

LÍVIA VIEIRA GONZAGA

**SURFACTINA DESIDRATADA COMO AGENTE POTENCIALIZADOR
DA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS
COM PETRÓLEO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G642s
2013
Gonzaga, Lívia Vieira, 1984-
Surfactina desidratada como agente potencializador da
biorremediação de solos contaminados com petróleo / Lívia
Vieira Gonzaga. – Viçosa, MG, 2013.
x, 50f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Biossurfactantes. 2. Biorremediação. 3. Petróleo.
4. Microbiologia agrícola. 5. *Bacillus subtilis*. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 668.1

LÍVIA VIEIRA GONZAGA

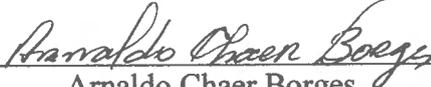
**SURFACTINA DESIDRATADA COMO AGENTE POTENCIALIZADOR DA
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM PETRÓLEO**

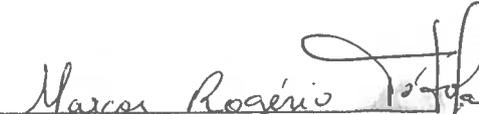
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de dezembro de 2013.


Célia Alencar de Moraes
(Coorientadora)


Maurício Dutra Costa
(Coorientador)


Arnaldo Chaer Borges


Marcos Rogério Tótolá
(Orientador)

À minha família e amigos,
pelo amor e pelo apoio depositados.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e iluminar sempre.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por conceder a minha bolsa de estudos.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, pelos ensinamentos, pelo apoio, pela paciência e pela confiança depositada no meu trabalho.

Aos professores Célia Alencar de Moraes, Maurício Dutra Costa e Arnaldo Chaer Borges, pela colaboração no trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos.

Aos estudantes e funcionários dos Laboratórios de Ecologia Microbiana, Genética de Micro-organismos, Fisiologia de Micro-organismos, Microbiologia Industrial, Microbiologia de Anaeróbios, Associações Micorrízicas e Microbiologia de Alimentos, pelo prestatidade.

Aos demais professores e funcionários: José Humberto de Queiroz (Laboratório de Metabolismo e Fermentação - UFV); Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz (Departamento de Química -UFV); Vagner Fernandes Knupp (Universidade Federal de São João del-Rei); Antônio Fernandes de Carvalho (Laboratório de Leite e Derivados - UFV); Laboratório de Análise Química de Solo - UFV; Laboratório de Geoquímica – UFV; Paulo César Stringheta (Laboratório de Secagem e Pigmentos Naturais - UFV); João Paulo Viana Leite (Laboratório de Biodiversidade – UFV); Célio (Lamisol – IFV); e Paulo Roberto Cecon (Departamento de Estatística).

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia Agrícola, em especial Nilcéia, Danilo, Evandro, Sr. Paulo e José Carlos, e aos funcionários do BIOAGRO (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária), pela gentileza e pela prestatidade.

Aos meus pais, Murilo e Cida, e aos meus irmãos, Luciana, César e Alan, pelo amor incondicional, pela cumplicidade, pelo apoio, pela paciência e pela compreensão sempre.

Ao meu namorado, Marco Antônio, pelo amor, pelo apoio, pela paciência e por ser o meu Forte.

Às colegas e, principalmente, grandes amigas Kamila Tomoko, Merielle Angélica, Roméria Silva, Ubiana Silva e Isabela Nascimento, pela amizade, pela cumplicidade e pela força durante a trajetória do mestrado.

Aos meus queridos amigos Mariana Alves, Gabriela Melo, Fernanda Soares, Juliana Madureira, Juliana Gonçalves, Michelle Cenizio, Myrlene Pereira, Raquel Gonzaga, Vívian Figueiredo, Mariana Adriano, Francisco Wagner e Victor Fernandes pela amizade, pelo carinho e pelo apoio sempre.

Ao meu grande amigo Péricles pelo apoio, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos demais amigos do Mestrado e de Viçosa, em particular, Edgard, Alcinei e Elsa, pela amizade e pelo apoio.

Aos colegas e alguns também amigos Daniel, Edmo, Karen, Marcela, Leonardo, Cássia, Victor, Karlos, Patrícia e estagiários do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, pela prestatividade e pela amizade.

Aos demais amigos e aos familiares de Belo Horizonte, Ouro Preto, Planura, Icém e outros lugares, pelo apoio e pela amizade.

BIOGRAFIA

LÍVIA VIEIRA GONZAGA, filha de Murilo Monteiro Gonzaga e Maria Aparecida Vieira Monteiro Gonzaga, nasceu em Frutal, no dia 17 de outubro de 1984.

Em junho de 2010, graduou-se em Ciências Biológicas na modalidade Licenciatura pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Em agosto de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, em nível de Mestrado, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se à defesa de dissertação em dezembro de 2013.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I - Revisão da Literatura:	1
1. Introdução	2
2. Biodegradação e Biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo em solos	3
2.1. Aspectos gerais	3
2.2. Limitações à biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solos	6
3. Biossurfactantes	7
3.1. Biossurfactantes e sua aplicação na biorremediação de solos contaminados com petróleo	7
3.2. Produção de biossurfactantes: uso da técnica <i>spray drying</i> como alternativa para a redução dos custos de produção, transporte e estocagem	10
4. Referências Bibliográficas	12
CAPÍTULO II - Artigo: Surfactina desidratada como agente potencializador da biorremediação de solos contaminados com petróleo	19
1. Introdução	20
2. Materiais e Métodos	22
3. Resultados	29
4. Discussão	38
5. Conclusões	45
6. Referências	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Taxas respiratórias em microcosmos com solo franco-argilo-arenoso, durante 60 dias de incubação29
- Figura 2 - Taxas respiratórias em microcosmos com solo argiloso, durante 60 dias de incubação30
- Figura 3 - HTP residual nos microcosmos com solo franco-argilo-arenoso nos tempos 0, 30, 45 e 60 dias. Barras contendo diferentes letras para um mesmo tempo indicam diferenças significativas, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey32
- Figura 4 - HTP residual nos microcosmos com solo argiloso nos tempos 0, 30, 45 e 60 dias. Barras contendo diferentes letras para um mesmo tempo indicam diferenças significativas, ao nível de 5 % de probabilidade, teste de Tukey32
- Figura 5 - Índice de Shannon-Weaver (H'), Riqueza (S) e índice de Simpson (D) de *Bacteria* em solo franco-argilo-arenoso, calculados com base nos eletroferogramas de T-RFLP nos tempos 2, 30, 45 e 60 dias. T2: inoculante (IN) + surfactina líquida (SL); T3: Petróleo (PT) + IN; T4: PT + IN + SL; T5: PT + IN + surfactina em pó; T6: PT + IN + maltodextrina34
- Figura 6 - Índice de Shannon-Weaver (H'), Riqueza (S) e índice de Simpson (D) de *Fungi* em solo franco-argilo-arenoso, calculados com base nos eletroferogramas de T-RFLP nos tempos 2, 30, 45 e 60 dias. T2: inoculante (IN) + surfactina líquida (SL); T3: Petróleo (PT) + IN; T4: PT + IN + SL; T5: PT + IN + surfactina em pó; T6: PT + IN + maltodextrina34
- Figura 7 - Índice de Shannon-Weaver (H'), Riqueza (S) e índice de Simpson (D) de *Archaea* em solo franco-argilo-arenoso, calculados com base nos eletroferogramas de T-RFLP nos tempos 2, 30, 45 e 60 dias. T2: inoculante (IN) + surfactina líquida (SL); T3: Petróleo (PT) + IN; T4: PT + IN + SL; T5: PT + IN + surfactina em pó; T6: PT + IN + maltodextrina35
- Figura 8 - Índice de Shannon-Weaver (H'), Riqueza (S) e índice de Simpson (D) de *Bacteria* em solo argiloso, calculados com base nos eletroferogramas de T-RFLP nos tempos 2, 30, 45 e 60 dias. T2: inoculante (IN) + surfactina líquida (SL); T3: Petróleo (PT) + IN; T4: PT + IN + SL; T5: PT + IN + surfactina em pó; T6: PT + IN + maltodextrina35
- Figura 9 - Índice de Shannon-Weaver (H'), Riqueza (S) e índice de Simpson (D) de *Fungi* em solo argiloso, calculados com base nos eletroferogramas de T-RFLP nos tempos 2, 30, 45 e 60 dias. T2: inoculante (IN) + surfactina líquida (SL); T3: Petróleo (PT) + IN; T4: PT + IN + SL; T5: PT + IN + surfactina em pó; T6: PT + IN + maltodextrina36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físicas e químicas dos solos utilizados no estudo	22
Tabela 2 - Equações de regressão obtidas a partir das curvas de pH dos solos em resposta à adição de doses da mistura de carbonato de cálcio e carbonato de Magnésio	23
Tabela 3 - Microcosmos preparados a partir de porções de 70 cm ³ de cada tipo de solo contidos nos frascos respirométricos	25
Tabela 4 - Médias dos valores de CO ₂ acumulado (μmol g ⁻¹) obtidos em cada microcosmo, após 91 e 135 horas, emitido pelos solos franco-argilo-arenoso (FAA) e argiloso (ARG), respectivamente	31

RESUMO

GONZAGA, Livia Vieira, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2013. **Surfactina desidratada como agente potencializador da biorremediação de solos contaminados com petróleo.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Célia Alencar de Moraes e Maurício Dutra Costa.

