



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

GILANNA FALCÃO FERREIRA

**USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA REMOÇÃO DE HPA
DE UM SOLO ARENOSO**

**JOÃO PESSOA - PB
2017**

GILANNA FALCÃO FERREIRA

**USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA REMOÇÃO DE HPA
DE UM SOLO ARENOSO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Universidade Federal da Paraíba – UFPB como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha
Gomes

**JOÃO PESSOA - PB
2017**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F383u Ferreira, Gilanna Falcão.

Uso de resíduos agroindustriais na remoção de HPA de um solo arenoso / Gilanna Falcão Ferreira. - João Pessoa, 2017.

52 f. : il.

Orientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Biorremediação. 2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 3. Pseudomonas aeruginosa. I. Gomes, Ulrich Vasconcelos da Rocha. II. Título.

UFPB/BC

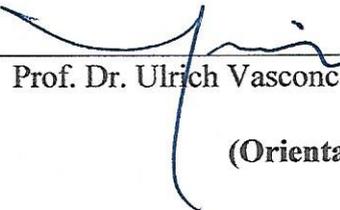
GILANNA FALCÃO FERREIRA

**USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA REMOÇÃO DE HPA DE SOLO
ARENOSO**

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.

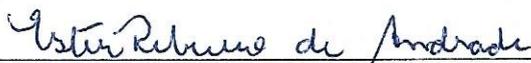
Aprovado em: 24 de novembro de 2017

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

(Orientador)



Prof.ª Dr.ª Ester Ribeiro de Andrade (DA/CB/UFPB)

(1º Examinador)



Bel. Rafael Limongi de Souza (PGBiotecM/UFPB)

(2º Examinador)

Dedico este trabalho a Nossa Senhora de Nazaré, minha padroeira, aos meus pais, que com amor imanente me incentivaram e impulsionaram a alcançar essa conquista e todos que trilharam esse caminho comigo.

AGRADECIMENTOS

Manifesto minha gratidão à Nossa Senhora de Nazaré, pela sua intercessão e graça que sempre me alcançam inexplicavelmente, de tal maneira que me fez perdurar nessa luta.

Agradeço a Deus por ser minha morada e força espiritual.

Aos meus pais, que apesar da distância do jeito deles se faziam presentes. Meu pai, Gilvan Ferreira, meu guia, força, receptáculo de amor e inspiração. E, minha rainha, Ana Cristina Moreira Falcão, dona da minha gratidão. Vocês são a força que há no meu existir.

Ao Rodrigo Prazim de Oliveira Barros, por todo seu amor e companheirismo.

Á minha irmã Gilanne da Silva Ferreira e, cunhado, Luciano Alves Vieira por abrirem a porta da sua casa e me abraçarem como filha, mesmo quando não tinham uma relação tão próxima comigo.

Não tenho nem palavras para me expressar. Agradeço, por ser uma luz na minha vida, professor, orientador e amigo, Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes. Obrigada pela oportunidade de fazer parte de um pedaço da sua vida. Obrigada pela compreensão, "puxões de orelha", apoio no meu momento de dificuldade, conversas, paciência e, principalmente, por me fazer sentir capaz. Sou imensamente grata por todos os seus ensinamentos. A maturidade acadêmica que hoje tenho devo muito a você.

Á professora Adna Cristina Barbosa de Sousa, pela atenção e carinho sempre. Por ser meu amuleto da sorte e me permitir crescimento pessoal e profissional em tão pouco tempo.

Á professora Flavia de Oliveira Paulino, pois me ensinou a ter novas perspectivas e buscar sempre além.

Á professora Sildivane Valcácia Silva, por toda ajuda, conversa, risada, dedicação a minha turma e boas lembranças que ficam para trás. Você é muito querida.

Aos demais professores do Centro de Biotecnologia, pois todos tiveram sua importância na minha graduação.

Ao Thiago Gonçalves Cavalcanti, amigo e companheiro de laboratório que doou seu tempo para me passar seus ensinamentos. Obrigada pela paciência e dedicação mesmo sem saber direito quem eu era.

Ao Rafael Xavier Martins, confidente desde o primeiro período. Amigo e irmão. Companheiro em todos os momentos difíceis, felizes e de estudo. Quando a vida uni duas pessoas assim, dificilmente separa.

Á duas pessoas que hoje não estão mais comigo nessa etapa, porém fizeram parte de uma fase muito boa da universidade que não vou esquecer. Estudos de madrugada e finais juntos. Um amor imenso por: Michelle Lima Alencar e Renã Herbert Ramos.

Á Luíse Araújo de Albuquerque Simões, Jéssica Santos Schirato Albuquerque e Luanna Pinheiro de Albuquerque Freitas Bezerra, presentes que a vida me deu. Obrigada por tornarem meus dias mais felizes.

Á uma parte muito boa da vida que me manteve vigorada, minha equipe de Nado Sincronizado: Ana Maria Miranda de Brito Caldas, Natália Maria Câmara Luna, Thaíse Bianca Mariz Guedes, Wanessa Kelly Vieira de Vasconcelos, Ana Beatriz Soares de Lira, Ana Carolina Soares de Lira, Helena Longo Fernandes Nóbrega, Viviane Fachine de Aguiar Xavier e Lara Oliveira da Costa.

Ás minhas amigas, Gersica Maria Gomes Almeida, Heloísa Dantas Alves, Marianna Pereira Dantas, Rafaela Menezes de Paiva.

Ás irmã que escolhi Anatil Maux de Souza, Camila Azevedo Leão, Ariadne Ataíde Gonçalves e Glenda Regina Filgueiras Barbosa. Obrigada por sempre estarem ao meu lado.

Aos membros da Banca por dedicarem seu tempo e contribuir com a realização de uma conquista minha

Á Universidade Federal da Paraíba, por propiciar minha formação acadêmica.

Ao CNPq por todo apoio financeiro.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”.

Augusto Branco

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- 16 HPA prioritários..... | 17 |
| Figura 2 - Localização dos minerais, bactérias e fungos no solo. | 21 |
| Figura 3 - Reator de polietileno para o ensaio de biodegradação..... | 26 |
| Figura 4 – Técnica de titulação para o ensaio de respiração microbiana. | 28 |
| Figura 5 - Estufa e Placa de Petri com sementes e papel filtro embebido pela solução do solo. | 29 |
| Figura 6 - Quantificação das bactérias heterotróficas cultiváveis com uso da torta de gergelim. | 33 |
| Figura 7 - Quantificação das bactérias heterotróficas cultiváveis com uso da torta de algodão. | 33 |
| Figura 8 - Estimativa da emissão de gás carbônico nos reatores suplementados com torta de gergelim..... | 34 |
| Figura 9 - Estimativa da emissão de gás carbônico nos reatores suplementados com torta de algodão. | 35 |
| Figura 10 - Sementes germinadas e desenvolvimentos da Brassica nigra, Cucumis anguria e Zea mays..... | 37 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos HPA: fenantreno e pireno..... | 18 |
| Tabela 2 - Vantagens e Desvantagens da biorremediação..... | 20 |
| Tabela 3 - Descrição dos microrganismos utilizados no processo de biorremediação..... | 22 |
| Tabela 4 - Propriedades do solo e óleo contaminante do experimento de biodegradação. | 25 |
| Tabela 5 - Características das tortas empregadas como cossustrato..... | 25 |
| Tabela 6 - Condições dos ensaios..... | 26 |
| Tabela 7 - Média da degradação do fenantreno e pireno pelos diferentes consórcios na presença dos cossustratos*. | 32 |
| Tabela 8 - Índice de germinação (%) das sementes antes e após a biorremediação associada à suplementação da Torta de Algodão. | 35 |
| Tabela 9 – Índice de germinação (%) das sementes antes e após a biorremediação associada à suplementação da Torta de Gergelim. | 36 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|---|
| HPA | Hidrocarboneto Policíclico Aromático |
| HPA-AMM | Hidrocarboneto Policíclico Aromático de alta massa molecular |
| HPA-BMM | Hidrocarboneto Policíclico Aromático de baixa massa molecular |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| CRA | Capacidade de Retenção de Água |
| TPH | Total petroleum hydrocarbons (Hidrocarbonetos Totais do Petróleo) |
| USEPA | Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos |
| Ig | Índice de Germinação |
| TCG | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| RX | <i>Burkholderia cepacia</i> |
| PIR | Pireno |
| FEN | Fenantreno |

OBSERVAÇÃO: As siglas, abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho que não constam nesta pauta, apresentam-se descritas no texto e/ou são convenções que seguem o Sistema Internacional de Unidades (S.I).

FERREIRA, Gilanna Falcão. Uso de resíduos agroindustriais na remoção de HPA de um solo. João Pessoa, 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2017

RESUMO

O globo terrestre é afetado por inúmeros problemas de ordem ecossistêmica. Nas últimas décadas, os impactos que envolvem derramamentos de petróleo chamam à atenção e, configuram um cenário de discussão e preocupação socioambiental. Em virtude dessa realidade, o processo de biorremediação qualifica uma eficiente alternativa em que visa acelerar a taxa de biodegradação de inúmeros xenobióticos. No contexto dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, HPA, duas estratégias de biorremediação de solos podem ser empregadas: a primeira envolve o estímulo da microbiota, quando a relação C:N:P se encontra prejudicada e a segunda estratégia trata do aumento da microbiota, quando a densidade microbiana não é suficiente para manter a degradação de forma eficiente, diretamente relacionada à concentração e natureza do contaminante e seus metabólitos. De modo geral, baseia-se no estímulo da atividade metabólica dos micro-organismos, permitindo a conversão dos contaminantes em metabólitos e biomassa em um espaço de tempo reduzido. Organismos do grupo das pseudomonadas destacam-se pela sua versatilidade nutricional, sendo potenciais candidatos a biorremediação. A esse despeito, a relevância deste trabalho foi analisar a remoção de dois HPA utilizando um consórcio formado por uma linhagem de bactérias pseudomonadas, associada à adição de torta de semente de *Gossypium* sp (algodão) e *Sesamum indicum* L. (gergelim) Foi utilizado um consórcio formado por 4 linhagens pseudomonadas, isolados de ambientes historicamente impactados, posteriormente transferidos para reatores contendo 250 g de solo, contaminado por 10 ou 20 mL de óleo lubrificante e suplementados com 5 ou 10 g de torta de algodão ou gergelim. Após 60 dias de processo, os HPA foram removidos aproximadamente 65 e 80% do fenantreno e 79 a 81% do pireno, considerando as perdas abióticas de 11,7 e 12,6%, respectivamente nas duas condições de contaminação por óleo testadas. As tortas de algodão e gergelim desempenharam um papel fundamental na remoção dos HPA, independentemente da quantidade suplementada ao solo, permitindo que a população se mantivesse alta do início ao final do processo. Um teste complementar de respiração microbiana comprovou estes resultados. Os ensaios de fitotoxicidade revelaram *Cucumis Anguria* como o melhor indicador de remoção dos HPA.

Palavras chave: Biorremediação, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, *Pseudomonas aeruginosa* *Bulkkholderia cepacia*, Resíduo.

FERREIRA, Gilanna Falcão. Use of agro-industrial wastes in the removal of PAH from a soil. João Pessoa, 2017. Course Completion Work (Biotechnology) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2017

ABSTRACT

Planet Earth is affected in several ecosystem problems. In the last decades, the impacts that involve oil spills have been attracting attention and constitute a scenario of discussion and socioenvironmental concern. Due to this reality, bioremediation may represent an efficient alternative aiming to accelerate the rate of biodegradation of a myriad of xenobiotics. In the context of polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH, two strategies of soil bioremediation may be employed: the first involves the stimulation of the microbiota, when the C: N: P ratio is impaired. The second strategy deals with the increase of the microbiota, when microbial density is not suitable to maintain degradation efficiently and it is related to the concentration and nature of the contaminant and its metabolites. In general, it is based on the stimulation of the metabolic activity of the microorganisms, allowing the conversion of the contaminants into metabolites and biomass in a reduced period. Organisms of the group of pseudomonads stand out for their nutritional versatility, being potential candidates for bioremediation. In spite of this, the relevance of this work was to analyze the removal of two PAH using consortia formed by strains of pseudomonad bacteria, associated to the addition of *Gossypium* sp (cotton) seed cake and *Sesamum indicum* L. (sesame). The consortia were formed by 4 pseudomonads strains, isolated from historically impacted environments, later transferred to reactors containing 250 g of soil, contaminated with 10 or 20 mL of lubricating oil and supplemented with 5 or 10 g of cotton or sesame pie. After 60 days of the process, the HPA were removed approximately 65 and 80% of the phenanthrene and 79 to 81% of the pyrene, considering the abiotic losses of 11.7 and 12.6% respectively in the two oil contamination conditions tested. Cotton and sesame cakes played a key role in the removal of HPA, regardless of the amount supplemented to the soil, allowing the population to remain high from the beginning to the end of the process. A complementary microbial breath test proved these results. Phytotoxicity assays revealed *Cucumis anguria* as the best indicator of HPA removal.

