

Resumo publicado em anais de reuniões científicas

- ❖ **CAVALCANTI, T. G.**; VIANA, A. A. G.; DOURADO, R.; XAVIER, R.; ALENCAR, M.; VASCONCELOS, U. Seleção de plantas para ensaios de ecotoxicidade em estudos de biorremediação de solos contaminados por petroderivados. Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 14., 2014, João Pessoa. Anais ENAMA. Rio de Janeiro: SBM, 2014. v. 1. p. 47-2-47-2.

Apresentação de trabalhos

- ❖ **CAVALCANTI, T. G.**; VASCONCELOS, U. Remoção biológica de HPA em solo incrementado com torta de *Arachis hypogaea* L. (amendoim). 2016. XXIV Encontro de Iniciação Científica da UFPB (ENIC – João Pessoa). Apresentação de trabalho na forma Oral.
- ❖ **CAVALCANTI, T. G.**; XAVIER, R.; VIANA, A. A. G.; GUEDES T. P.; MORAIS, J. P. S.; VASCONCELOS, U. Uso de estratégias de bioaumento na remoção de hidrocarbonetos do petróleo em solo arenoso. 2015. XX Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM – Fortaleza). Apresentação de trabalho na forma de Pôster.