A efetividade da surfactina desidratada em *spray dryer*, produzida a partir do cultivo do isolado *Bacillus subtilis* LBBMA 4914, foi avaliada em microcosmos contendo amostras de solos franco-argilo-arenoso (FAA) ou argiloso (ARG) contaminados com petróleo. As taxas respiratórias mais elevadas nos microcosmos adicionados de petróleo demonstraram que o petróleo foi utilizado como fonte de carbono pelas microbiotas nos microcosmos de ambos os tipos de solo. A maltodextrina, utilizada como adjuvante de secagem na preparação da surfactina desidratada por *spray dryer*, foi também utilizada como fonte de carbono e energia. As médias dos valores de CO₂ acumulado durante a fase de declínio das taxas respiratórias compartilhada por todos os microcosmos em um mesmo tipo de solo variaram entre 47,6 a 137,7 μmol g⁻¹ (microcosmos com o solo FAA) e 37,5 a 98,5 μmol g⁻¹ (microcosmos com solo ARG). A remoção dos HTPs variou entre 19,6 a 38,4 % (solo FAA) e 62,6 a 73,2 % (solo ARG). A surfactina em suas duas formas (solução e desidratada) influenciou positivamente a degradação dos HTPs nos solos FAA e ARG e em fase tardia da biorremediação. A maltodextrina não interferiu na degradação dos HTPs. Os menores valores de HTPs residuais em microcosmos montados com o solo ARG foram atribuídos às maiores atividade e biomassa microbianas. A dinâmica das comunidades microbianas foi estudada pela análise de T-RFLP *multiplex* dos grupos de *Bacteria*, *Fungi* e *Archaea*. Os resultados demonstraram a ocorrência de impacto negativo do petróleo nas comunidades microbianas de todos os microcosmos em ambos os tipos de solo, no início do período de incubação, e recuperação da estrutura das comunidades nos tempos subsequentes. A comunidade de fungos apresentou valores mais elevados dos índices de Shannon-Weaver (H'), Simpson (D) e Riqueza (S), seguida pela de *Bacteria*. Conclui-se que surfactina desidratada por *spray-drying* favorece a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solos.

ABSTRACT

GONZAGA, Livia Vieira, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, December, 2013. **Spray dried surfactin as potentiating agent of bioremediation of oil-contaminated soil.** Advisor: Marcos Rogério Tótola. Co-Advisers: Célia Alencar de Moraes and Maurício Dutra Costa.

The effectiveness of spray dried surfactin, produced from a culture of *Bacillus subtilis* 4914 strain, was evaluated in microcosms containing sandy clay loam soil (SCL) or clayey soil (CLA) contaminated with petroleum. The highest respiratory rates in the microcosms additioned of petroleum demonstrated that oil was utilized as carbon source for microbiota in the microcosms of both soils. Maltodextrin, utilized as a drying adjuvants in the preparation of spray dried surfactin, was also utilized as a source of carbon and energy. The means of accumulated CO₂ during the decline phase of the respiration rate shared by all microcosms of a same soil type, ranged from 47,6 to 137,7 μmol g⁻¹ for SCL soil and from 37,5 to 98,5 μmol g⁻¹ for CLA soil. The removal of TPH ranged from 19,6 to 38,4 % and from 62,6 to 73,2 % for the SCL and CLA soils, respectively. Surfactin in its two forms (in liquid solution and dried) influenced positively the degradation of the TPH in the SCL and CLA soils and in late phase of bioremediation. Maltodextrin did not interfere in the degradation of TPH. The lowest values of residual TPH in microcosms assembled with CLA soil were attributed to the highest microbial activity and biomass. The microbial community dynamics was studied by T-RFLP multiplex analysis of the groups *Bacteria*, *Fungi* e *Archaea*. The results demonstrated the occurrence of negative impact of oil on the microbial communities of all microcosms of both soil types, in the beginning of incubation period, and recovery of the community structure in subsequent times. The fungal community showed highest values of Shannon-Weaver index (H'), Simpson index (D) and Richness (S), followed by the *Bacteria*. In conclusion, spray dried surfactin favors the biodegradation of petroleum hydrocarbons in soils.

CAPÍTULO I

REVISÃO DA LITERATURA

1. Introdução

O petróleo é a principal fonte de energia utilizada no mundo, sendo a matéria prima das indústrias petrolífera e petroquímica, o que justifica sua grande demanda e os altos investimentos em sua exploração. Durante a cadeia produtiva do petróleo e de seus derivados, que inclui atividades de extração, refino, transporte e armazenamento, existe a possibilidade de ocorrerem contaminações no ambiente por esse combustível fóssil. Dada à alta toxicidade de grande parte dos hidrocarbonetos do petróleo e da elevada persistência de seus compostos no ambiente, diversos danos são gerados aos meios biótico e abiótico (Okoh, 2006; Das e Chandran, 2009).

As áreas contaminadas com petróleo podem ser recuperadas por técnicas de biorremediação, que geralmente envolvem a ação de populações microbianas com capacidade de utilizar os compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, degradando-os a formas menos tóxicas. Essa tecnologia é reconhecida como de baixo custo e menos impactante que as técnicas não biológicas.

A biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo em solo é influenciada por fatores como umidade, pH, temperatura, teor de nutrientes e concentração de oxigênio (Reginatto *et al.*, 2011). O tipo de solo também afeta a degradação microbiana. Quanto maior o teor de matéria orgânica e/ou argila, por exemplo, maior é a adsorção dos hidrocarbonetos do petróleo ao solo, o que resulta em redução da disponibilidade desses compostos para sua utilização pelos micro-organismos. O aumento da biodisponibilidade dos hidrocarbonetos no solo e a aceleração do processo de degradação dos mesmos no ambiente podem ser obtidos pela adição de biossurfactantes à área contaminada. Essas biomoléculas apresentam em sua estrutura uma região hidrofílica e outra hidrofóbica, característica que permite a elas se posicionarem em interfaces de fases imiscíveis, como óleo/água ou ar/água (Jacques *et al.*, 2007). Dada a propriedade de reduzir as tensões superficial e interfacial, os biossurfactantes promovem a dessorção dos hidrocarbonetos da matriz do solo, aumentando a mobilidade e a solubilidade dos contaminantes e tornando mais eficiente a biodegradação (Volkering *et al.*, 1998).

Os biossurfactantes são caracterizados por apresentarem alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e estabilidade molecular em uma larga faixa de pH e temperatura. Em virtude dessas características, apresentam grande potencial de aplicação em vários campos, incluindo o da biorremediação de ambientes contaminados com petróleo

(Cameotra e Singh, 2008; Calvo *et al.*, 2009; Thavasi *et al.*, 2011). Embora o custo de produção dos biossurfactantes seja desvinculado dos preços de combustíveis fósseis, eles não competem em preço com os dos surfactantes sintéticos no mercado (Nitschke e Patore, 2002), em grande parte em razão de seu alto custo de produção em larga escala, relacionado ao baixo rendimento e, principalmente, às etapas de purificação e recuperação a partir dos meios de cultivo (Nitschke e Patore, 2002). Contudo, ao longo dos últimos anos, o mercado mundial de biossurfactantes tem crescido de forma considerável, em consequência das características bastante atrativas aos consumidores, anteriormente citadas, além de ser um produto ambientalmente amigável. Um relatório de mercado publicado pela *Transparency Market Research* (<http://www.transparencymarketresearch.com>) "*Biosurfactants Market - Global Scenario, Raw Material and Consumption Trends, Industry Analysis, Size, Share and Forecasts, 2011 - 2018*" (Biosurfactants..., 2012), estimou que o mercado mundial de biossurfactantes, que valia USD 1,735.5 milhões em 2011, deve alcançar USD 2,210.5 milhões em 2018, crescendo a uma taxa anual média de 3,5 %. O volume do mercado mundial de biossurfactantes deverá atingir 476,512.2 toneladas em 2018, sendo 21 % desse total devidos à crescente demanda da Ásia, África e América Latina.

Nesse contexto, surge a necessidade de se explorarem novos processos que possibilitem a redução do custo de produção de biossurfactantes, baseados na otimização de formas de recuperação ou concentração, a fim de viabilizar a sua utilização na indústria, sobretudo no campo da biorremediação. Uma alternativa promissora é a obtenção de biossurfactantes na forma de pó pelo processo *spray drying*.

Spray drying é um processo de secagem pelo qual um material no estado fluido é convertido em uma forma particulada seca. O material obtido é um pó que apresenta baixíssima umidade (Ochoa *et al.*, 2002). Essas características conferem ao material secado durabilidade e facilidade na conservação, além de menor volume e peso reduzido, facilitando sua armazenagem e transporte. Essas particularidades contribuem em grande parte para que o produto comercial seja mais barato, possibilitando a sua aplicação em diversas áreas, incluindo a biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo.

2. Biodegradação e biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo em solos

2.1. Aspectos gerais

Derramamentos e vazamentos acidentais de petróleo ou derivados têm sido noticiados frequentemente nos meios de comunicação, aumentando a preocupação de governos e agências de proteção ambiental, pois tais compostos podem ser fontes significativas de poluição ambiental (Trindade *et al.*, 2005).