Key words: Bioremediation, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bulkholderia cepacia*, Residue.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1.INTRODUÇÃO | 14 |
| 2.OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 Objetivo Geral | 16 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 16 |
| 3.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 17 |
| 3.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos | 17 |
| 3.2 Biorremediação | 19 |
| 3.3. Bacilos Gram-negativos degradadores de hidrocarbonetos | 20 |
| 3.4. Reuso de resíduos | 23 |
| 4. METODOLOGIA..... | 24 |
| 4.1. Consórcios microbianos | 24 |
| 4.2 Caracterização do solo, contaminante e cossustratos | 24 |
| 4.3 Ensaio de biodegradação dos HPA..... | 25 |
| 4.4 Análises microbiológicas | 28 |
| 4.5 Ensaio de Fitotoxicidade..... | 29 |
| 4.6 Análise estatística | 30 |
| 5. RESULTADOS | 31 |
| 5.1. Caracterização do solo, contaminante e cossustratos | 31 |
| 5.2. Ensaio de Biodegradação dos HPA | 31 |
| 5.3. Quantificação microbiana..... | 32 |
| 5.4. Respiração Microbiana | 34 |
| 5.5. Ensaio de Fitotoxicidade..... | 35 |
| 6. DISCUSSÃO | 38 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 42 |
| REFERENCIAS..... | 43 |
| APÊNDICE A – PRODUÇÕES DE PESQUISA..... | 52 |

1. INTRODUÇÃO

A qualidade ambiental é pauta de discussão mundial, já que diretamente está associada a provisão de matéria prima como base da cadeia produtiva e demanda econômica da atual sociedade. Portanto, eminentemente confronta-se a qualidade de vida das pessoas à manutenção da condição do ecossistema como um todo, seja da água, solo ou atmosfera (AGOSTINI JÚNIOR, I., 2016).

Nesse contexto, a heterogeneidade e complexidade biológica do solo favorece a sustentabilidade de diversos ecossistemas (LEE et al., 2008). E, suas propriedades químicas, físicas e biológicas correm o risco de serem radicalmente modificadas por efeito de derramamentos de óleo, vazamentos, resíduos, dentre outros (JOHN et al., 2011). Além disso, sabe-se que os solos poluídos por hidrocarbonetos também atingem a saúde humana (MERKL et al., 2005; CASADO et al., 2015). Sendo assim, tal como o contentamento humano e o meio ambiente, podem ser acometidos pela produção de petróleo (AKPOR et al., 2007; TANG et al., 2012).

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), são originados naturalmente e de forma contínua por meio da combustão incompleta da matéria orgânica, tais como: resíduos vegetais, madeira, dentre outros (PAGE et al., 1999). Estima-se que incêndios florestas e de campo, do mesmo modo que a combustão de combustíveis fósseis são os principais responsáveis pela procedência desses compostos na natureza. No entanto, a literatura relata que a ação humana é a maior fonte de origem dos HPA no ambiente (YUNKER et al., 2002; SISINNO et al., 2003). No âmbito da exploração e processamento, por exemplo, o petróleo precisa ser transportado. E, tal ação, presumivelmente conjectura acidentes, derramamentos e vazamento de HPA por efeito do homem. (AKPOR et al., 2007; TANG et al., 2012).

A degradação natural de compostos químicos pode acontecer tanto por processos físico-químicos, como por ação biológica. Trabalhos na área da biotecnologia desvelam fungos e bactérias como principais micro-organismos competentes na catabolização de moléculas recalcitrantes (BALAN, et al., 2001). Sugerindo, então, um processo de biorremediação que contempla a recuperação do solo por reações microbianas (LEE et al., 2008). Diversos micro-organismos podem ser empregados nesse processo, tais como: *Mycobacterium* sp., *Haemophilus* sp., *Rhodococcus* sp., *Paenibacillus* sp e *Pseudomonas* sp. (SHRIVASTAVA et al., 2004; MILLER et al., 2016).

Pesquisas revelam que a medida que os efeitos negativos do contato do solo com o petróleo se agravam em virtude do tempo de exposição. Como resultado, a

acessibilidade, biodisponibilidade, toxicidade biológica e biodegradação dos compostos de hidrocarbonetos retidos decaem (SEMPLE et al. 2004; CASTIGLIONE et al. 2016). Dessa maneira, estratégias de biorremediação para retirada dos hidrocarbonetos do petróleo podem ser afetadas devido a biodisponibilidade cerceada e demais consequências do envelhecimento presente que sucedem uma diminuição da eficiência de biodegradação (TANG et al., 2012).

A agricultura, espelha um dos principais pilares da economia brasileira. É mundialmente conhecida por se alicerçar na produção e exportação de diversos produtos, dentre os quais pode-se destacar: o café, soja e açúcar de cana. Porém, tal manufaturaçãõ gera grandes quantidades de resíduos. A tentativa de reverter essa situação e tornar mais efetiva a utilização desses sobejos, cuja presença no meio ambiente representa um problema de poluição, já é uma realidade (UENOJO, M.; PASTORE, G. M. 2007).

Dentro da indústria de óleos vegetais as tortas de prensagens são consideradas coprodutos com baixo valor de custo, sendo ou utilizadas como ração animal ou desprezadas no meio ambiente (SARKIS et al., 2014). Facultando, portanto, mais um resíduo ecossistêmico sem destinação esclarecida.

Logo, levando em consideração esse contexto, uma das aplicações em potencial desses resíduos, pode ser a utilização como cossustratos em processos de remoção de hidrocarbonetos recalcitrantes do solo, como os HPA. E baseado nessa premissa, o objetivo deste trabalho foi analisar a remoção de dois HPA utilizando um consórcio formado por uma linhagem de bactérias pseudomônades, associado à adição de torta de semente de algodão e gergelim (LINS et al., 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Remover Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos do solo por processo de estratégias de biorremediação, servindo-se da adição de coprodutos agropastoris na função de cossustratos.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Investigar o uso de culturas em consórcio de bactérias sobre a remoção de fenantreno e pireno na presença de cossustratos;
- ❖ Monitorar o processo de biorremediação do solo por meio de quantificação microbiana, dióxido de carbono produzido e degradação de fenantreno e pireno;
- ❖ Avaliar a fitotoxicidade dos contaminante antes e após o tratamento microbiológico.

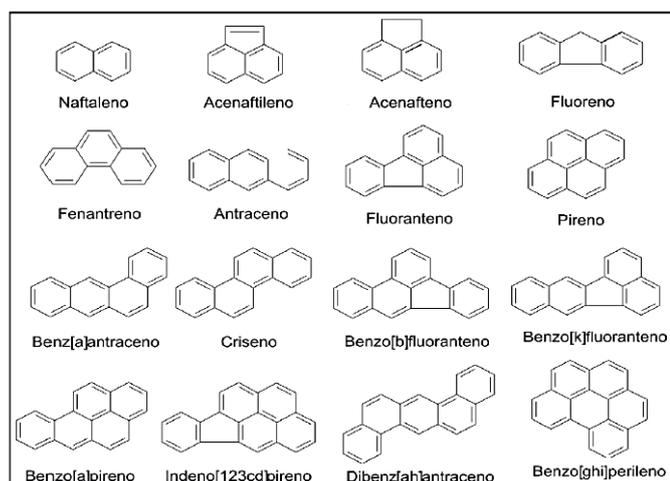
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

O petróleo puro apresenta em sua constituição uma cadeia de hidrocarbonetos das quais porções leves formam os gases e as frações pesadas o óleo natural. Por este motivo, o petróleo é classificado como uma mistura complexa de hidrocarbonetos sólidos, líquidos e gasosos (CORRÊA, 2003). As moléculas presentes no óleo pertencem a quatro grupos: alifáticos, aromáticos, resinas e asfaltenos. Quando comparadas, as duas primeiras são mais leves, e as segundas frações mais pesadas. Os compostos aromáticos, suscitam hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis, tais como, o benzeno, tolueno, etilbenzeno, isômeros de xileno (BTEX) e os HPA, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (BALBA et al., 1998).

Os HPA constituem uma família de compostos representados por dois ou mais anéis condensados e integrados, em que podem estar organizados em arranjos lineares, angulares ou agrupados (MEIRE et al., 2007; NETTO et al., 2000). Variam desde a estrutura simples como o naftaleno à moléculas complexas como o benzeno[a]pireno (CERNIGLIA, 1984; GIBSON et al., 1984; WEISSENFELS et al., 1990). Em virtude da viabilidade da combinação de um número variante de anéis que podem se ligar em diferentes pontos entre si, existem hoje mais de 100 HPA reconhecidos pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (JACQUES et al., 2007). Porém, de acordo com a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA- *Environment Protection Agency*) apenas 16 HPA são considerados essencialmente significativos no controle ambiental de poluentes orgânicos (Figura 1) (MEIRE et al., 2007).

Figura 1- 16 HPA prioritários.



Fonte: Meire, Azeredo e Torres (2007)

Como pode ser visto na Tabela 1, a solubilidade dos HPA, está inversamente relacionada à sua massa molecular, pois diminui a partir do aumento no número de anéis. Essa relação também trata a volatilidade dessa classe de substâncias, na qual compostos com menores pesos moleculares têm elevada pressão de vapor e, portanto, ampla dispersão no meio ambiente. Além disso, apresentam características lipofílicas, apontados como moderadamente e altamente lipossolúveis (NETTO et al., 2000; BRITO et al., 2006).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos HPA: fenantreno e pireno.

| HPA | Nº de anéis | MM (g.mol ⁻¹) | S (mg. L ⁻¹) | PV (Pa) |
|------------|-------------|---------------------------|--------------------------|---------|
| Fenantreno | 3 | 178 | 1,1 | 0,02 |
| Pireno | 4 | 202 | 0,132 | 0,0006 |

*MM – Massa molecular (g.mol⁻¹), S – Solubilidade (mg. L⁻¹), PV – Pressão de Vapor (Pa-pascal).
Fonte: Adaptado de Latimer e Zheng (2003).

Esses elementos são considerados uma classe de poluentes orgânicos prioritários em estudos sobre o ambiente, a julgar por um determinado número desses contaminantes serem descritos como precursores de ações mutagênicas ou tumorais em sistemas biológicos. Sua natureza lipossolúvel permite uma fácil assimilação no organismo via: inalação, exposição oral e/ou dérmica, em que de modo consequente e posterior à desguarda pode-se evidenciar concentração do composto discutido no organismo do receptor (JACQUES et al., 2007). Pesquisas sobre a retenção de HPA mostram que, em ratos, 30 a 50% de dose oral de benzeno (a) pireno e pireno são naturalmente absorvidas e facilmente metabolizadas no fígado. Constatando, também, que benzeno (a) pireno, fenantreno e pireno internam-se rapidamente na pele do camundongo (FOTH, et al., 1988; WITHEY et al., 1993; SANDERS et al., 1984; YANG et al., 1986).

De modo geral, tanto os HPA quanto seus derivados podem estar vinculados ao aumento da ocorrência de diversos tipos de tumores no homem. Sendo assim, expõe-se um contexto de controle ambiental com relevância não só aos organismos vivos nos locais atingidos, englobando plantas e micro-organismos, como à saúde pública (MERKL et al., 2005; CASADO et al., 2015; PENG et al., 2009).