Quando a contaminação ocorre em terra muitos problemas são gerados, incluindo a contaminação de lençóis freáticos e a diminuição da qualidade do solo, gerando consequências como inutilização da água e redução da produtividade primária (Yakubu, 2007). Em razão de muitos hidrocarbonetos serem carcinogênicos e mutagênicos, também há possibilidade de dano à saúde dos homens e animais (Mueller *et al.*, 1992; Okoh, 2006). Adicionalmente, os compostos do petróleo apresentam, em sua maioria, elevada persistência no ambiente, resultante, em parte, de sua baixa solubilidade em água e forte tendência de sorção à fase sólida dos solos e, também, de sua elevada resistência à degradação (Cao *et al.*, 2009; Das e Chandran, 2009).

Nesse contexto, muitas agências e órgãos de proteção ambiental no mundo, como o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) no Brasil, a Agência Norte Americana de Proteção Ambiental - USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) e a Agência Europeia do Ambiente (*European Environment Agency*) têm estipulado limites máximos de concentração desses compostos no ar, na água e no solo. Em razão disso, tem sido crescente a busca por métodos mais eficientes de remoção desses poluentes do meio ambiente. A capacidade de muitos organismos em lidar com condições diversas e transformar compostos tóxicos em outros menos nocivos ao ambiente e aos seres vivos faz deles excelentes agentes para atuarem em técnicas de remediação de ambientes contaminados com compostos do petróleo (Okoh, 2006; Das e Chandran, 2011). Dessa forma, a biorremediação surgiu como um processo biotecnológico promissor para esse fim.

As técnicas de biorremediação fazem uso do potencial de organismos vivos, normalmente plantas e micro-organismos, ou de suas enzimas, para remover (remediar) ou reduzir a concentração de poluentes do ambiente, sob condições controladas, a níveis aceitáveis por agências de proteção ambiental (Yakubu, 2007; Pereira e Freitas, 2012). Durante a degradação efetuada por micro-organismos, os compostos orgânicos são convertidos por oxidação em moléculas mais simples, intermediárias de vias metabólicas, ou são mineralizados a CO₂ e H₂O (Seo *et al.*, 2009). O processo pode ocorrer sob condições aeróbias ou na presença de aceptores de elétrons alternativos,

como sulfato e nitrato. Dentre as principais vantagens da biorremediação, destacam-se a menor agressividade ao meio ambiente, flexibilidade e adaptabilidade a condições ambientais variáveis, possibilidade de degradação da maior parte dos poluentes orgânicos, implementação *in situ*, sem a necessidade de transporte do resíduo para outro local, e boa relação custo/eficiência do processo, permitindo que tal tecnologia seja utilizada em escala comercial (Bamforth e Singleton, 2005; Mrozik e Seget, 2010; Reginatto *et al.*, 2011; Nisenbaum *et al.*, 2013).

Muitos micro-organismos que apresentam capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo têm sido reportados na literatura, incluindo bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* (Crapez *et al.*, 2002, Mandri e Lin, 2007, Seo *et al.*, 2009; Wetler-Tonini *et al.*, 2011) e fungos dos gêneros *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Chrysosporium* (Cerniglia, 1997, Clemente *et al.*, 2001, Jacques *et al.*, 2005). Como não é conhecida alguma espécie microbiana que seja capaz de degradar sozinha todos os compostos presentes no petróleo (Crapez *et al.*, 2002; Maciel, 2004), consórcios microbianos têm sido utilizados com a finalidade de se ampliar o espectro de degradação de complexos de hidrocarbonetos no solo.

As técnicas de biorremediação podem ser divididas em dois grupos, relativos à localização espacial do processo: (1) biorremediação *in situ*, na qual o tratamento é executado no próprio local contaminado ou (2) biorremediação *ex situ*, em que há emprego de técnicas de escavação e transporte de solo para locais fora da zona contaminada, para posterior tratamento. Durante o processo de biorremediação, três diferentes estratégias podem ser adotadas: (1) atenuação natural, em que o contaminante permanece no local e a descontaminação do ambiente ocorre por meio de processos naturais como biodegradação e volatilização (Mulligan e Yong, 2004; Foght, 2008); (2) bioaugmentação, a qual envolve a inoculação do local contaminado com culturas puras ou consórcio microbiano contendo micro-organismos selecionados, com elevado potencial de degradação do contaminante; e (3) bioestimulação, método em que nutrientes, aceptores de elétrons e outros compostos são adicionados ao material contaminado, com a finalidade de estimularem a atividade metabólica da comunidade indígena com capacidade de degradar o contaminante, para promover o aumento da sua biomassa no solo.

As estratégias de bioestimulação e a bioaugmentação apresentaram melhores resultados do que a atenuação natural em diferentes solos de biomas brasileiros típicos

(Mata Atlântica e Cerrado) contaminados com óleo cru (Alvarez *et al.*, 2011). Contudo, essa última foi considerada a técnica com melhor relação custo-benefício dentre as analisadas. Também foi constatado que a taxa de biodegradação não foi influenciada somente pelo tipo de técnica empregada, mas também pela composição química e física de cada solo e, principalmente, pelo tempo.

2.2. Limitações à biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solos

A degradação microbiana de hidrocarbonetos de petróleo é influenciada por fatores físicos, químicos e biológicos, os quais podem afetar a eficiência da biorremediação por atuarem tanto sobre a biodisponibilidade dos poluentes quanto sobre a atividade metabólica dos indivíduos da comunidade microbiana. Dentre esses fatores, os de maior importância parecem ser a umidade do solo, o pH, a temperatura e o teor de nutrientes (relação C:N:P) (Vidali, 2001; Wetler-Tonini *et al.*, 2011). A composição química e a estrutura física do solo também tem influência sobre a biorremediação de compostos orgânicos. Solos mais argilosos e siltosos, assim como aqueles com elevado teor de matéria orgânica, tendem a formar complexos com contaminantes orgânicos mais facilmente do que aqueles arenosos, e a difusão da água é também mais lenta, em razão da menor permeabilidade (Labud *et al.*, 2007; Pereira, *et al.*, 2009). Adicionalmente, os micro-organismos podem ser excluídos de microsítios contendo moléculas dos contaminantes pelo tamanho dos poros entre as partículas, quando esses são muito pequenos. Nesse caso, as taxas de biodegradação são dependentes das taxas de difusão radial, entre as partículas, de compostos orgânicos hidrofóbicos, de oxigênio e de nutrientes (Noordman *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2002).

O tamanho das partículas do solo também pode influenciar a biodegradação do petróleo. Em um recente trabalho (Chang *et al.*, 2013), foi observado que a adição de nutrientes a solos argilosos contaminados com petróleo aumenta de forma significativa a biodegradação de hidrocarbonetos C_{16} – C_{34} somente nos solos que contêm macroagregados (> 2 mm). De acordo com os autores, esses solos apresentam maior proporção de poros potencialmente acessíveis às bactérias do que os solos que contêm mesoagregados (0,25-2 mm), o que possibilita a existência de mais sítios metabolicamente ativos para a biodegradação. Em adição, nos solos que contêm mesoagregados, alguns hidrocarbonetos encontram-se presentes no denso *core* dos

solos, estando, dessa forma, indisponíveis para serem utilizados pelos micro-organismos.

À medida que os hidrocarbonetos do petróleo percolam pelos poros do solo, podem dissolver-se na solução ali presente, volatilizar-se, ou ser adsorvidos às superfícies dos minerais e à matéria orgânica via uma combinação de processos físicos e químicos (Figura 1). Dessa forma, a baixa solubilidade em água e a forte tendência de sorção dos hidrocarbonetos à fase sólida do solo podem resultar na redução da quantidade desses compostos suscetível ao ataque microbiano, uma vez que os micro-organismos somente absorvem nutrientes que estejam em solução (Johnsen, Wick e Harms, 2005; Singh, Hamme e Ward, 2007). Uma forma de se aumentar a disponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos para as células microbianas e, conseqüentemente, acelerar a sua biodegradação, é a adição de biossurfactantes ou de micro-organismos produtores desses compostos aos solos contaminados.

3. Biossurfactantes

3.1. Biossurfactantes e sua aplicação na biorremediação de solos contaminados com petróleo

Os biossurfactantes são moléculas que apresentam característica anfipática, em razão da presença de grupos hidrofílicos (aminoácidos, fosfato ou carboidratos) e hidrofóbicos (longa cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos) na mesma estrutura. Essas biomoléculas distribuem-se nas interfaces de substâncias com diferentes graus de polaridade - líquido-líquido, gás-líquido ou sólido-líquido -, causando a diminuição das tensões interfaciais de compostos imiscíveis (Makkar *et al.*, 2011; Okoliegbe e Agarry, 2012). Os biossurfactantes são produzidos por micro-organismos, porém moléculas com ação semelhante podem também ser obtidos por processos químicos (Mulligan *et al.*, 2001; Colla e Costa, 2003). Os surfactantes microbianos exibem diversas vantagens sobre os sintéticos, como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade em água e solo, alta seletividade e atividade estável em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade (Kim *et al.*, 2000; Hudak e Cassidy, 2004).

Essas biomoléculas consistem, em sua maioria, de metabólitos secundários, sintetizados geralmente durante a fase estacionária. Eles podem ser secretados pelo

micro-organismo, auxiliando na solubilização de substratos hidrofóbicos (Prabhu e Phale, 2003), ou podem permanecer associados à parede celular, facilitando o transporte e translocação de substratos insolúveis através da membrana celular como, por exemplo, os hidrocarbonetos (Bognolo, 1999; Piróllo, 2006).

A atividade de um biossurfactante pode ser determinada por meio da medida das mudanças nas tensões superficial e interfacial (Desai e Banat, 1997). A tensão superficial é a medida de energia livre por unidade de área associada com uma superfície ou uma interface (Rosen, 1978), enquanto que a tensão interfacial está relacionada com força a de atração mantida dentro das moléculas em um líquido (Satpute *et al.*, 2010). A tensão superficial da água destilada é 72 mN m^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, e um biossurfactante considerado efetivo é capaz de reduzir este valor para abaixo de 40 mN m^{-1} (Bodour e Miller-Maier, 1998; Tabatabaee *et al.*, 2005). Conforme a concentração de um biossurfactante aumenta em um sistema ar/água ou óleo/água, ocorre uma redução na tensão superficial até um valor crítico, a partir do qual as moléculas de surfactante se associam formando estruturas como micelas, bicamadas e vesículas (Desai e Banat, 1997). Esse valor é conhecido como Concentração Micelar Crítica (CMC), que é a concentração mínima de biossurfactante necessária para iniciar a formação de micelas. De modo inverso à CMC, a Diluição Micelar Crítica (DMC) é o ponto a partir do qual as micelas desfazem-se e distribuem-se na solução na qual estão inseridas.

Nos últimos anos, muitos biossurfactantes têm sido estudados visando à sua aplicação em diversas áreas, como nas indústrias médica, cosmética, alimentícia, petrolífera e na área ambiental (Singh *et al.*, 2007; Cameotra e Makkar, 2010). A indústria petrolífera apresenta grande potencial para a utilização de biossurfactantes, uma vez que esses biotensoativos possuem propriedades favoráveis, como baixa toxicidade e capacidade de aumentar a solubilidade dos componentes do petróleo. Tais compostos podem substituir os surfactantes sintéticos e, portanto, ser empregados em toda a cadeia de processamento de petróleo, principalmente na recuperação melhorada de petróleo (MEOR) (Millioli *et al.*, 2008), na limpeza de tanques de armazenamento (Colla e Costa, 2003), no transporte de óleo cru em oleodutos (Okoliegbe e Agarry, 2012) e na descontaminação de ambientes contaminados com compostos do petróleo (Thavasi *et al.*, 2011).

Quando biossurfactantes são adicionados a solos contaminados com hidrocarbonetos do petróleo, sua ação sobre os contaminantes pode ocorrer por meio de

dois mecanismos distintos: i) em concentrações abaixo da CMC, o biossurfactante pode diminuir as tensões superficial e interfacial entre ar/água e solo/sistema aquoso, resultando em uma maior área de contato, estimulando o transporte de massa do poluente a partir do solo para a fase aquosa (Volkering *et al.*, 1998), permitindo a formação de micro-emulsões e a mobilização dos hidrocarbonetos; ii) quando os biossurfactantes estão em concentrações acima da CMC, os hidrocarbonetos são incorporados no centro hidrofóbico das micelas e podem penetrar na solução aquosa do solo (Jacques *et al.*, 2007), sendo, portanto, solubilizados, tornando-se mais acessíveis aos micro-organismos. Assim, a solubilização de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) é proporcional à dose de surfactante acima da CMC (Zheng e Obbard, 2002). Estudo do efeito da adição de concentrações do biossurfactante ramnolipídio em solo com alto teor de argila e bastante intemperizado demonstrou que, à medida que a concentração do ramnolipídio aumentava, a eficiência de biodegradação também aumentava (Millioli *et al.*, 2005). Dessa forma, a solubilização depende do tipo e dose do biossurfactante, da textura do solo e do tempo em que o tensoativo permanece em contato com o solo (Cameotra e Makkar, 2010).

O potencial dos biossurfactantes em acelerar a biorremediação de solos contaminados com petróleo tem sido documentado em trabalhos que mostram resultados favoráveis (e.g. Scheibenbogen *et al.*, 1994; Willumsen e Karlson, 1997; Kosaric, 2001; Christofi e Ivshina, 2002; Rahman *et al.*, 2003; Urum *et al.*, 2003; Batista *et al.*, 2006; Whang *et al.*, 2008; Calvo *et al.*, 2009; Anyanwu *et al.*, 2011). Existe também relatos da biorremediação de poluentes como a borra de óleo com uso de um consórcio microbiano formado por dois isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e um isolado de *Rhodococcus erythropolis* produtores de biossurfactantes ramnolipídeos (Cameotra e Singh, 2008). O consórcio foi capaz de degradar 90 % dos hidrocarbonetos em seis semanas quando em cultura líquida. Já nos solos contaminados com 1 % (v/v) de lama de óleo cru, 91 % do conteúdo de hidrocarbonetos foram degradados em cinco semanas. O biotensoativo Emulsan[®], sintetizado por *Acinetobacter calcoaceticus* (Rosenberg & Rosenberg, 1981), tem sido empregado no tratamento de áreas contaminadas com petróleo por apresentar bons resultados na diminuição da tensão superficial e na redução da viscosidade do óleo (Bezerra, 2012). Tais resultados mostram a eficiência dos biossurfactantes no processo de biorremediação.

O potencial do biossurfactante lipopeptídico surfactina na biorremediação de áreas contaminadas com petróleo tem sido demonstrado (Whang *et al.*, 2008; Lai *et al.*,

2009; e Zheng *et al.*, 2012). Esse biossurfactante, produzido por estirpes de *Bacillus subtilis* (Barros *et al.*, 2007), apresenta baixa CMC e alto poder de redução da tensão superficial da água, de 72 para 27,9 mN m⁻¹ a uma concentração de 50 mg L⁻¹ (Ali *et al.*, 2010), e a tensão interfacial entre água/hexadecano para menos que 1 mN m⁻¹ (Muthusamy *et al.*, 2008; Okoliegbe e Agarry, 2012). Além disso, apresenta alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e grande estabilidade a diferentes temperaturas e valores de pH (Kosaric, 1992; Cameotra e Makkar, 1998; Lima *et al.*, 2011; Vaz *et al.*, 2012).

3.2. Produção de biossurfactantes: uso da técnica de *spray drying* como alternativa para a redução dos custos de produção, transporte e estocagem.

Embora a surfactina apresente propriedades favoráveis à aplicação na descontaminação de compostos petrolíferos, o seu emprego comercial, assim como o de outros biossurfactantes, ainda é limitado pelo alto custo de produção. Os processos de recuperação e/ou purificação de produtos biotecnológicos são responsáveis por cerca de 60 % do custo total de sua produção (Satpute *et al.*, 2010).

Uma forma alternativa de recuperação de biossurfactantes ainda inexplorada é a obtenção do produto na forma em pó por meio da técnica de *spray drying*. Nessa técnica, há a conversão de material no estado fluido (solução, suspensão ou pasta) em uma forma particulada seca. Esse processo é bastante atrativo para a produção de biossurfactantes, pois não há necessidade de se utilizar técnicas adicionais de recuperação e purificação, sendo a cultura, previamente cultivada e contendo o biossurfactante excretado, secada diretamente no equipamento.

Esse método de secagem é, atualmente, empregado em larga escala por diversos segmentos industriais, dentre os quais se destacam aqueles das indústrias química, farmacêutica e de cerâmica (Madeira, 2009; Jayasundera *et al.*, 2011). Os produtos obtidos pela técnica *spray drying* apresentam muitas características vantajosas, como boa qualidade, facilidade de manipulação (Carneiro, 2013) e estabilidade, pois contêm baixa umidade, o que minimiza as alterações físicas, químicas e microbiológicas durante seu armazenamento (Ochoa *et al.*, 2002; Hatamipour *et al.*, 2007; Madeira, 2009). Também apresentam menor volume e peso reduzido, facilitando sua

armazenagem e transporte. Essas particularidades contribuem em grande parte para que o produto final tenha um menor custo de produção, tornando-se economicamente viável.

Em nosso laboratório, a secagem pela técnica de *spray dryer* da surfactina excretada em meio de cultura previamente cultivado com *B. subtilis* mostrou bons resultados (Barcelos *et al.*, 2014). Argila e maltodextrina foram adicionadas ao caldo de fermentação como adjuvantes de secagem, obtendo-se um produto em pó, com pouca higroscopicidade e com suas propriedades tensoativas mantidas após o processo.

Embora se tenha demonstrado a eficiência do processo de *spray drying* para a obtenção de biossurfactante desidratado, não foram avaliadas, no trabalho anterior, as aplicações potenciais do mesmo e os efeitos desse tipo de preparação sobre as comunidades microbianas de ambientes onde surfactina desidratada tenha sido aplicado. Estudos dessa natureza são essenciais para se estabelecerem protocolos de aplicação e para se avaliar a segurança na utilização de tal formulação de biossurfactante.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A.; IKRAMULLAH, M.; ASIF, A.; AHMAD, A.; JAMAL, A.; JAFFRI, S. A. Evaluation of lipopeptide (surfactin) production by *Bacillus subtilis*. *Biomedica*, v. 26, p. 34-38, 2010.

ALVAREZ, V. M.; MARQUES, J. M.; KORENBLUM, E.; SELDIN, L. Comparative bioremediation of crude oil-amended tropical soil microcosms by natural attenuation, bioaugmentation, or bioenrichment. *Applied and Environmental Soil Science*, v. 2011, 2011.