Estudos relatam que sua exposição vem sendo associada ao crescente risco de várias doenças cardiovasculares e respiratórias, implicando o câncer no pulmão e problemas que compreendem o sistema neuronal (ZHANG et al., 2014; ZHANG et al., 2013; KREWSKI et al., 2003).

A literatura trata que as maiores emissões advêm de processos industriais, por exemplo, produção de aço e alumínio, exaustão de incineradores de rejeito, resíduos sólidos industriais, atividades petroquímicas, tal como a efusão direta de seus produtos e derivados em receptáculos como lagos, rios e oceanos (PAGE et al., 1999; YUNKER et al., 2002 e SISINNO et al., 2003). Convertendo-os à uma fonte de contaminação tanto do solo como da água (DA SILVA et al., 2015).

Quando o contaminante entra em contato com o solo, três fases características podem ser representadas: dissolvida, líquida e gasosa. Uma parte, possivelmente, dissolve-se na água dos lençóis freáticos, outra retém-se nas porosidades do solo em sua forma líquida e, uma terceira fração, evaporada e suscetível à contaminação atmosférica (NADIM et al., 2000).

As organizações químicas dos poluentes orgânicos têm relação com a metabolização deles por micro-organismo, especialmente, no caso das taxas e extensões de biodegradação. Alguns são precipitadamente degradados quando comparados com as moléculas recalcitrantes (ATLAS, 1981). Além disso, o sistema ativo das enzimas que são produzidas pela microbiota degradadora pode reconhecer e usar os compostos xenobióticos como possível fonte de nutrientes e energia (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005). Os HPA são biotransformados em metabólitos menos complexos, ou seja, intermediários ou mineralizados em H₂O e CO₂ (HARITASH et al., 2009).

3.2 Biorremediação

A biorremediação pode ser definida por um conjunto de técnicas e tecnologias em que plantas, micro-organismos e produtos biológicos (enzimas) são utilizados para remover ou remediar contaminantes ambientais. De modo geral, o intuito é suceder uma mineralização que resulta em substâncias inertes como a água e o dióxido de carbono (DIAS, 2000). Além disso, comparada aos métodos químicos e físicos, a biorremediação é apontada como uma estratégia mais eficaz, segura e barata. Em se tratando do solo, mostra-se ecologicamente mais satisfatória e eficiente na atenuação da poluição por contaminantes orgânicos (RIZZO et al., 2006). A tabela 2 especifica as vantagens e desvantagens do processo de biorremediação.

As limitações da biodegradação variam, principalmente, de acordo com a aeração, disponibilidade de nutrientes, umidade, pH, temperatura, contaminação microbiana e estrutura química do composto (HARITASH et al., 2009). Essas condições, influenciam diretamente em dois pontos: no crescimento e atividade microbiana e as propriedades químicas e físicas do poluente (PROVIDENTI et al., 1993).

Há uma real dificuldade em prever um padrão de comportamento desse método, haja vista que diferentes condições ambientais - solo/poluinte/microbiota-, são propostas. E, por este motivo, os efeitos interativos podem ser previsíveis ou não. Assim, uma necessidade de otimização dos fatores é imprescindível para o êxito do processo (PROVIDENTI et al., 1993).

Tratando-se da remoção de HPA em solos, duas estratégias podem ser empregadas: a *ex-situ* ou *in-situ* (NANO et al., 2003). Elas são aplicadas, conforme o poluente, custos do processo e, sobretudo, a concentração final do contaminante (SOUSA, 2016). As técnicas *in-situ* são conduzidas no próprio local de contaminação e, geralmente, implicam no aumento da atividade microbiana nativa. Já os métodos *ex-situ* restringem-se ao processo de remoção, distante do local impactado e, em geral, é mais vantajoso porque existe um maior controle das condições ambientais (CARDOSO et al., 1992).

De acordo com as informações já apresentadas, os HPA no solo, podem sofrer adsorção, volatilização, fotólise e degradação química. Apesar dessas propriedades, a decomposição microbiana ainda é considerada o processo mais relevante de degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (HARITASH et al., 2009).

Tabela 2 - Vantagens e Desvantagens da biorremediação.

| Vantagens | Desvantagens |
|---|--|
| Baixo custo | Longa duração |
| Tratamento no local contaminado | Necessita conhecimento e histórico do local contaminado |
| Sem adição de produto químico | Degradação pode ser incompleta |
| Aplicável a uma grande variedade de contaminantes | Presença de diferentes compostos alguns podem ser adsorvidos no solo |

Fonte: Adaptado de Cardoso, Tsai e Neves (1992).

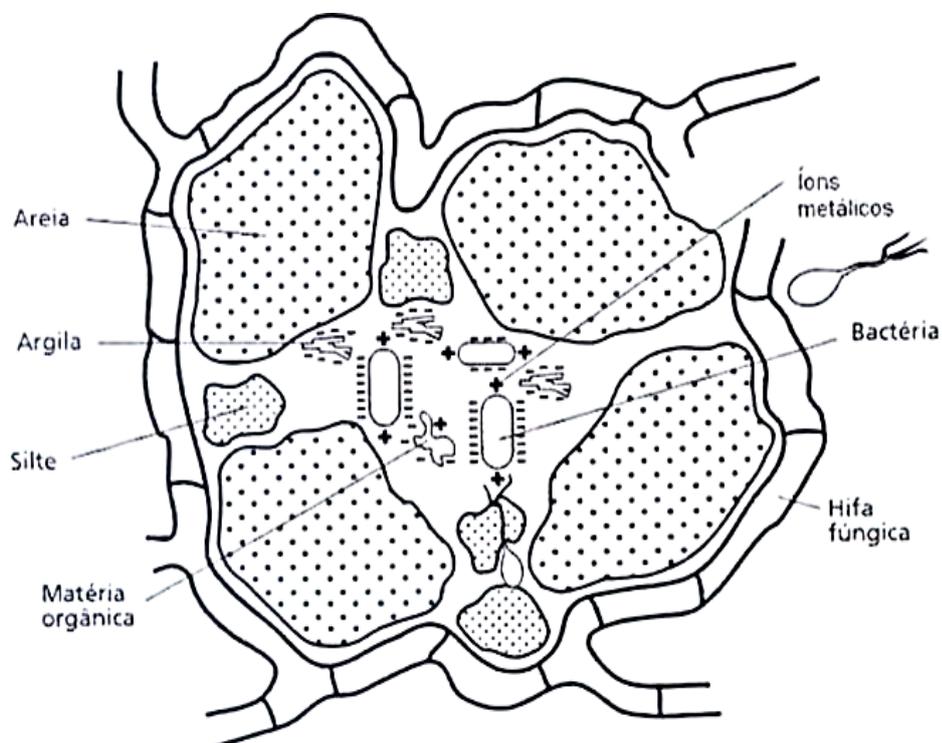
3.3. Bacilos Gram-negativos degradadores de hidrocarbonetos

Segundo Bushnell e Haas (1941), o primeiro estudo que mostrou o uso dos hidrocarbonetos por parte dos micro-organismos ocorreu em 1906 por Sohnger e Kaserer. Aproximadamente, em 1913, Sohnger constatou que os gêneros, principalmente estudados, *Mycobacterium* e *Pseudomonas* eram capazes de oxidar a gasolina em querosene e óleo de parafina a dióxido de carbono e água.

Apesar de se encontrar fungos, protozoários e algas no solo, as mais relatadas são as bactérias (METTING, 1993). De modo geral, os micro-organismo atingem, em

média, 0,5% da porosidade da zona porosa do solo. Os poros com pouco micrômetros (2 a 6 μm) são oportunos para presença de bactérias, ao mesmo tempo que os fungos necessitam de poros maiores como mostra a Figura 2 (MOREIRA, 2006).

Figura 2 - Localização dos minerais, bactérias e fungos no solo.



Fonte: Moreira (2016).

Jacques et al., 2007, Cunha e Leite (2000) e Karamalids et al., 2010 listaram para cada tipo de contaminantes diferentes organismos. Pode-se identificar essa relação na Tabela 3. Os dados, confirmam que *Pseudomonas aeruginosa* é uma espécie com potencial para uso na biorremediação, uma vez que seu uso foi reportado em todos os contaminates evidenciados. A bactéria pode fazer uso de mais de 90 compostos orgânicos como fonte de carbono e desenvolver-se em ambientes hostis (SHRIVASTAVA et al., 2004). Entretanto, ressalta-se que espécies de *Bulkholderia* também possuem grande potencial como agentes de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo (BACOSA, H; SUTO, K e INOUE, C, 2010).

Tabela 3 - Descrição dos microrganismos utilizados no processo de biorremediação.

| Contaminantes | Espécie | Domínio Filogenético | Fonte |
|---------------------------------|--------------------------------|----------------------|---------------------------|
| Hidrocarbonetos | <i>Pseudomonas</i> sp. | Bactérias | Jacques et al., (2007) |
| | <i>Aeromonas</i> sp. | | |
| | <i>Beijerinckia</i> sp. | | |
| | <i>Flavobacterium</i> sp. | | |
| | <i>Nocardia</i> sp. | | |
| | <i>Corynebacterium</i> sp. | | |
| | <i>Sphingomonas</i> sp. | | |
| | <i>Mycobacterium</i> sp. | | |
| | <i>Stenotrophomonas</i> sp. | | |
| | <i>Paracoccus</i> sp. | | |
| Gasolina | <i>Pseudomonas putida</i> | Bactérias | Cunha e Leite (2000) |
| | <i>Burkholderia cepacia</i> | | |
| | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | | |
| Gasolina, óleo diesel, óleo cru | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Bactérias | Karamalids et al., (2010) |

Fonte: Adaptado de Jacques et al., 2007; Cunha e Leite (2000); Karamalids et al.; 2010 e Vieira et al., 2006.

O papel dos microrganismos no processo de biorremediação pode ser dividido em primário e secundário. Os micro-organismos primários metabolizam o substrato principal fornecido ao sistema. Já os microrganismos secundários utilizam os produtos liberados pelos primeiros, caracterizando o fenômeno de cometabolismo (GRADY, 1985). A exemplo disto, Richard e Vogel (1999), realizaram um experimento com um consórcio *Pseudomonas* sp. e *Achrombacter* sp e, após 50 dias de incubação, 90% do diesel inicial tinha sido degradado, não sendo detectado compostos aromáticos ao final.

O conhecimento desenvolvido sobre culturas mistas prova que são vantajosas ao serem equiparadas com culturas puras. O produto metabólico pode ser degradado por uma espécie e a ação de outro microrganismo pode resultar na completa decomposição do produto (KATAOKA, 2001). Os ganhos com o uso de culturas mistas podem apontar vários benefícios: maior produtividade, estabilidade, combinações genéticas e redução na intervenção de engenharia genética (BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991). Contudo, o principal desafio é usar a capacidade dos micro-organismos, em degradar a matéria orgânica tóxica de origem natural e/ou sintética (DIAS, 2000).

3.4. Reuso de resíduos

Os microrganismos, de forma geral, carecem de fontes de nutrientes e de um aceptor final de elétrons para garantir sua persistência no ambiente. Os micro-organismos relacionados ao processo de biorremediação, utilizam o oxigênio como aceptor final de elétrons e o carbono orgânico, originado dos contaminantes, como fonte primária de carbono. Neste contexto, o nitrogênio, fósforo e potássio são os essenciais nutrientes inorgânicos acrescidos ao processo de biorremediação (RIZZO et al., 2006). Mas, a microbiota do solo pode necessitar de fonte de carbono diferente do hidrocarboneto presente e neste contexto, diferentes materiais podem ser suplementados (CARDOSO, 1992).

Quando a relação C:N:P está afetada, admite-se a utilização de fertilizantes e cossustratos, uma vez que a microbiota está afetada e concentração celular presente não se encontra hábil para o processo natural ocorrer (VASCONCELOS, DE FRANÇA e OLIVEIRA, 2011). Em vista do que foi exposto, essa relação é estabelecida no intuito de evitar limitações nutricionais durante o tratamento biológico, podendo resultar num aumento das taxas de degradação do contaminante no solo (ATAGANA et al., 2003).