ANYANWU, C. U.; OBI, S. K. C.; OKOLO, B. N. Lipopeptide biosurfactant production by *Serratia marcescens* NSK-1 strain isolated from petroleum contaminated soil. *Journal of Applied Sciences Research*, v. 7, n. 1, p. 79-87, 2011.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnolog*, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.

BARCELOS, G. C.; DIAS, L. C.; FERNANDES, P. L.; FERNANDES, R. C. R.; BORGES, A. C.; KARLOS HM KALKS, K. H. M.; TÓTOLA, M. R. Spray drying as a strategy for biosurfactant recovery, concentration and storage. *SpringerPlus*, v. 3, n. 49, 2014.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicação em alimentos. *Química Nova*, v. 30, n.2, p. 409-414, 2007.

BATISTA, S. B. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 868–875, 2006.

BEZERRA, M. S. Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono. TESE (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

BIOSURFACTANTS industry is expected to reach USD 2,210.5 million globally in 2018: Transparency market research. PR Newswire, Albany, New York, 24 jul. 2012. Disponível em: <http://www.prnewswire.com/news-releases/biosurfactants-industry-is-expected-to-reach-usd-22105-million-globally-in-2018-transparency-market-research-163530426.html>. Acesso em 04 jan. 2014.

BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. Application of a modified drops collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v. 32, p. 273-280, 1998.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces*, v. 152, p. 41-52, 1999.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I., GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. *Future prospects. Science of the Total Environment*, v. 407, n. 12, p. 3634-3640, 2009.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. *Pure and Applied Chemistry*, v. 82, n. 1, p. 97-116, 2010.

CAMEOTRA, S. S.; SINGH, P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 62, n. 3, p. 274-280, 2008.

CAO, B.; NAGARAJAN, K.; LOH, K-C. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 2, p. 207-228, 2009.

CARNEIRO, H. C. F.; TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F.; HUBINGER, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, v. 115, n. 4, p. 443-451, 2013.

CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v. 19, n. 5-6, p. 324-333, 1997.

CHANG, W.; AKBARI, A.; SNELGROVE, J.; FRIGON, D.; GHOSHAL, S.; Biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated clayey soils from a sub-arctic site: The role of aggregate size and microstructure. *Chemosphere*, v. 91, p. 1620-1626, 2013.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, n. 6, p. 915-929, 2002.

CLEMENTE, A. R.; ANAZAWA, T. A.; DURRANT, L. R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, n. 4, p. 255-261, 2001.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor*, Rio Grande, RS, v. 13; p. 85-103, 2003.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo. *Ciência Hoje*, v. 32, n. 179, p. 32-37, 2002.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, v. 2011, 2011.

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

FOGHT, J. Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: Pathways and prospects. *Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology*, v. 15, p. 93-120, 2008.

HATAMIPOUR, M. S.; KAZEMI, H. H.; NOORALIVAND, A.; NOZARPOOR, A. Drying characteristics of six varieties of sweet potatoes in different dryers. *Food and Bioproducts Processing*, v. 85, n. 3, p. 171–177, 2007.

HUDAK, A. J.; CASSIDY, D. P. Stimulating in-soil rhamnolipid production in a bioslurry reactor by limiting nitrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 88, n. 7, p. 861-868, 2004.

JACQUES, R. J. S. Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo. 2005. 188 f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2005.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência e Natura*, UFSM, v. 29, n. 1, p. 7-24, 2007.

JAYASUNDERA, M.; ADHIKARI, B.; ADHIKARI, R.; ALDRED, P. The effect of protein types and low molecular weight surfactants on spray drying of sugar-rich foods. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 459-469, 2011.

JOHNSEN, A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, v. 133, n. 1, p. 71-84, 2005.

KIM, S. K.; LIM, E. J.; LEE, S. O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia sp.* L-417. *Biotechnology Applied and Biochemistry*, v. 31, p. 249-253, 2000.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 39, n. 4, p. 295-304, 2001.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 64, p. 1731-1737, 1992.

LABUD, V.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, v. 66, p. 1863-1871, 2007.

LAI, C.; HUANG, Y.; WEI, Y.; CHANG, J. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 167, n. 1-3, p. 609-614, 2009.

LIMA, T. M.; PROCÓPIO, L. C.; BRANDÃO, F. D.; CARVALHO, A. M.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Biodegradability of bacterial surfactants. *Bioodegradation*, v. 22, n. 3, p.585-92, 2011.

MACIEL, B. M. Estudos prospectivos de micro-organismos de solo de *landfarm* com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo. 2004. 77p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)- Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2004.

MADEIRA, A. N. Otimização do processo de spray drying pelo uso de pré-desumidificadores no ar de entrada. 2009. 61p. Monografia - Universidade de Taubaté, Taubaté, SP, 2009.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, v. 1, n. 5, p. 1- 19, 2011.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 1, p. 023-027, 2007.

MILLIOLI, V. S.; SANTOS, L. C.; RIZZO, A. C. L.; SANTOS, R. L. C.; SORIANO, A. U. Evaluation of optimum concentration of two anionic surfactant in the biodegradation of crude oil contaminated soil. In: CONSOIL, 3-7 Outubro, Bordeaux, França, 2005. Proceedings of the 9th International FZK/TNQ Conference on Soil-Water Systems, 1 CD-ROM, 2005.

MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, L. G. S.; SÉRVULO, E. F. C.; CARVALHO, D. D. Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização surfactantes. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 95p. (Série Tecnologia Ambiental, 50).

MROZIKA, A.; SEGET, Z. P. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, v.165, p.363-375, 2010.

MUELLER, J. G.; RESNICK, S. M.; SHELTON, M. E.; PRITCHARD, P. H. Effect of inoculation on the biodegradation of weathered Prudhoe Bay crude oil. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 10, p. 95-102, 1992.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N. Natural attenuation of contaminated soils. *Environment International*, v. 30, n. 4, p. 587-601, 2004.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *Journal of Hazardous Materials*, v. 85, p. 111-125, 2001.

MUTHUSAMY, K. et al. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science*, v. 94, n. 6, p. 736-747, 2008.

NISENBAUM, M.; SENDRA, G. H.; GILBERT, G. A. C.; SCAGLIOLA, M.; GONZÁLEZ, J. F.; MURIALDO, S. E. Hydrocarbon biodegradation and dynamic laser speckle for detecting chemotactic responses at low bacterial concentration. *Journal of Environmental Sciences*, v. 25, n. 3, p. 613-625, 2013.

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

NOORDMAN, W. H.; WACHER, J. J. J.; BOER, G. L. de; JANSSEN, D. B. The enhancement by biosurfactants of hexacadene degrade by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *Journal of Biotechnology*, v. 94, p. 195-121, 2002.

OCHOA, M. R.; KESSELER, A. G.; PIRONE, B. N., MÁRQUEZ, C. A.; DE MICHELIS, A. Shrinkage during convective drying of whole rose hip (*Rosa Rubiginosa* L.) fruits. *LWT - Food Science and Technology*, v. 35, n. 5, p. 400-406, 2002.

OKOH, A. I. Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, v. 1, n. 2, p. 38-50, 2006.

OKOLIEGBE, I. N.; AGARRY, O. O. Application of microbial surfactant (a review). *Scholarly Journals of Biotechnology*, v. 1, n. 1, p. 15-23, 2012.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v. 6, n. 6, p. 975-1006, 2012.

PEREIRA, N. J.; GOMES, E. de B.; SORIANO, A. U. Biodegradação de hidrocarbonetos. *Séries em Biotecnologia*, Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 1 ed., v. 3, 75 p., 2009.

PIRÔLLO, M. P. S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

PRABHU, Y.; PHALE, P. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas sp.* Strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, p. 342-351, 2003.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, v. 90, p. 159-168, 2003.

REDDY, C. M.; EGLINTON, T. I.; HOUNSHELL, A.; WHITE, H. K.; XU, L.; GAINES, R. B.; FRYSSINGER, G. S. The west falmouth oil spill after thirty years: the persistence of petroleum hydrocarbons in marsh sediments. *Environmental Science & Technology*, v. 36, p. 4754-4760, 2002.

REGINATTO, C.; COLLA, L. M.; THOMÉ, A. Biorremediação de resíduos oleosos em solos. *CIATEC – UPF*, v. 3, n. 2, p. 19-31, 2011.

ROSEN, M. J. Surfactants and interfacial phenomena. John Wiley & Sons, New York, 1978.

ROSENBERG, M.; ROSENBERG, E. Role of Adherence in Growth of *Cinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on Hexadecane. *Journal of Bacteriology*, v. 148, p. 51-57, 1981.

SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M.; CHOPADEV, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 30, n. 2, p. 127-44, 2010.

SCHEIBENBOGEN, K.; ZYTNER, R. G.; LEE, H.; TREVORS, J. T.; Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 59, n. 1, p. 53-59, 1994.

SEO, J. S.; KEUM, Y. S.; LI, Q. X. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 6, n. 1, p. 278-309, 2009.

SINGH, A.; HAMME, J. D. V.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 99-121, 2007.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *TRENDS in Biotechnolog*, v. 22, n. 3, p. 142-146, 2004.

TABATABAEE, A.; ASSADI, M. M.; NOOHI, A. A.; SAJADIAN, V. A. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, v. 2, p. 6-12, 2005.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. M. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Coryne bacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 772-778, 2011.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C.; LEITE, S. G.; SORIANO, A. U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere*, v. 58, p. 515-522, 2005.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; GOPUR, M. Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 81, n. 3, p. 203-209, 2003.