Existe uma demanda no desenvolvimento de tecnologias que resolvam o acúmulo e descarte de resíduos agroindustriais no ambiente (PIMENTA et al., 2015). Nessas circunstâncias, um dos princípios que norteiam os processos biotecnológicos: a agregação do reuso de resíduos agroindustriais. Pois, o uso dessas biomassas como fonte de carbono é economicamente viável e vantajoso, além de favorecer uma valorização econômica dos coprodutos de baixo valor (SANTOS et al., 2014). Cabe ressaltar que as potencialidades nutricionais e econômicas dos resíduos (tortas ou farelos) do processamento de oleaginosas são mais conhecidas em certas plantas, tais como soja, e girassol, portanto são relevantes os estudos sobre a torta de algodão e gergelim (ABDALLA et al., 2008). Além disso, a utilização de coprodutos pode ter uma aplicação mais generosa quando se trata da suplementação nos processos de biorremediação. Positivamente, conduzindo problemas ambientais importantes do século XXI, sendo: a eliminação de contaminantes e o reuso de coprodutos industriais (MACHADO et al., 2017).

4. METODOLOGIA

4.1. Consórcios microbianos

Em trabalhos anteriores do Laboratório de Microbiologia do Centro de Biotecnologia, teste de antagonismo foram realizados. E assim, dois diferentes consórcios formado por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (representadas pela sigla TGC) e *Burkholderia cepacia* (representadas pela sigla RX) foram selecionados para o atual estudo. O consórcio 1 foi formado por quatro linhagens, TGC01, RX10, RX05 e RX06. O consórcio 2 era composto por duas linhagens, TGC 07 e RX08.

Todos os micro-organismos do estudo, foram isolados de postos de gasolina e de embalagens de produtos para alisamento ou descoloração de cabelos, depositados na coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA/CBIOTEC/UFPB).

4.2 Caracterização do solo, contaminante e cossustratos

Foi utilizado um solo arenoso, coletado de região próxima a um manguezal, com histórico de contaminação por petroderivados. Os ensaios de caracterização de hidrocarbonetos totais presentes e os 16 HPA prioritários foram realizados no laboratório Bioagri Ambiental (Paulista-PE), utilizando metodologias da agência ambiental estadunidense (USEPA) (Tabela 4).

O contaminante utilizado consistia uma mistura de óleo lubrificante usado, adquirido em um estabelecimento de troca de óleo na cidade de João Pessoa. Os ensaios de caracterização do óleo também foram feitos no laboratório Bioagri Ambiental (Paulista-PE), utilizando metodologias da agência ambiental estadunidense (USEPA) (Tabela 4).

Os cossustratos do processo foram as tortas resultantes do processamento de sementes de algodão e gergelim para obtenção do óleo. O material foi gentilmente cedido e caracterizado pela Embrapa-Algodão, no município de Campina Grande – PB (Tabela 5).

Tabela 4 - Propriedades do solo e óleo contaminante do experimento de biodegradação.

| Propriedades | Solo ¹ | Óleo Lubrificante ¹ |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| pH em Água | 7,9 ± 0,1 | --- |
| CRA (%) | 49,9 ± 0,1 | --- |
| Umidade (%) | 16,1 ± 0,1 | --- |
| Nitrogênio total (%) | 2.365,0 | --- |
| Densidade (g/ml) | --- | 1,0095 |
| Percentual de Sólidos | 87,3 | 97,4 |
| TPH (mg. Kg ⁻¹) | | |
| Faixa Gasolina (C8-11) | <229 | <10.226 |
| Faixa Querosene (C11-14) | <229 | <10.226 |
| Faixa Diesel (C14-20) | <229 | <10.226 |
| Óleo Lubrificante | 11.543 | 445.000 |
| TPH total | 11.664 | 448.000 |
| 16 HPA total (mg. Kg ⁻¹) | 0,77 | 50,1 |
| Naftaleno (mg. Kg ⁻¹) | 0,60 | 45,3 |
| Fenantreno (mg. Kg ⁻¹) | 0,03 | 2,10 |
| Pireno (mg. Kg ⁻¹) | <0,01 | 2,73 |

CRA- Capacidade de retenção de água. TPH – hidrocarbonetos totais do petróleo. HPA– hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. n.a. – não se aplica. 1 caracterizado por Bioagri ambiental. 2 Caracterizados por Embrapa Agroindústria Ambiental. * Apenas 3 HPA foram detectados em concentrações significativa.

Tabela 5 - Características das tortas empregadas como cossustrato.

| Propriedade/Analito | Torta Gergelim | Torta Algodão |
|----------------------|----------------|---------------|
| Carbono Total (%) | 48,5±1,3 | 52.8±3.3 |
| Nitrogênio total (%) | 5,6±0,5 | 6.4±0.6 |

4.3 Ensaios de biodegradação dos HPA

O ensaio foi conduzido em duplicata e reatores de polietileno transparente (Figura 3) com capacidade para 500 mL, adicionado de 250 g de solo. As condições dos reatores estão representadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições dos ensaios.

| Reatores | Óleo (ml) | Tortas (g) |
|------------------------|-----------|------------|
| 1 | 10 | 5 |
| 2 | 20 | 5 |
| 3 | 10 | 10 |
| 4 | 20 | 10 |
| 9 – Controle abiótico | 10 | 0 |
| 10 – Controle abiótico | 20 | 0 |

Figura 3 - Reator de polietileno para o ensaio de biodegradação.

Fonte: Autora.

O pré-inóculo dos consórcios foi preparado empregando a técnica dos blocos de gelose descrito por Vasconcelos, Lima e Calazans (2010). Suspensões de culturas recentes de cada linhagem do consórcio foram preparadas com solução salina de NaCl 0,85% e aplicadas sob forma de tapete na superfície de Ágar Nutriente, disposto em placas de Petri previamente esterilizadas. A incubação ocorreu à 30°C por 24h. Em seguida 4 blocos por linhagem, medindo 6 mm de diâmetro por 2 mm de altura foram cortados e transferidos para Erlenmeyer contendo 100 mL de Meio Mineral Mínimo, de composição: K_2HPO_4 (0,5g/L); $(NH_4)_2SO_4$ (0,5 g/L); $MgSO_4$ (0,5 g/L), $FeCl_2$ (10 mg/L); $CaCl_2$ (10 mg/L); $MnCl_2$ (0,1 mg/L) e $ZnSO_4$ (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). Cada bloco apresentava uma concentração celular de $\approx 95 \pm 4 \times 10^8$ UFC/cm². A incubação foi conduzida sob agitação por 24h e 30°C.

Para cada consórcio foi empregada uma torta escolhida aleatoriamente. Os reatores contendo o consórcio 1 receberam torta de algodão e os reatores com o consórcio 2, a torta de gergelim.

O ensaio perdurou 60 dias, conduzido à temperatura de 25°C. O volume de suspensão do consórcio adicionado correspondeu a 5% do volume de solo adicionado no reator (10 mL). Os fatores estudados foram a concentração do contaminante (razões solo/óleo 1:25 e 1:12,5) e do cossubstrato (razões solo/torta 1:5 e 1:10).

Para garantir o suprimento de oxigênio, o solo foi regularmente aerado por meio de revolvimento a cada abertura durante os ensaios microbiológicos. Os valores de pH e umidade em base seca foram monitorados por metodologias da EMBRAPA (1979). Tratando-se do pH, inicialmente 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 estimado, em potenciômetro com soluções padrão com pH 4,00 e 7,00 (LABMETER pH 5-3B).

Com relação à determinação da umidade em base seca, amostras do solo foram transferidas para cadinhos de porcelana de massa conhecida e após a pesagem inicial, os sistemas foram levados para estufa à 85°C por 24 h (SOLAB, SL-100). A umidade foi calculada como a diferença entre o peso úmido e o peso seco e expressado em percentual de acordo com a Equação 1. O ensaio foi conduzido em triplicata.

$$U = [(m_i - m_f) / m_i] \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

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 para determinação do teor dos três HPA no solo foram realizadas pelo Laboratório Analytical Technology em Recife-PE, empregando métodos da USEPA. Para calcular as perdas abióticas, os reatores controles foram mantidos estéreis por adição de uma solução nitrato de prata 10% (m/m).

4.4 Análises microbiológicas

Os ensaios de quantificação microbiana nos reatores ocorreram nos tempos: 1, 10, 30 e 60 dias, utilizando a técnica do *Pour plate* e ágar nutriente como meio. Uma amostra de 10 g do solo foi misturada à solução salina e após diluições decimais seriadas, o volume de 0,1 mL foi distribuído nas placas de Petri, sendo incubadas por 48h à 30°C. Os resultados foram expressos em UFC/g, unidades formadoras de colônia por grama de solo (GENHARDT *et al.*, 1994).

Para o ensaio de respiração microbiana foi empregada a técnica descrita por Severino *et al.* (2004), baseada na titulação (Figura 4) da solução de NaOH 1,0 mol/L com solução de HCL 1,0 mol/L, na presença de vermelho de fenol. Em cada reator foi disposto um recipiente contendo 25 ml da solução do hidróxido, substituindo-o a cada abertura do reator para titulação. O ensaio foi conduzido nos dias 0, 10, 30 e 60. A concentração produzida de CO₂ foi calculada segundo a equação 1.

$$\text{CO}_2 \text{ (mg/mL)} = \{(V1 - V0) \times 44\} \div ms \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que: V1–volume (mL) de HCl necessário para neutralizar NaOH no reator; V0–volume (mL) de HCl necessário para neutralizar NaOH no reator controle (sem micro-organismo); 44– massa molecular do CO₂; e ms–massa (kg) do solo no reator.

Figura 4 – Técnica de titulação para o ensaio de respiração microbiana.



Fonte: Autora.

4.5 Ensaio de Fitotoxicidade

O objetivo do teste foi verificar o efeito dos contaminantes e seus metabólitos sobre a fertilidade do solo. Foram utilizados três tipos de sementes: milho (*Zea mays*), maxixe-do-norte (*Cucumis anguriae*) e mostarda (*Brassica nigra*), adquiridas da Toca do Verde (Canoas-RS). O teste foi conduzido como descrito por Tiquia, Tam e Hodgkiss (1996).

Inicialmente foi confeccionado um extrato do solo de cada reator, retirando-se 10 g do material e misturando-o a 90 ml de água destilada esterilizada. Após a homogeneização manual, 5 a 8 ml do extrato foram transferidas para placas de Petri com papel de filtro cortado em círculo. Em seguida, embebeu-se cuidadosamente o papel disposto no interior da placa, a qual continha no mínimo 10 sementes (Figura 5). Em função do tamanho, para o milho foram aplicadas 5 sementes. Para cada planta, o ensaio foi feito em triplicata e o controle do teste utilizou água de torneira.

A incubação aconteceu em uma estufa (Figura 5) à $22 \pm 1^\circ\text{C}$, em ausência de luz por um período de cinco dias. Depois, as sementes germinadas foram contabilizadas e, suas raízes medidas com a ajuda de um paquímetro.

A fitotoxicidade foi determinada por meio do cálculo do índice de germinação (IG), pelo qual, estima-se a relação entre o número de sementes germinadas com o tamanho das radículas crescidas, comparadas com um controle com água destilada. O IG foi calculado aplicando a fórmula:

$$\text{IG} = [(S1 \times R1) / (S2 \times R2)] \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

Em que: S1- número de sementes germinadas no extrato de solo e S2- no controle, R1- média do comprimento da raiz no extrato de solo e R2- no controle

Figura 5 - Estufa e Placa de Petri com sementes e papel filtro embebido pela solução do solo.



Fonte: Autora.

4.6 Análise estatística

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. Caracterização do solo, contaminante e cossustratos

A CRA demonstrada foi característica de solos arenosos, por conta da sua textura, assim como do conteúdo da matéria orgânica no local (FISCHER et al., 2013). Após o conhecimento da CRA, a biorremediação pôde ser conduzida em uma faixa entre 60-70% deste valor, ou seja, entre 24,5 e 28,6%. Sendo assim, permitiu o controle da umidade e assegurou um bom resultado do bioprocessamento. Além disso, as variações de pH também foram determinadas e o solo foi considerado alcalino.