VAZ, D. A.; GUDIÑA, E. J.; ALAMEDA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R.; Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 89, p. 167-174, 2012.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; RULKENS, W. H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*, v. 8, p. 401-417, 1998.

WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados. *Revista Virtual de Química*, v. 3, n. 2, p. 78-87, 2011.

WHANG, L. M.; LIU, P. W.; MA, C. C.; CHENG, S. S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 151, n. 1, p. 155-63, 2008.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, v. 7, p. 415– 423, 1997.

YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 24, p. 2735-2739, 2007.

ZHENG, C.; WANG, M.; WANG, Y.; HUANG, Z. Optimization of biosurfactant-mediated oil extraction from oil sludge. *Bioresource Technology*, v. 110, p. 338-342, 2012.

ZHENG, Z.; OBBARD, J. P. Evaluation of an elevated non-ionic surfactant critical micelle concentration in a soil/aqueous system. *Water Research*, v. 36, p. 2667–2672, 2002.

CAPÍTULO II

ARTIGO

**SURFACTINA DESIDRATADA COMO AGENTE
POTENCIALIZADOR DA BIORREMEDIAÇÃO DE
SOLOS CONTAMINADOS COM PETRÓLEO**

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de biorremediação microbiana fazem uso de micro-organismos ou compostos produzidos por eles para degradar ou transformar contaminantes a formas menos tóxicas ou não tóxicas, visando à recuperação do ambiente contaminado (Cauwenberg e Roote, 1998; Pereira e Freitas, 2012). A biorremediação tem sido utilizada no tratamento de áreas contaminadas com petróleo e seus derivados, com o intuito de minimizar o impacto ambiental negativo causado por essa classe de contaminantes, em razão de características como baixo custo, possibilidade de mineralização total do contaminante e o fato de ser menos impactante ao meio ambiente do que muitos métodos físicos e químicos.

A despeito das vantagens mencionadas, a eficiência da biorremediação em solos é influenciada pelas condições ambientais locais, como umidade, teor de nutrientes, pH, temperatura, concentração de oxigênio e tipo de solo (Vidali, 2001; Shukla *et al.*, 2010). Solos que contêm altos teores de matéria orgânica e/ou argila apresentam grande capacidade de sorção de hidrocarbonetos, resultando em redução da disponibilidade desses compostos para serem utilizados pelos micro-organismos. Uma forma de se aumentar a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos no solo e, com isso, acelerar o processo de degradação dos mesmos no ambiente, é por meio da adição de biossurfactantes. Essas biomoléculas anfipáticas, produzidas por micro-organismos, têm a capacidade de se posicionar em interfaces de fases imiscíveis, reduzindo as tensões superficial e interfacial (Lin, 1996). Dessa forma, os biossurfactantes podem promover a dessorção dos hidrocarbonetos da matriz do solo e a formação de microemulsões, aumentando a mobilidade e a solubilidade dos contaminantes que, por consequência, se tornam mais acessíveis aos micro-organismos.

A surfactina é um biossurfactante lipopeptídico produzido por *Bacillus subtilis* que se destaca por seu alto poder de redução da tensão superficial da água (de 72 para 27,9 mN m⁻¹ a 20 °C), quando em concentração acima de 50 mg L⁻¹ (Arima *et al.*, 1968). Apresenta ainda alta estabilidade sob uma ampla faixa de pH e temperatura (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008). Alguns autores relataram a eficiência da surfactina como agente ativo na biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (Cubitto *et al.*, 2004; Whang *et al.*, 2008).

Embora a surfactina apresente propriedades favoráveis à aplicação na descontaminação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, o seu

emprego comercial, assim como o de outros biossurfactantes, ainda é limitado pelo alto custo de produção em larga escala, não competindo economicamente com os surfactantes sintéticos.

A recuperação e/ou purificação de produtos biotecnológicos são responsáveis por cerca de 60 % do custo total de produção desses (Satpute *et al.*, 2010). Uma forma alternativa de recuperação de biossurfactantes ainda inexplorada é por meio da técnica de *spray drying*. Nessa técnica, há a conversão de um material no estado fluido (solução, suspensão ou pasta) em uma forma particulada seca. Esse processo é atrativo para a produção de biossurfactantes a serem empregados em diferentes processos na cadeia de petróleo, a exemplo da biorremediação e recuperação avançada de petróleo, os quais não exigem elevado grau de pureza dessas moléculas. A secagem por *spray drying* da surfactina excretada em meio de cultura previamente cultivado com *B. subtilis* mostrou bons resultados (Barcelos *et al.*, 2014). Argila e maltodextrina foram adicionadas ao material a ser desidratado para auxiliar no processo de secagem. Como resultado, obteve-se um material em pó, com pouca higroscopicidade e que manteve suas propriedades tensoativas após ser novamente solubilizado em água deionizada. Destaca-se que os materiais em pó apresentam muitas características vantajosas como facilidade de manipulação (Carneiro, 2013), baixa umidade, menor volume e massa. Essas características garantem estabilidade ao produto, permitindo que ele seja armazenado por um longo período de tempo, além da maior facilidade no seu transporte. Outra vantagem da utilização de biossurfactantes em pó na biorremediação é a sua fácil aplicação sobre a área a ser tratada, viabilizando ainda mais o processo.

A despeito das vantagens da utilização de biossurfactantes desidratados acima mencionadas, não há relatos da avaliação dessa forma de biossurfactantes durante a biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. Nesse trabalho, foi realizado um estudo comparativo do efeito da surfactina em pó, produzida pelo processo de *spray drying*, sobre a biorremediação de dois solos tropicais brasileiros contaminados com petróleo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta, análise e preparo dos solos

As amostras de solo utilizadas são provenientes do banco de solos da Universidade Federal de Viçosa. No momento da coleta, os solos estavam armazenados em baias cobertas, protegidos da chuva e encontravam-se secos, sem a presença de vegetação. Foram escolhidos dois tipos de solo, baseando-se em diferenças na granulometria. Os solos foram classificados como franco-argilo-arenoso (solo 1), proveniente de Viçosa- Minas Gerais (MG), e solo muito argiloso (solo 2) (Tabela 1) proveniente de Capinópolis (MG), Brasil.

Cerca de 3 kg de cada solo foram peneirados em malha de 2 mm, e porções de 200 g foram submetidas à análise das propriedades físicas e químicas (Tabela 1).

Tabela 1 - Características físicas e químicas dos solos utilizados no estudo.

Característica	Amostra de Solo	
	Solo FAA*	Solo ARG**
Matéria Orgânica (MO) (dag Kg ⁻¹)	2,95	1,7
Potássio (mg dm ⁻³)	142,5	48,5
Fósforo (mg dm ⁻³)	19,7	1,9
Fósforo remanescente (P-rem) (mg dm ⁻³)	36,9	11,55
Nitrogênio total (dag Kg ⁻¹)	0,11	0,08
pH	5,69	4,52
Umidade (%)	1,64	2,56
CRA: capacidade de retenção de água (%)	39,57	63,65
Argila (%)	24	63
Silte (%)	7	5
Areia grossa (%)	28	14
Areia fina (%)	41	18

*Franco-argilo-arenoso; **Muito argiloso

Para a realização dos ensaios de biorremediação, foram constituídos microcosmos contendo porções de 70 cm³ de solo. As amostras foram adicionadas a

frascos respirométricos de vidro (125 mL), seguindo-se a correção da concentração de macronutrientes, do pH e do teor de umidade para 60% da CRA (capacidade máxima de retenção de água).

Os valores de pH dos solos em cada um dos frascos foi corrigido para 7 (Júlio, 2010), com algumas modificações. Aos solos foi adicionada uma mistura $\text{CaCO}_3:(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (4:1 m/m), de acordo com as equações (Tabela 2) obtidas a partir de curvas de regressão linear, construídas a partir dos dados de pH em resposta a doses da mistura (g dm^{-3}) solo).

Tabela 2 - Equações de regressão obtidas a partir das curvas de pH dos solos em resposta à adição de doses da mistura de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio.

Solo	Equação de regressão	R ²
1	$0,3658x + 6,8274$	0,9996
2	$0,5217x + 5,2515$	0,9912

Com base nos resultados das análises dos solos, foram realizadas as aplicações de nitrogênio na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, de modo a se obter uma concentração final de 150 mg Kg^{-1} , e de potássio, na forma de KH_2PO_4 , para uma concentração de 120 mg dm^{-3} . A aplicação do potássio foi realizada somente no solo ARG, uma vez que o solo FAA já continha a concentração adequada ($>120 \text{ mg dm}^{-3}$). O fósforo foi aplicado na forma $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. A dose foi determinada pela fórmula $y = 436,5 - 5,39x$, sendo $x = P_{\text{rem}}$, descontando-se desse valor a quantidade do elemento aplicado na forma KH_2PO_4 . Após a adição dos nutrientes, os microcosmos foram incubados à temperatura ambiente por cerca de 15 dias.

2.2. Produção de surfactina

2.2.1. Isolado bacteriano

Para a produção de surfactina, foi utilizado o isolado *Bacillus subtilis* LBBMA RI 4914, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.2.2. Produção da surfactina

No trabalho, foram utilizadas a surfactina em solução e a surfactina em pó. A surfactina em solução é a surfactina excretada no meio de crescimento durante o cultivo de *B. subtilis* LBBMA RI4914. A produção foi obtida em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio MM (modificado por Fernandes, 2011), os quais foram inoculados com a cepa selecionada e incubados a 30 °C por 48 h a 200 rpm. Para a obtenção da surfactina em pó, dois volumes de 500 mL da cultura de *B. subtilis* foram submetidos à autoclavagem para garantir a esterilização da solução. Em seguida, foi adicionada maltodextrina 10 DE (dextrose equivalente) (250 g L⁻¹) às soluções, a qual serviu como adjuvante de secagem (Barcelos e Dias, 2011). As soluções foram submetidas ao processo de secagem em um mini-*spray dryer* modelo LM MSD 1.0 (Labmaq do Brasil LTDA[®]), sob as seguintes condições operacionais: temperatura de entrada do ar de secagem de 170 °C; temperatura de saída do ar de secagem de ± 60 °C; aspiração da amostra de 2,86 % e fluxo de alimentação de 810 mL h⁻¹.

2.2.4. Estimativa da concentração de surfactina

As concentrações de surfactina nas formulações em pó e líquida foram estimadas pela medição da tensão superficial de diluições do biosurfactante feitas em água Milli-Q[®], pelo método do anel de Du Noüy (Cooper *et al.*, 1979), de acordo com Fernandes (2011).

3. Preparação dos microcosmos

Com o intuito de se investigar o efeito da formulação da surfactina (em pó, obtida pela técnica de *spray drying*, ou líquida) sobre a biorremediação de solos tropicais contaminados com petróleo, foram montados seis microcosmos em triplicata, para os dois diferentes tipos de solo (Tabela 4). Para a montagem dos microcosmos, porções de 70 cm³ de solo contidas nos frascos respirométricos receberam, após a adição de nutrientes e a correção do pH para 7,0, a adição de petróleo, surfactina em pó ou líquida, inoculante microbiano e maltodextrina 10 DE (Tabela 3). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), totalizando 36 parcelas experimentais para cada tipo de solo.

O processo de biorremediação foi monitorado continuamente por um período de 60 dias de incubação a 30 °C. Nos tempos 0, 30, 45 e 60 dias, foram feitas amostragens dos solos para a quantificação de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTPs) e para a análise do perfil populacional da comunidade microbiana pela técnica de T-RFLP.

Tabela 3 – Microcosmos preparados a partir de porções de 70 cm³ de cada tipo de solo contidos nos frascos respirométricos.

Microcosmos

I - Controle (somente o solo)

II - Inoculante + Surfactina líquida

III - Petróleo + Inoculante

IV - Petróleo + Inoculante + Surfactina líquida

V - Petróleo + Inoculante + Surfactina em pó

VI - Petróleo + Inoculante + Maltodextrina

Adição de petróleo: o petróleo utilizado para contaminar os solos foi previamente aquecido gradativamente até 210 °C, para a perda dos compostos mais voláteis. Dissolveu-se o petróleo em hexano, e a solução obtida foi submetida à filtragem em papel de filtro qualitativo Whatman®. A solução foi aplicada nos frascos respirométricos em um volume suficiente para cobrir a massa de solo presente no recipiente. A concentração dos hidrocarbonetos de petróleo adicionados aos solos foi de 13.800 mg Kg⁻¹ para o solo FAA e 12.300 mg Kg⁻¹ para o solo ARG, em relação à massa seca dos solos. Os microcosmos que não receberam petróleo receberam o mesmo volume de hexano aplicado aos microcosmos que receberam o contaminante. Os frascos respirométricos contendo os solos contaminados e não contaminados permaneceram destampados em capela de exaustão por cerca de 24 horas, para permitir a evaporação do solvente. Posteriormente, adicionaram-se 2 cm³ de solo original a cada frasco respirométrico, com o intuito de se reporem as populações microbianas. Os demais aditivos foram aplicados posteriormente a essa etapa.

Adição do inoculante microbiano: o inoculante microbiano foi produzido a partir de um composto maturado de resíduos sólidos urbanos, o qual foi contaminado com petróleo na concentração de 50 mL Kg⁻¹, de acordo com Leal (2009). O composto foi adicionado aos solos a uma concentração de 30 g Kg⁻¹ de massa seca.

Adição da surfactina em pó: a massa (g) de surfactina em pó adicionada aos solos foi a necessária para que a concentração do biossurfactante atingisse, na solução

do solo, concentração equivalente a 20 mg L^{-1} (Cubitto *et al.*, 2004; Jayashree *et al.*, 2006), valor correspondente a cerca de duas vezes a concentração micelar crítica (CMC) da surfactina

Adição da surfactina líquida: a surfactina líquida foi aplicada por meio da adição da cultura de *B. subtilis*, juntamente com a água a ser acrescentada para a correção da CRA dos solos, para se obter uma concentração equivalente à do microcosmo com a surfactina em pó.

Adição da maltodextrina: maltodextrina foi adicionada para se obter a mesma concentração do microcosmo que recebeu surfactina em pó, a qual continha maltodextrina como coadjuvante de secagem. Esse microcosmo foi considerado como o controle do microcosmo com surfactina em pó.

Após as adições dos compostos, os solos contidos nos frascos respirométricos tiveram a umidade corrigida para 60% da capacidade máxima de retenção de água (CRA).

4. Análise Respirométrica

A degradação dos contaminantes foi acompanhada pela avaliação da emissão de CO_2 , uma vez que a produção de CO_2 indica, de forma indireta, a capacidade da comunidade microbiana em utilizar o petróleo como fonte de carbono (Alisi *et al.*, 2009). Para isso, após a montagem dos microcosmos, os frascos respirométricos foram acoplados a um respirômetro dotado de um analisador de gás por infravermelho, com fluxo intermitente de ar (*Sable System*, NE, USA). Os frascos ficaram imersos em banho-maria a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e o CO_2 emitido foi quantificado por um período de 60 dias, com intervalos de leituras de 6 horas. O valor do CO_2 emitido pelo solo que recebeu somente a adição de nutrientes minerais e os corretivos de pH foi descontado do valor de CO_2 emitido nos demais microcosmos.

5. Extração e quantificação dos Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTPs)

As amostras foram coletadas nos tempos 0, 30, 45 e 60 dias durante o processo de biorremediação. Para a extração, 8 g de solo (massa seca) foram sonicados por 10 minutos utilizando-se 4 mL da mistura de solventes hexano:acetona (1:1). As amostras permaneceram em repouso por 30 minutos, seguindo-se centrifugação por 15 min a

10.000 g e coleta da fase orgânica (Schwab *et al.*, 1999; Shin e Kwon, 2000). O procedimento de extração foi repetido por mais duas vezes. Todo o volume coletado a partir da fase orgânica foi acondicionado em um recipiente, o qual ficou em repouso em temperatura ambiente para a completa evaporação do solvente. A quantificação dos HTPs extraídos foi realizada pelo método gravimétrico (Adeyemo, 2013). A massa de HTPs residual foi expressa em mg Kg^{-1} , após subtrair-se a massa extraída dos controles e levando-se em consideração a eficiência de extração dos HTPs em cada tipo de solo, a qual foi baseada em curvas de regressão construídas a partir das massas de HTPs residuais obtidas em resposta às massas de HTPs adicionadas aos solos.

6. Extração do DNA, PCR e análise das comunidades microbianas por meio de T-RFLP multiplex

Para se estudarem as mudanças ocorridas no perfil genético da comunidade microbiana durante o processo de biorremediação dos solos, foi realizada a análise de T-RFLP *multiplex* para bactérias, arqueias e fungos de acordo com Singh *et al.* (2006), com modificações. Amostras de 5 g de solo coletadas a partir dos frascos respirométricos nos tempos 0, 30, 45 e 60 dias de incubação foram submetidas à extração do DNA total utilizando-se o Kit *Power SoilTM DNA* (Mo-Bio Laboratories, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação do gene rRNA 16S de *Archaea* foi obtida utilizando-se os *primers* Ar3f (5'-TTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3') e Ar927r (5'-CCCGCCAATTCCTTTAAGTTTC-3'). A amplificação do gene rRNA 16 S de *Bacteria* foi obtida utilizando-se os *primers* 63f (5'-AGGCCTAACACATGCAAGTC-3') e 1087r (5'-CTCGTTGCGGGACTTACCCC-3'). A região ITS de *Fungi* foi obtida com os *primers* ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4r (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). As extremidades 5' dos *primers* Ar92r, 1087r e ITS1f estavam marcadas com os fluorocromos REX (verde), NED (amarelo) e FAM (azul), respectivamente.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um volume total de 50 μL , que consistiu de: 1,0 μL dos *primers* (cada) 63f e 1087r a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 2,0 μL dos *primers* (cada) Ar3f, Ar927r, ITS1f e ITS4r a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 μL de tampão de PCR (1x) (Promega), 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), MgCl_2 a 2 mmol L^{-1} , , 20 μg de BSA, 2 μL de amostra de DNA (1ng μL^{-1}), 2,5 U de Taq DNA

polimerase (Promega, USA) e água Milli-Q® estéril em volume suficiente para se completar o volume final da reação. A PCR foi realizada em termociclador MasterCycler (Eppendorf AG 22331, Hamburg, Alemanha) com etapa inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 55 °C, 1 min a 72 °C, finalizando-se com a extensão a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram corados com *GelRed*TM e analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % na presença de marcador molecular de tamanho de 1.000 pb. Os produtos amplificados foram purificados utilizando-se o kit *Illustra*TM *GFX*TM PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e o DNA foi eluído em um volume final de 50 µL de tampão de eluição. Em seguida, os produtos de PCR purificados foram submetidos à digestão enzimática com 20 U de *MspI* em um volume total de 30 µL a 37 °C por 3 h e 95 °C por 15 min. Os produtos digeridos foram purificados por precipitação e ressuspensos com 7,75 µL de tampão de corrida *MegaBACE loading solution* (GE Healthcare), acrescido de 0,25 µL do marcador de tamanho *GeneTab 500* (GeneID). Os fragmentos de restrição terminais (T-RF) foram separados por meio de eletroforese capilar em um sequenciador automático *MegaBACE 1000 DNA Analysis System* (Molecular Dynamics/GE Healthcare).