Os hidrocarbonetos presentes nas amostras dos solos também foram revelados e mostraram um TPH próximo à 450.000 mg/Kg. Os HPA detectados foram o naftaleno, fenantreno e pireno.

5.2. Ensaio de Biodegradação dos HPA

Após um período de 60 dias constatou-se, uma importante redução do fenantreno e do pireno, assim como a principal fonte de carbono que foi utilizada durante o processo pelos consórcios microbianos suplementados com as tortas. Os resultados estão expressos na Tabela 7.

As condições que mostraram o melhor percentual de degradação para ambos foram, respectivamente, 1 e 3. Na condição 1, o valor de óleo e torta considerados foram os menores admitidos pelo experimento. Já na 3, o volume de óleo foi o mesmo enquanto a massa de torta de algodão e gergelim estavam duplicadas.

Entretanto, os reatores acrescidos pela torta de algodão, estatisticamente, apresentaram diferenças nos tratamentos com o consórcio 1. Em relação ao fenantreno, o melhor resultado estava presente na menor concentração do contaminante, independentemente do cossustrato. No entanto, o pireno indicou que a associação 1 foi conexo à fração do contaminante presente. Tendo em vista que, apesar da maior parte reduzida do pireno ter sido a partir da menor fração de óleo considerada (40ml/Kg), a concentração da torta não foi um fator limitante na reposta.

Na conjunção do consórcio 2 e torta de gergelim, levando em conta o fenantreno e o pireno, não houve diferença estatística nos reatores. Comparando-se os dois consórcios, o consórcio 2, todavia, revelou à 20 ml/Kg de óleo a mais relevante resposta sobre a redução do HPA e que independentemente da quantidade de óleo, não existiu distinção acerca da remoção do pireno. Em contrapartida, o fenantreno, na situação de

Ferreira, G. F.

menor contaminação, apresentou o mesmo resultado, ou seja, houve uma relação de dependência à concentração de óleo.

A relação mássica (Δ) entre as concentrações inicial e final do fenantreno foi registrada entre 0,2 a 1,6 (Tabela 3). Esta variação é calculada pela diferença das relações entre as concentrações final e inicial do HPA-BMM (HPA-BMM), isto é, fenantreno, com o HPA de alta massa molecular (HPA-AMM), pireno. Quando o valor desta variação é positivo, há um indicativo da utilização preferencial pelos HPA-AMM (ZHANG et al. 2009, TOLON et al., 2006, KOHLMEIER et al. 2005).

Tabela 7 - Média da degradação do fenantreno e pireno pelos diferentes consórcios na presença dos cossustratos*.

| Reatores | Óleo (ml/Kg) | Torta(g/Kg) | % de degradação** | | Δ | DP |
|-----------------|--------------|-------------|-------------------|-------------|----------|-----|
| | | | FEN | PIR | | |
| <i>Algodão</i> | | | | | | |
| 1 | 10 | 5 | 78,3±0,1 Ca | 80,6±0,1 Ba | 0,2 | PIR |
| 2 | 20 | 5 | 65,3±0,3 Aa | 79,6±0,2 Aa | 0,4 | PIR |
| 3 | 10 | 10 | 78,8±0,3 Ca | 80,7±0,3 Ba | 0,4 | PIR |
| 4 | 20 | 10 | 72,8±0,2 Ba | 79,6±0,2 Aa | 0,4 | PIR |
| <i>Gergelim</i> | | | | | | |
| 1 | 10 | 5 | 79,9±0,1 Aa | 80,2±0,1 Aa | 0,4 | PIR |
| 2 | 20 | 5 | 76,5±0,3 Ab | 79,0±0,2 Aa | 1,6 | PIR |
| 3 | 10 | 10 | 77,7±0,3 Aa | 80,1±0,2 Aa | 0,4 | PIR |
| 4 | 20 | 10 | 77,1±0,1 Ab | 79,4±0,1 Aa | 0,9 | PIR |

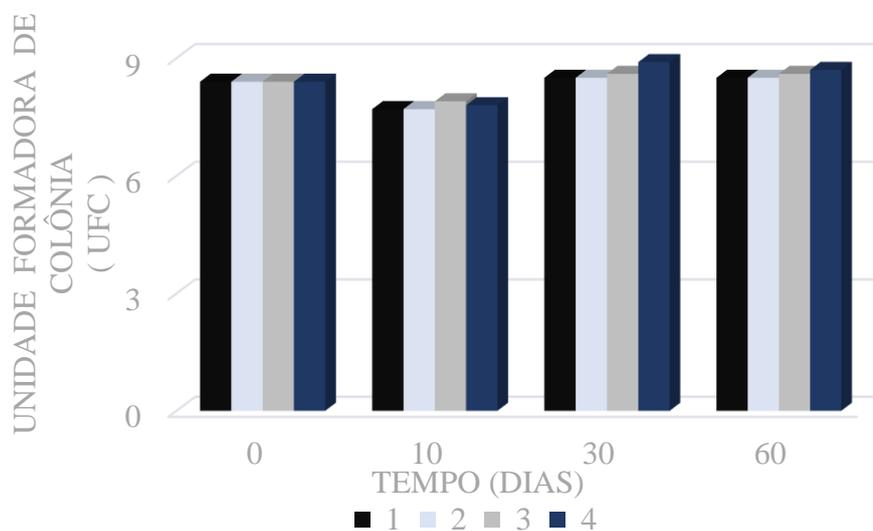
* considerando as perdas abióticas de 11,7±0,1 e 12,6±0,1 quando empregados 20 e 40 mL/Kg de óleo nos reatores, respectivamente; FEN - fenantreno; PIR – pireno; Δ - variação da relação mássica inicial e final entre FEN e PIR; DP – degradação preferencial. ** Média de degradação do fenantreno e pireno seguidas da mesma letra minúscula na coluna e da mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente, entre si, pelo teste de Scott-Knott, ($p \leq 0,05$).

5.3. Quantificação microbiana.

O teste prova que o estímulo da microbiota implica uma suplementação favorável com as tortas.

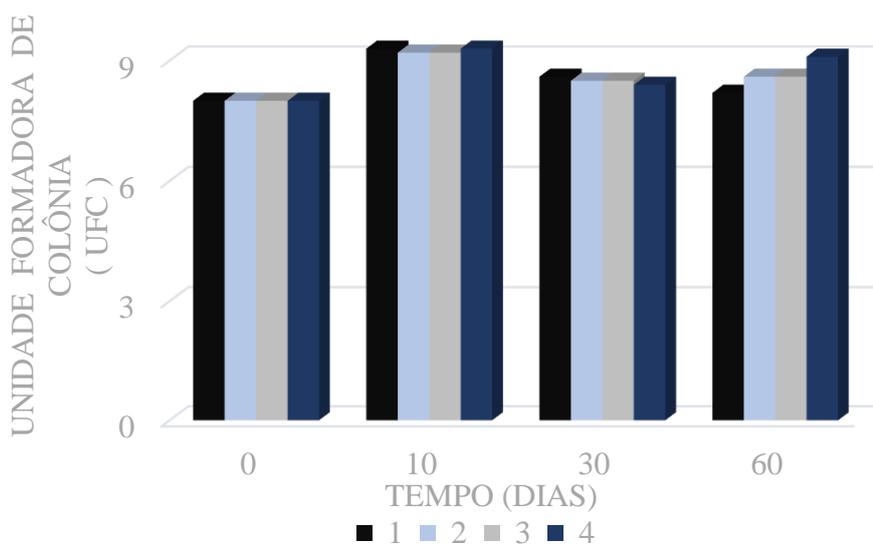
Ambos os consórcios tiveram concentrações iniciais similares (cerca de 10^8 UFC/g) e curvas de crescimento semelhantes ao longo do processo, sem demonstrar redução até o fim do experimento.

Figura 6 - Quantificação das bactérias heterotróficas cultiváveis com uso da torta de gergelim.



Condições: 1- reator 1 e 2 (10ml de óleo e 5g de torta de gergelim); 2- reator 3 e 4 (20 ml de óleo e 5g de torta de gergelim); 3- reator 5 e 6 (10ml de óleo e 10g de torta de gergelim); 4- reator 7 e 8 (20 ml de óleo e 10g de torta de gergelim).

Figura 7 - Quantificação das bactérias heterotróficas cultiváveis com uso da torta de algodão.



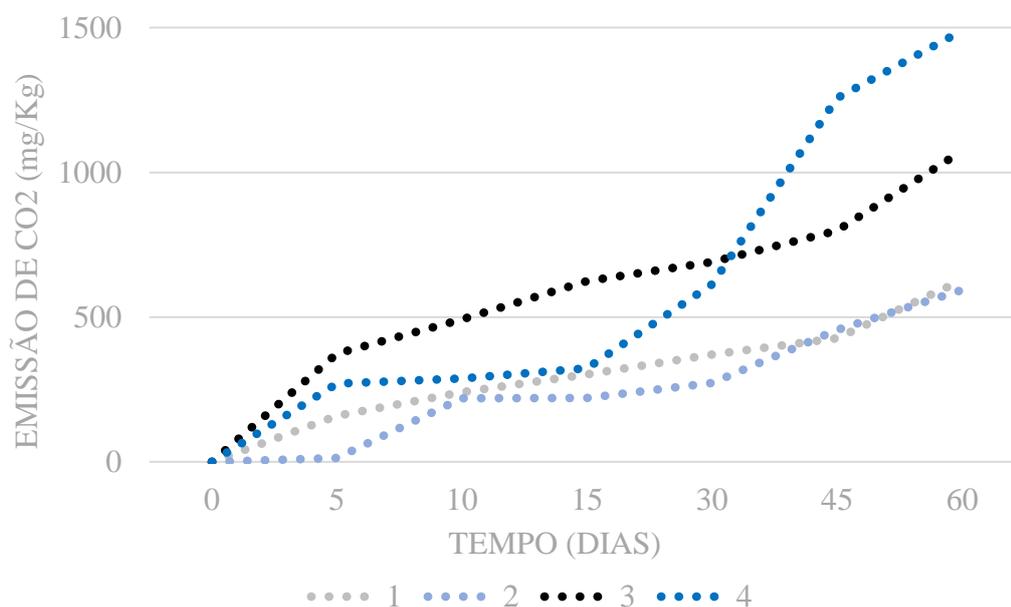
Condições: 1- reator 1 e 2 (10ml de óleo e 5g de torta de algodão); 2- reator 3 e 4 (20 ml de óleo e 5g de torta de algodão); 3- reator 5 e 6 (10ml de óleo e 10g de torta de algodão); 4- reator 7 e 8 (20 ml de óleo e 10g de torta de algodão).

5.4. Respiração Microbiana

Os resultados do teste de respiração microbiana complementam as informações anteriormente citadas tanto com relação a quantificação das bactérias heterotróficas cultiváveis, como a fonte de hidrocarboneto preferencial e degradação do fenantreno e pireno. Nas Figuras 8 e 9 estão demonstradas as médias das estimativas de emissão de gás nos reatores segundo sua suplementação, ou torta de algodão ou torta de gergelim.

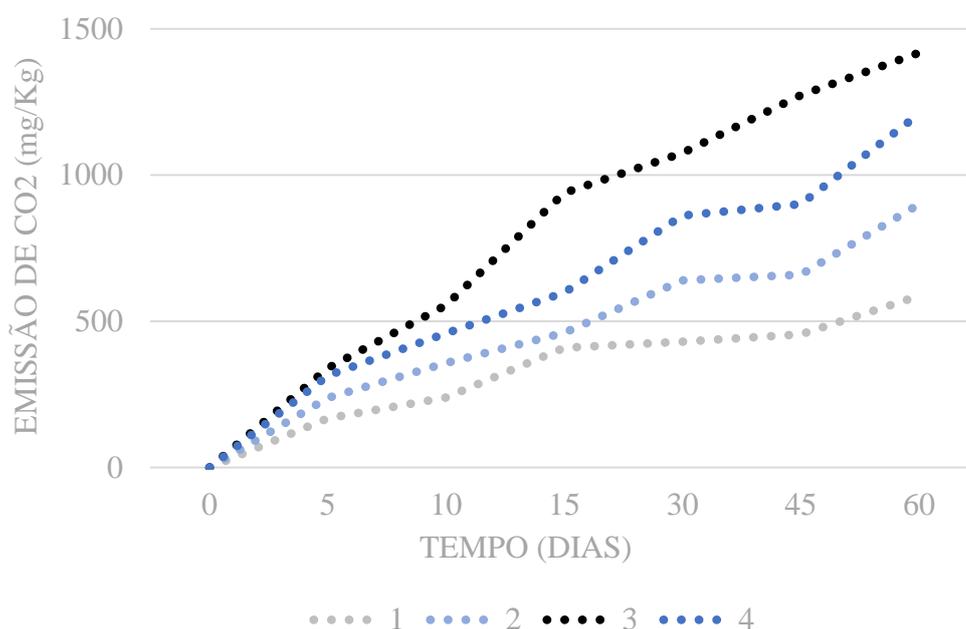
Dentre todas as situações, considerando a maior taxa de respiração, os consórcios dos reatores mais representativo foram o 3 e 4. Já os reatores 1 e 2 apresentaram as menores emissões. Além dessas análises, a proporção de degradação dos reatores 3 e 4 foram diretamente proporcionais a taxa de respiração, pois quanto maior foi o índice de respiração mais elevado o valor de degradação.

Figura 8 - Estimativa da emissão de gás carbônico nos reatores suplementados com torta de gergelim.



Condições de óleo (mL/Kg) e de torta (g/Kg), respectivamente nos reatores: 1-10 e 5 (cinza); 2 – 20 e 5 (azul claro); 3 –10 e 10 (preto) e 4 – 20 e 10 (azul).

Figura 9 - Estimativa da emissão de gás carbônico nos reatores suplementados com torta de algodão.



Condições de óleo (mL/Kg) e de torta (g/Kg), respectivamente nos reatores: 1- 10 e 5 (cinza); 2 – 20 e 5 (azul claro); 3 –10 e 10 (preto) e 4 – 20 e 10 (azul).

5.5. Ensaio de Fitotoxicidade

As Tabelas 4 e 5 mostram os resultados do teste de fitotoxicidade, no que se refere ao índice de germinação (IG).

Tabela 8 - Índice de germinação (%) das sementes antes e após a biorremediação associada à suplementação da Torta de Algodão.

| Plantas | Solo suplementado com torta de algodão | | | | |
|-------------------|--|---|---------|----------|----------|
| | Solo contaminado | Volume de óleo (mL/Kg): massa de torta (g/Kg) | | | |
| | | 10:05 | 10:10 | 20:05 | 20:10 |
| <i>B. nigra</i> | 58,3±0,1 | 12,5±0,1 | 9,8±0,1 | 16,3±0,1 | 14,8±0,1 |
| <i>C. anguria</i> | 21,6±0,8 | 0,0±0,8 | 0,0±0,8 | 18,0±0,8 | 0,0±0,8 |
| <i>Z. mays</i> | 0,0±0,0 | 9,8±0,1 | 1,7±0,1 | 5,8±0,1 | 15,5±0,1 |

Classificação da fitotoxicidade: (■) alta, (■) moderada e (■) nenhuma (ANASTASI et al., 2009).

Tabela 9 – Índice de germinação (%) das sementes antes e após a biorremediação associada à suplementação da Torta de Gergelim.

| Plantas | Solo suplementado com torta de gergelim | | | | |
|-------------------|---|---|-----------|-----------|-----------|
| | Solo contaminado | Volume de óleo (mL/Kg): massa de torta (g/Kg) | | | |
| | | 10:05 | 10:10 | 20:05 | 20:10 |
| <i>B. nigra</i> | 58,3±0,1 | 87,0±0,1 | 36,7±0,1 | 60,6±0,1 | 0,0±0,0 |
| <i>C. anguria</i> | 21,6±0,8 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 |
| <i>Z. mays</i> | 0,0±0,0 | 148,8±0,1 | 633,4±0,1 | 104,9±0,1 | 550,0±0,1 |

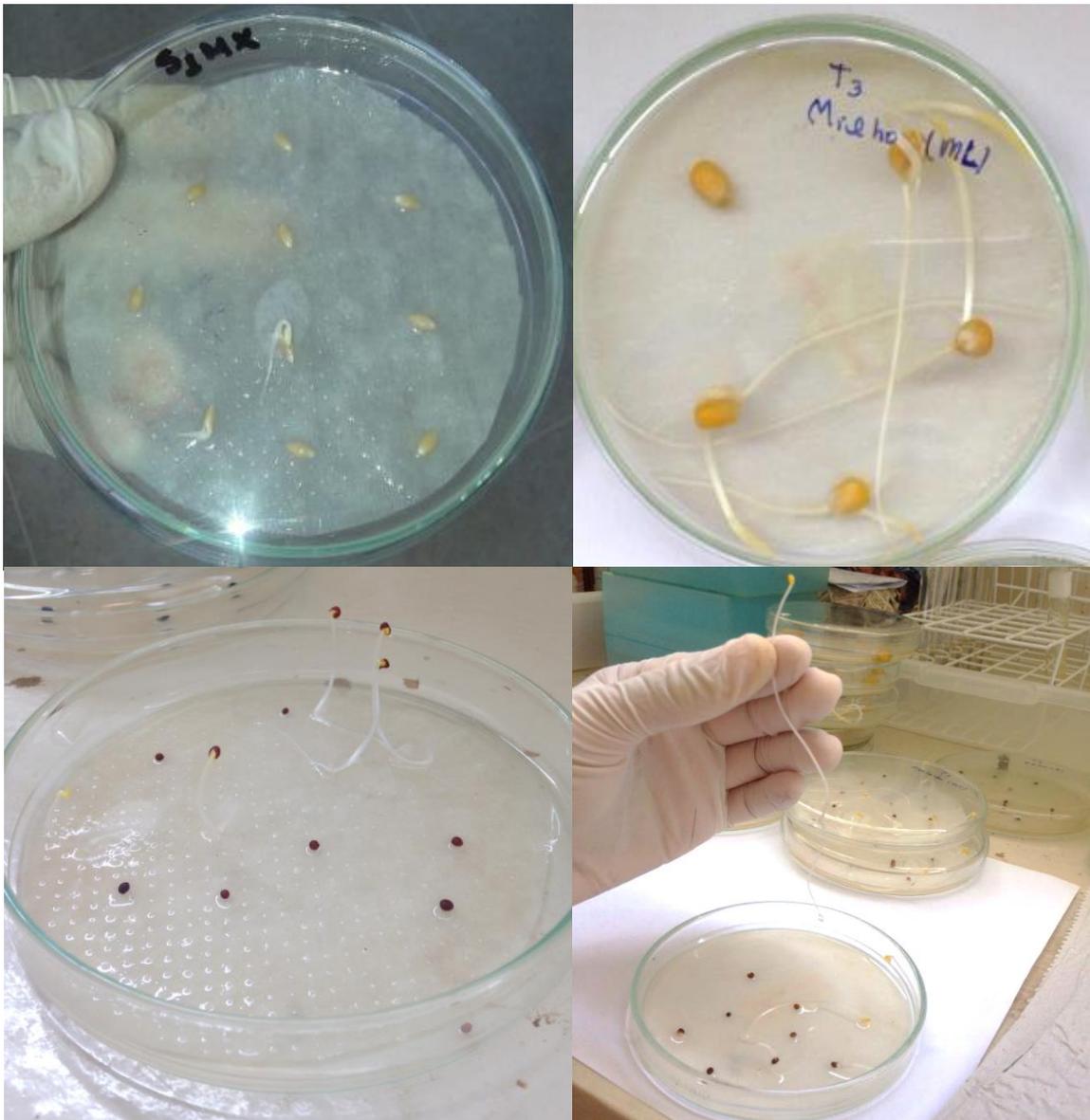
Classificação da fitotoxicidade: (■) alta, (■) moderada e (■) nenhuma (ANASTASI et al., 2009).

A partir das distintas condições de acréscimo de cossustratos, sejam eles algodão e gergelim, afere-se resultados divergentes. Na primeira situação, ensaios com adição de algodão, não se observou alteração na fertilidade do solo após 60 dias de tratamento.

Já na segunda, *Brassica nigra* se revelou menos sensível aos teores de óleo no solo. *Cucumis anguria*, indicou alta toxicidade em todas as circunstâncias. Por outro lado, *Zea mays*, cientificou que a toxicidade foi eliminada em todos os tratamentos.

Na Figura 10, pode-se observar aspectos das sementes germinadas e o desenvolvimento das plantas, após 5 dias de incubação.

Figura 10 - Sementes germinadas e desenvolvimentos da Brassica nigra, Cucumis anguria e Zea mays.



Fonte: Autora.

6. DISCUSSÃO

Inúmeros são os indicadores que podem influir na qualidade física do solo, entretanto os acadêmicos, de modo geral, compartilham que a matéria orgânica cumpre uma importante função na subsistência desses indicadores (AGOSTINI JÚNIOR, 2016). A matéria orgânica é tida como um dos indícios mais eficientes na avaliação da qualidade do solo, inferindo em aspectos, como: direcionamento da capacidade de troca catiônica, capacidade tampão, favorecimento da biota local e agregação do solo, operação na retenção e infiltração da água, aumento da aeração e diminuição da densidade do solo (CONCEIÇÃO et al., 2005). A matéria orgânica, também, é capaz de influenciar na disponibilidade e biodegradação de poluentes orgânicos no solo. E, a capacidade de sorção do mesmo, também pode interferir na predisposição dos contaminantes (SILVA, 2005).

LABUD; GARCIA; HERNANDES (2007) estudaram a consequência da contaminação de solos por hidrocarbonetos nas populações microbianas em solos arenosos e argilosos. Nessa análise, foi constatado que os efeitos tóxicos da contaminação por hidrocarbonetos foram maiores em solos arenosos. Os solos argiloso e arenoso apresentam o aumento da respiração microbiana quando adicionados de petróleo bruto e óleo diesel, já com a adição de gasolina obtém-se pequeno efeito nesse parâmetro. Portanto, o óleo diesel e o petróleo bruto apresentam menor efeito inibidor sobre a hidrólise de N, F e C de ambos os solos (MADER, 2016). Apesar das taxas de gasolina e óleo diesel do solo arenoso trabalhado estarem aproximadas, a taxa de respiração foi relativamente considerável no estudo do ensaio de biodegradação.

O solo é a porção mais afetada de um ecossistema no que diz respeito aos HPA. Tal afirmação foi recentemente ilustrada num estudo, pelo qual se avaliou a distribuição dos HPA no solo, correlacionando a ocorrência, extrapolando para a ciclagem dos compostos em nível global. Foi observado que dadas as características intrínsecas dos HPA, a concentração dos HPA-BMM aumenta, em escala logarítmica, proporcionalmente à distância da fonte, enquanto nos HPA-AMM esta relação é inversamente proporcional, concentrando-se mais próximos à origem da contaminação (YUAN et al., 2015). Em complemento, os HPA de três e quatro anéis são mais prevalentes em solos, por muitas vezes configurando elementos persistentes e/ou recalcitrantes (WU et al., 2013). Neste contexto, a redução significativa observada entre aproximadamente 65 e 80% do fenantreno e 79 a 81% do pireno sugere que as condições aplicadas no estudo, confirmam a eficiência do processo

A suplementação com as tortas de gergelim e algodão incitaram a degradação dos HPA a partir da estimulação dos consórcios microbianos acrescido ao solo. Sugerindo que a associação entre as espécies foi benéfica para a utilização dos hidrocarbonetos presentes no óleo diesel (LEAL, 2009). Essa decorrência, corresponde com o esperado pela literatura, que propõem que os consórcios são mais efetivos durante a biodegradação de poluentes (WYSZKOWSKA, 2001; GHAZALI et al., 2004). Além disso, o aumento da massa do cossustrato não influenciou na remoção, podendo assim ser utilizada menos quantidade de um coproduto que em tese, impactaria mais o ambiente a ser tratado.

Os micro-organismos apresentam uma habilidade degradadora decrescente com o aumento da cadeia dos hidrocarbonetos, bem como com o aumento da complexidade de suas estruturas (TRINDADE, 2002; LOEHR et al. 2001). De modo geral, quanto maior o número de átomos de carbono de um hidrocarboneto, maior a sua persistência no ambiente (MARQUES JR., 2002). Os hidrocarbonetos insaturados são menos suscetíveis à biodegradação se comparados aos hidrocarbonetos saturados.

A variação da relação mássica inicial e final dos HPA revelou que o pireno foi o composto preferencial do consórcio. A preferência por HPA de alta massa molecular, isto é, com mais de 4 anéis condensados, é pouco reportada na literatura (VASCONCELOS, DE FRANÇA e OLIVEIRA, 2011). Isto pode ser explicado pelo fato dos micro-organismos possuírem enzimas que viabilizam a transformação desse HPA em intermediários das rotas metabólicas e, conseqüentemente esses HPA possam servir de fonte de carbono e energia (JACQUES, 2007). Sugere-se que as tortas participaram como adjuvante do processo de assimilação do HPA. Assim, pode-se dizer que favoreceram a síntese de substâncias microbianas, as quais contribuíram para aumentar o bioacesso ao pireno nos agregados do solo, seguido de sua assimilação (GONG et al., 2007).

O desempenho da ação microbiana pode ser avaliado de diversos modos, como a medição da sua biomassa, atividade de certas enzimas no solo, medidas da respiração basal, dentre outros (TÓTOLA, et al 2002). E, a análise de micro-organismos *in situ* é imprescindível para aferir a ação hidrocarbonoclástica na natureza (SANTOS, 2013). Contudo, ao decorrer do processo, o cossustrato também estimulou a microbiota. Apesar de todos os reatores tenderem aos valores iniciais, sugerindo o acarretamento dos fenômenos de esgotamento de nutrientes e/ou produção de metabólitos tóxicos (BALLAMINUT e MATHEUS, 2007).

Sabendo que para um resultado positivo da biodegradação deve-se ter o consumo da matéria orgânica e liberação de CO₂ (TONINI et al., 2010), a realização do ensaio proporcionou a verificação indireta da diminuição do carbono orgânico em todas as

Ferreira, G. F.

condições testadas (RIBEIRO et al, 2015). A detecção do CO₂ pode servir como parâmetro de comparação da eficiência metabólica dos consórcios. A emissão de gás foi proporcional ao teor de torta suplementado no solo dos reatores. Quando a menor concentração de contaminante foi empregada, concentrações menores de CO₂ foram determinadas, ao passo que no emprego de concentrações maiores, as maiores emissões foram detectadas. Sendo assim, o teste revelou as propriedades hidrocarbonoclásticas da microbiota. Ressalvando que dada as condições dos testes, os resultados não expressam apenas o CO₂ acumulado como produto da degradação dos HPA, pois parte deles podem ter origem nos demais compostos presentes, tais como, outros hidrocarbonetos nas diferentes frações do óleo lubrificante, como o óleo residual existente nos cossustrato.

Com relação aos ensaios de fitotoxicidade, a germinação das sementes é um processo que envolve diversos eventos fisiológicos, influenciados por fatores intrínsecos e extrínsecos da planta, tais como luz, temperatura e presença de substâncias inibidoras (BEWLEY, 2012; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

O efeito fitotóxico sobre a fertilidade do solo, proposta por Anastasi et al. (2009) é considerado alto se o IG < 50%, moderado, se 50 > IG < 80% e nulo, se IG > 80%. Desta forma, no início do teste, comprovadamente o solo necessitava de uma intervenção e todas as plantas indicavam esta ação, especialmente *Zea mays*. O teste indicou que o consórcio 2 ao utilizar a tortas de gergelim como cossustrato, permitiu o estabelecimento da fertilidade do solo, relacionado à concentração de cossustrato adicionado, sugestivo que nos reatores contendo as maiores porções do óleo, a microbiota parece ter preferido a torta como fonte de carbono. Por outro lado, o tratamento no qual foi utilizado o consórcio 1 e a torta de algodão, não houve alteração no estado de fertilidade do solo, possivelmente ocasionada por metabólitos tóxicos presentes e/ou outras frações do óleo lubrificante.

Todas as plantas testadas se mostraram boas indicadoras, no entanto, *Z. mays* foi o vegetal mais importante do teste. Este resultado foi diferente dos geralmente relatados na literatura, que assume o fato de que sementes grandes, claras e dotadas de um cotilédone sejam mais resistentes por apresentarem altas reservas nutricionais (TIQUIA et al., 1996). Em todas as condições abordadas neste estudo, o IG de germinação de *Z. mays* aumentou, partindo de 0% para valores superiores a 600%. A princípio, pode-se pensar que a amostra do solo avaliada para a preparação do extrato, pudesse estar mais concentrada com óleo em relação ao restante do solo distribuído no reator. Sugerindo, a presença de outros compostos, principalmente os mais voláteis, influenciando de forma negativa no desenvolvimento das raízes (ADAM e DUNCAN, 2002). Outra condição possivelmente implícita, seria o resultado atrelado ao tamanho médio da semente de *Z.*

mays, $8,8 \pm 0,7$ mm, haja vista que suas reservas podem ter contribuído para o aumento do IG. O processo de germinação inclui fatores intrínsecos da semente como os mais relevantes quando equiparados as variáveis do meio externo (CORDAZZO e ARACAMA, 1998).

A teoria de que outros hidrocarbonetos e seus metabólitos tóxicos presentes podem ter influenciado de forma significativa no teste, fundamenta-se nos IG obtidos com *B. nigra* e *C. anguria* a qual já foi apontada em um estudo prévio, como a melhor indicadora, entre os tipos de sementes testadas (VASCONCELOS; OLIVEIRA e DE FRANÇA, 2010). Apesar da significativa remoção de fenantreno e pireno, estes hidrocarbonetos não foram os únicos contaminantes presentes no solo, onde o teor de hidrocarbonetos totais do petróleo se aproximou a 450.000 mg/Kg (vide Tab. 1).

Os conhecimentos em relação ao uso de tortas no processo de biorremediação são prévios, portanto conjectura-se relevante importância para o presente estudo, uma vez que se mostra possível a reutilização desses resíduos industriais. Anteriormente, foi citado que uma alternativa é utilizar essas tortas como ração para animais, mas o algodão, por exemplo, é tóxico e não pode receber tal destinação (GADELHA ET AL., 2011). Nesse contexto, o potencial econômico e ambiental dos subprodutos pode ser explorado, assim, dar-se um novo significado as tortas de gergelim e algodão as quais, de modo geral, eram apenas descartadas.

7. CONCLUSÃO

A suplementação com as tortas de algodão e gergelim permitiram a degradação do fenantreno e do pireno por meio da estimulação do consórcio microbiano, reconhecidamente versáteis. Do ponto de vista metabólico, reduziram de forma significativa os teores dos HPA estudados. Além de revelar que, independente do teor de óleo, menos cossustrato pode ser aplicado. Portanto, o aumento da massa do cossustrato não influenciou na remoção, podendo assim ser utilizada uma menor quantidade de um coproduto que em tese, impactaria mais o ambiente a ser tratado.

Dentro das perspectivas exploradas, as tortas comportaram-se como bons estimulantes para a microbiota, auxiliando a manutenção de uma elevada taxa populacional microbiana por todo o processo.

Após o tratamento, *C. anguria* se mostrou o melhor indicador de compostos tóxicos remanescentes.

Dado o exposto, deve-se considerar a possibilidade de novos testes com aumento do tempo de bioprocessamento e concentração das próprias tortas. Existindo ênfase, também à trabalhos dedicados com metais pesados, tanto a partir de sua remoção e resistência bacteriana, quanto ao efeito sobre sementes em ensaios de ecotoxicidade.

REFERENCIAS

AGOSTINI JÚNIOR, I. *Contaminantes, atributos físicos e químicos em solo com derrame de derivados de petróleo*. 2016. 90f. Dissertação de Doutorado – Universidade Estadual de Santa Catarina, Lages. 2016.

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.

ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C. D.; GODOI, A. R. D.; CARMO, C. D. A.; EDUARDO, J. L. D. P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(SPE), 260-268, 2008.

AKPOR, O. B.; IGBINOSA, O. E.; IGBINOSA, O. O. Studies on the effect of petroleum hydrocarbon on the microbial and physico-chemicals characteristics of soil. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 16, 2007.

ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J.; WALLIS, F. M. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation*, v. 14, n. 4, p. 297-307, 2003.

ADAM, G.; DUNCAN, H. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ. Pollut*, v.120, n. 3, p. 363-370, 2002.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, v.45, n. (1), p.180, 1981.

CONCEIÇÃO, P. C.; CARNEIRO AMADO, T. J.; MIELNICZUK, J.; SPAGNOLLO, E. Qualidade do solo em sistemas de manejo avaliada pela dinâmica da matéria orgânica e atributos relacionados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 29, n. 5, 2005.

BACOSA, H; SUTO, K; INOUE, C. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 64, n. 8, p. 702-710, 2010.

BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. *Braz J Microbiol.* v. 38, n. 2, p. 248-252, 2007.

BRITO, E. M. S.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M. A.; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in microbiology*, v. 157, n. 8, p. 752-762, 2006.

BALAN, D. S.; MONTEIRO, R. T. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology*, v. 89, n. 2, p. 141-145, 2001.

BHATNAGAR, L.; FATHEPURE, B. Z. Mixed cultures in detoxification of hazardous waste. *Mixed cultures in biotechnology*. Mc-Graw-Hill Book Co., New York, p. 293-340, 1991.

BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of microbiological methods*, v. 32, n. 2, p. 155-164, 1998.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, v. 41, n. 5, p. 653, 1941.

CASTIGLIONE, M. R.; GIORGETTI, L.; BECARELLI, S.; SIRACUSA, G.; LORENZI, R.; DI GREGORIO, S. Polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils: bioaugmentation of autochthonous bacteria and toxicological assessment of the bioremediation process by means of *vicia faba* L. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 8, p. 7930-7941, 2016.

CASADO, N. A. R.; HORCASITAS, M. D. C. M.; VÁZQUEZ, R. R.; GARCÍA, F. J. E.; VARGAS, J. P.; CASTOLO, A. A.; CALVA, G. C. The fatty acid profile analysis of *Cyperus laxus* used for phytoremediation of soils from aged oil spill-impacted sites revealed that this is a C18: 3 plant species. *PloS one*, v. 10, p. 10, e014-0103, 2015.

CORRÊA, O. L. S. *Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia*. Interciência. 2003.

CUNHA, C. D. D. e LEITE, S. G. F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, n. 1, p. 45-49, 2000.

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.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. *Microbiologia do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 1992.

CERNIGLIA, C. E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in applied microbiology*, v. 30, p. 31-71, 1984.

DA SILVA, K. M. L.; WANDERLEY, C. R. P.; MARINHO, G.; DE OLIVEIRA, J. C.; DOS SANTOS, A. D. O.; RODRIGUES, K. Influência do excesso de nitrogênio amoniacal no tratamento de efluente têxtil em reator de bateladas sequenciais com *Aspergillus niger* AN 400. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 20, n. 4, p. 635-643, 2015.

DIAS, A. E. X. O. Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos. *Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, v. 142, p. 79-98, 2000.

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.

FOTH, H.; KAHL, R.; KAHL, G. F. Pharmacokinetics of low doses of benzo [a] pyrene in the rat. *Food and chemical toxicology*, v. 26, n. 1, p. 45-51, 1988.

GADELHA, I. C. N.; DO NASCIMENTO RANGEL, A. H.; SILVA, A. R.; SOTO-BLANCO, B. Efeitos do gossipol na reprodução animal. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 5, n. 2, p. 129-135, 2011.

GONG, Z.; ALEF, K.; WILKE, B-M.; LI, P. Activated carbon adsorption of PAHs from vegetableoil used in soil remediation. *Journal of hazardous materials*. v. 143, n. 4, p. 372-378, 2007.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. D. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 34, p. 36-43, 2005.

GIBSON, D. T.; SUBRAMANIAN, V. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. *Microbial Degradation of Organic Compounds*, p.181-252, 1984.

GRADY, C. P. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnology and bioengineering*, v. 27, n. 5, p. 660-674, 1985.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, v. 169, n. 1, p. 1-15, 2009.

AGOSTINI JÚNIOR, I. Contaminantes, atributos físicos e químicos em solo com derrame de derivados de petróleo. Tese (Doutorado em Ciência do Solo – Área: Ciências Agrárias) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Lages, 2016.

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

JOHN, R. C.; ITAH, A. Y.; ESSIEN, J. P.; IKPE, D. I. Fate of nitrogen-fixing bacteria in crude oil contaminated wetland ultisol. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 87, n. 3, p. 343, 2011.

KARAMALIDIS, A. K.; EVANGELOU, A. C.; KARABIKA, E.; KOUKKOU, A. I.; DRAINAS, C.; VOUDRIAS, E. A. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonasaeruginosa* strain Spet. *Bioresource technology*, v. 101, n.16, p. 6545-6552, 2010.

KREWSKI, D.; BURNETT, R.; GOLDBERG, M.; HOOVER, B. K.; SIEMIATYCKI, J.; JERRETT, M.; WHITE, W. Overview of the reanalysis of the Harvard six cities study and American Cancer Society study of particulate air pollution and mortality. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, v. 66 n.16-19, p. 1507-1552, 2003.

KATAOKA, A. P. A. G. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.

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.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; DA SILVA QUEIROZ; V.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, v. 8, n. 4, 2017.

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

LABUD, VALERIA; GARCIA, CARLOS; HERNANDEZ, TERESA. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, v. 66, n. 10, p. 1863-1871, 2007.

LATIMER, J. S.; ZHENG, J. The Sources, Transports and Fate of PAHs in the Marine Environment and. PAHs: an ecotoxicological perspective, p. 9, 2003.

LOEHR, RAYMOND C.; MCMILLEN, SARA J.; WEBSTER, MATTHEW T. Predictions of biotreatability and actual results: soils with petroleum hydrocarbons. Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management, v. 5, n. 2, p. 78-87, 2001.

MACHADO, K. M. G.; DO NASCIMENTO, E. A.; ARAUJO, J. C. D. S. B. APLICAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO NO ESTADO DE SÃO PAULO. LEOPOLDIANUM, v. 42, n. 116-8, p. 18, 2017.

MARDER, M. Avaliação da geração de biogás a partir de resíduos agroindustriais e emprego do biofertilizante na remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos. Trabalho de Conclusão de Curso 2016.

MILLER, N. T.; FULLER, D.; COUGER, M. B.; BAGAZINSKI, M.; BOYNE, P.; DEVOR, R. C.; YOUSSEF, N. Draft genome sequence of *Pseudomonas moraviensis* strain Devor implicates metabolic versatility and bioremediation potential. Genomics data, v. 9, p. 154-159, 2016.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Phytoremediation in the tropics— influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. Environmental Pollution, v. 138, n. 1, p. 86-91, 2005.

MEIRE, R.O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Oecologia Brasiliensis. Rio de Janeiro. v. 11, n. 2, p. 188-201, 2007.

MARQUES J. R. A. N., MORAES, R. B. C., MAURAT C. M. Biologia Marinha Rio de Janeiro. P: 311-334, IN: PEREIRA, R. C.; GOMES, A. S. Interciência, p 382., 2002.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Agricultura Sustentável. Brasília: MMA, 57p, 2000.

NOGUEIRA, ITALO. “RIO-2016 usa bactérias para despoluir Marina da Glória” – 2010. Disponível em: < <http://www1.folha.uol.com.br>>. Acesso em: 18 agosto, 2017.

NETTO, A.D.P.; MOREIRA, J.C.; DIAS, A.E.X.O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.V.; OLIVEIRA, A.S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e seus derivados nitrados (NHPA): uma revisão metodológica. Quim Nova. São Paulo. v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

NADIM, F.; HOAG, G. E.; LIU, S.; CARLEY, R. J.; ZACK, P. Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 26, n. 1, p. 169-178, 2000.

PIMENTA, J.; COURA, A.; SANTOS, R.; VANZELA, A.; PANTOJA, L.; SANTOS, A. Avaliação do uso de resíduos da agroindústria de óleos vegetais como fonte de carbono para a produção de celulases por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em fermentação em estado sólido. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, v. 1, n.2, p. 973-977, 2015.

PENG, S.; ZHOU, Q.; CAI, Z.; ZHANG, Z. Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *Journal of hazardous materials*, v. 168, n. 2, p. 1490-1496, 2009.

PAGE, D.S.; BOEHM, P.D.; DOUGLAS, G.S.; BENICE, A.E.; BURNS, W.A.; MANKIEWICZ, P.J. Pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments record past human activity: a case study in Prince William Sound, Alaska. *Marine Pollut Bull. Oxford*. v. 38, n. 4, p. 247-260, 1999.

PROVIDENTI, M. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of industrial Microbiology*, v. 12, n. 6, p. 379-395, 1993.

RIBEIRO, D., MONTERO-RODRÍGUEZ, D., ANDRADE, R. D. S., CAMPOS-TAKAKI, G. D., PALHA, M. AVALIAÇÃO DA BIORREMEDIÇÃO EM SOLO ARENOSO CONTAMINADO POR DIESEL. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, v. 1, n. 2, p. 414-419, 2015.

RIZZO, A. C. D. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C. D.; SOBRAL, L. G. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores, 2006.

RICHARD, J. Y.; VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 44, n. 2, p. 93-100, 1999.

SOUSA, K. C.; TANABE, A. K. R.; SABONARO, D. Z.; SMITH, W. S. Biorremediação de solos contaminado por hidrocarbonetos utilizando fungos doi: [http://dx. doi. org/10.5892/ruvrd. v14i2. 2594](http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v14i2.2594). *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 14, n. 2, p. 43-52, 2016.

SARKIS, J. R.; MICHEL, I.; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D. F. Optimization of phenolics extraction from sesame seed cake. *Separation and Purification Technology*, v. 122, p. 506-514, 2014.

SANTOS, R.; ALVES, F.; VANZELA, A.; PANTOJA, L.; SANTOS, A. Otimização do processo de fermentação submersa para produção de xilanase por *Aspergillus tubingensis* AN1257 com uso de torta de caroço de algodão como fonte de carbono. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, v. 1, p. 1078-1084, 2014.

SANTOS, D.M.S. *Diversidade de bactérias tolerantes ao naftaleno das areias da Praia de Suape-PE e produção simultânea, por Pseudomonas aeruginosa, de ramnolipídeo e polihidroxicanoato*. Dissertação de Doutorado – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SILVA, B.C.P. Elementos finitos para modelagem da sorção de contaminantes orgânicos na fração orgânica dos solos. Tese (Mestrado em Ciência e Engenharia de Infraestrutura Aeronáutica) – Instituto Tecnológico de Aeronáutica, São José dos Campos, 2005.

SEMPLE, K. T.; DOICK, K. J.; JONES, K. C.; BURAUDEL, P.; CRAVEN, A.; HARMS, H. Peer reviewed: defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated, 2004.

SHRIVASTAVA, R.; UPRETI, R.K.; JAIN, S.R.; PRASAD, K.N.; SETH, P. K.; CHATURVEDI, U.C. Suboptimal Chlorine treatment of drinkingwater leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Ecotoxicol Environ Saf.* Oxford. v. 58, n. 2, p. 277-283, 2004.

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.

SISINNO, C.L.; NETTO, A.P.; REGO, E.C.P.D.; LIMA, G.S. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. *Caderno de Saúde Pública*, v. 19, n. 2, p. 671-676, 2003.

SANDERS, C. L.; SKINNER, C.; GELMAN, R. A. Percutaneous absorption of [7.10-14C] benzo [a] pyrene and [7, 12-14C] dimethylbenz [a] anthracene in mice. *Environmental research*, v. 33, n. 2, p. 353-360, 1984.

TANG, J.; LU, X.; SUN, Q.; ZHU, W. Aging effect of petroleum hydrocarbons in soil under different attenuation conditions. *Agriculture, ecosystems & environment*, v. 149, p. 109-117, 2012.

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.

TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis*, v. 14, n. 4, p. 1025-1035, 2010.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo. In: ALVAREZ V., V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V. & COSTA, L.M., eds. *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. p.195-276.

TRINDADE, P. V. O. Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

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

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, 2007.

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

VASCONCELOS, U.; OLIVEIRA, F.J.S.; DE FRANÇA, F.P. Evaluación de la eficacia del tratamiento por desorción térmica de un suelo contaminado con residuos aceitosos. *Revista Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, v. julio-agosto, n. 110, p. 59-63, 2010.

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.

WITHEY, J. R.; SHEDDEN, J.; LAW, F. C. P.; ABEDINI, S. Distribution of benzo [a] pyrene in pregnant rats following inhalation exposure and a comparison with similar data obtained with pyrene. *Journal of applied toxicology*, v. 13, n. 3, p. 193-202, 1993.

- WEISSENFELS, W. D.; BEYER, M.; KLEIN, J. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 32, n. 4, p. 479-484, 1990.
- 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, n. 8, p. 137-144, 2015.
- YONG, R. N., MULLIGAN, C. N. *Natural attenuation of contaminants in soils. Natural attenuation of contaminants in soils*, 2004.
- YUNKER, M.B.; MACDONALD, R.W., VINGARZAN, R., MITCHELL, R.H., GOYETTE, D.; SYLVESTRE, S. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochem*, v.33, n. 4, p. 489-515, 2002.
- YANG, J. J.; ROY, T. A.; MACKERER, C. R. Percutaneous absorption of benzo [a] pyrene in the rat: comparison of in vivo and in vitro results. *Toxicology and industrial health*, v. 2, n. (4), p. 409-416, 1986.
- ZHANG, Z. H.; BALASUBRAMANIAN, R. Physicochemical and toxicological characteristics of particulate matter emitted from a non-road diesel engine: Comparative evaluation of biodiesel-diesel and butanol-diesel blends. *Journal of hazardous materials*, v. 264, p. 395-402, 2014.
- ZHANG, Y.; MO, J.; WESCHLER, C. J. Reducing health risks from indoor exposures in rapidly developing urban China. *Environmental health perspectives*, v. 121, n. 7, p. 751, 2013.

APÊNDICE A – PRODUÇÕES DE PESQUISA

Artigo publicado 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.

Apresentação de Trabalhos

- ❖ **FERREIRA, G.F.**; AMARAL, I.P.G.; VASCONCELOS, U. BIOLOGICAL REMOVAL OF TWO PAH IN SOIL SUPPLEMENTED WITH SESAME CAKE. 2017. 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM - Foz do iguaçu). Apresentação de trabalho na forma de Pôster.
- ❖ **FERREIRA, G.F.**; CAVALCANTI, T. G.; SOUZA, A. F.; VASCONCELOS, U. Remoção biológica de fenantreno e pireno de um solo incrementado com torta de *Gossypium* sp. (algodão). 2016. XI Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação (CONNEPI - Maceió). Apresentação de trabalho na forma oral.
- ❖ **FERREIRA, G.F.**; VASCONCELOS, U. Remoção biológica de HPA em solo incrementado com torta de *Sesamum indicum* L. (gergelim). 2016. XXIV Encontro de Iniciação Científica da UFPB (ENIC - João Pessoa). Apresentação de trabalho na forma de Pôster.

Premiações

- ❖ **FERREIRA, G.F.**; VASCONCELOS, U. Remoção biológica de HPA em solo incrementado com torta de *Sesamum indicum* L. (gergelim). 2016. XXIV Encontro de Iniciação Científica da UFPB (ENIC - João Pessoa). Apresentação de trabalho na forma de Pôster.