A análise dos dados brutos foi realizada utilizando-se o programa *Gene Marker 2.4.1 Trial Version* (SoftGenetics, State College), considerando-se apenas os picos de tamanho entre 50 e 505 bp, com limite inferior de detecção de 40 unidades de fluorescência.

A diversidade da comunidade microbiana foi avaliada por meio do cálculo do índice de Shannon Weaver (H') e da Riqueza (S) (Atlas e Bartha, 1997), e do índice de Simpson (Dunbar, Ticknor e Kuske, 2000).

7. Análises estatísticas

Os dados obtidos de CO₂ acumulado e de HTPs residuais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), pelo teste F, a 5 % de probabilidade. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1. Evolução do CO₂ e biodegradação de HTPs

As curvas das taxas respiratórias (Figuras 1 e 2) apresentaram um comportamento similar para todos os microcosmos, em ambos os solos (franco-argilo-arenoso e argiloso): uma rápida fase de elevação da taxa respiratória, seguida de decréscimo e estabilização. Na fase de declínio, todos os microcosmos que receberam petróleo (microcosmos 3 a 6) mostraram taxas respiratórias mais elevadas do que os com inoculante + surfactina líquida (microcosmo 2), onde não houve contaminação. O comportamento entre os microcosmos nos dois tipos de solos foi similar, porém os valores de suas taxas respiratórias foram distintos. Para ambos os tipos de solos, os microcosmos 5 e 6, os quais continham maltodextrina, mas que diferiam quanto à presença da surfactina, apresentaram taxas respiratórias similares e mais elevadas do que os demais, indicando a utilização da maltodextrina como fonte de carbono e energia. Os microcosmos 3 (petróleo + inoculante) e 4 (petróleo + inoculante + surfactina líquida) apresentaram taxas respiratórias intermediárias.

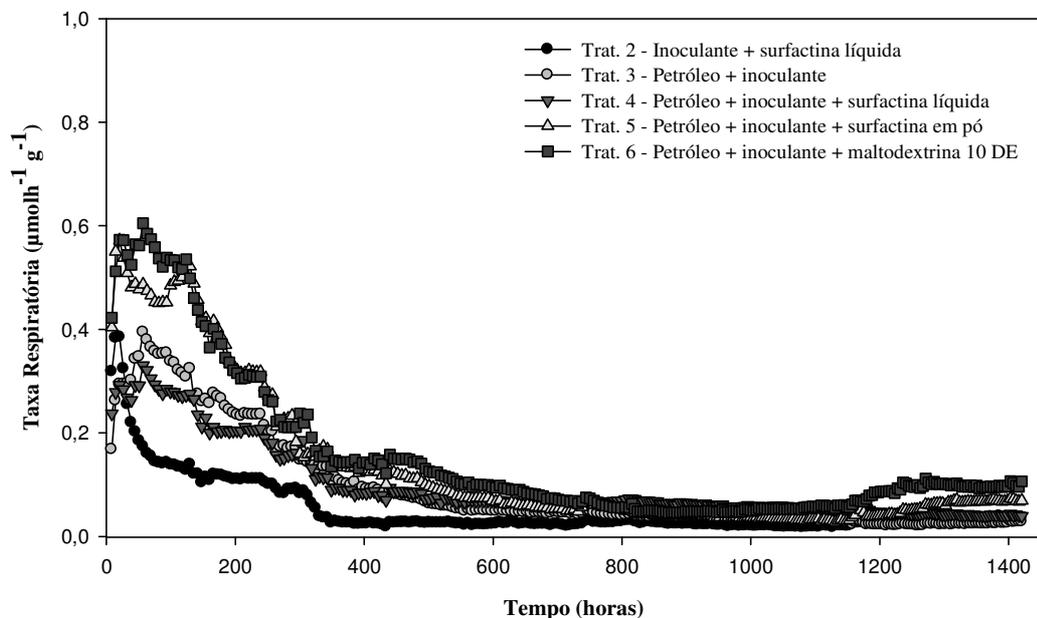


Figura 1. Taxas respiratórias em microcosmos com solo franco-argilo-arenoso, durante 60 dias de incubação.

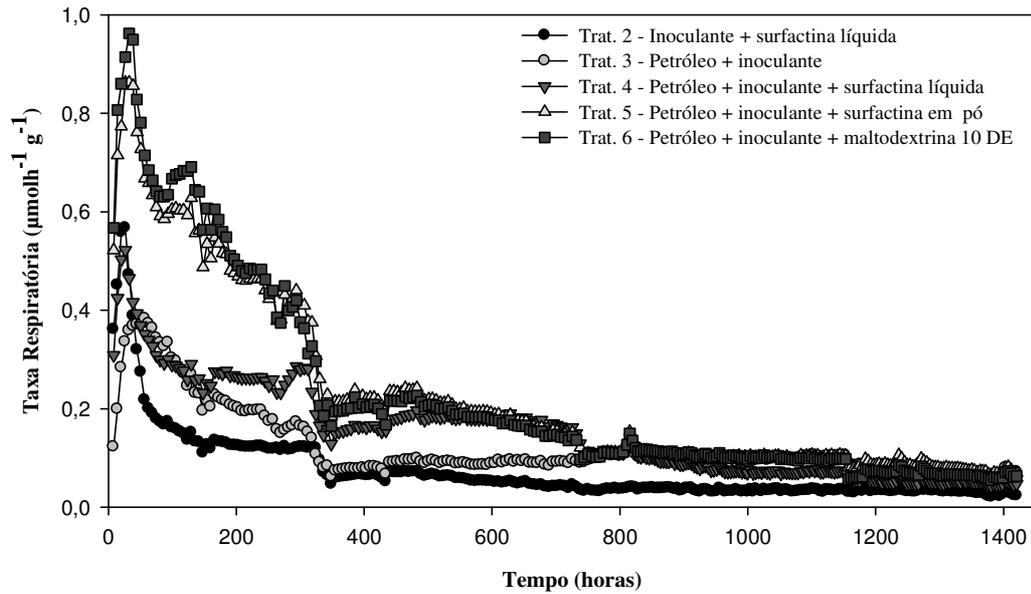


Figura 2. Taxas respiratórias em microcosmos com solo argiloso, durante 60 dias de incubação.

Os microcosmos 5 e 6 apresentaram os maiores tempos para se atingir a estabilização das taxas respiratórias (800 horas para os microcosmos com solo franco-argilo-arenoso e 780 horas para os com solo argiloso). No solo franco-argilo-arenoso, os microcosmos 3 e 4 tiveram as taxas respiratórias estabilizadas em torno de 600 horas, enquanto que o microcosmo 2 atingiu a estabilização após 350 horas. Já os microcosmos 2 e 3 do solo argiloso apresentaram estabilização de suas taxas respiratórias em torno de 350 horas, enquanto que a estabilização da taxa respiratória no microcosmo 4 ocorreu por volta de 780, similar ao observado com os microcosmos 5 e 6.

A fim de se compararem estatisticamente os microcosmos dentro de um mesmo tipo de solo, foram utilizados os valores de CO_2 acumulado, derivados dos valores das taxas respiratórias. Para a análise, foi escolhida uma faixa de tempo, para cada solo, em que todos os microcosmos compartilharam um aumento do CO_2 acumulado, antes de se atingir a estabilização das taxas respiratórias. Esse tempo correspondeu a 391 e 135 horas para os solos franco-argilo-arenoso e argiloso, respectivamente, conforme as regressões lineares de dois segmentos (não mostradas) construídas (software SAEG, Universidade Federal de Viçosa). De acordo com as análises estatísticas (Tabela 4), houve efeito significativo dos microcosmos a 5 % de significância e para a interação microcosmo x tempo de incubação. A Tabela 5 apresenta os resultados para o teste de

Tukey das médias dos valores de CO₂ acumulado. As médias de CO₂ acumulado variaram entre os microcosmos: 47,6 a 137,7 μmol g⁻¹ para o solo franco argilo arenoso e 35,7 a 98,5 μmol g⁻¹ para o solo argiloso. Em ambos os solos, as médias dos microcosmos 5 e 6 foram significativamente maiores do que as dos demais (p < 0,05), mas não variaram entre si. No solo franco-argilo-arenoso, as médias dos valores de CO₂ acumulado nos microcosmos 3 e 4 não diferiram entre si (p ≥ 0,05). O microcosmo 2 (não-contaminado) apresentou média de CO₂ acumulado significativamente menor do que os demais microcosmos. No solo argiloso, os microcosmos 2, 3 e 4 não apresentaram entre si diferenças significativas de CO₂ acumulado (p ≥ 0,05) (Tabela 4), ainda que os microcosmos 3 e 4, os quais receberam petróleo, tenham mantido taxas respiratórias mais elevadas do que o microcosmo 2 durante todo o período de incubação (Figura 2). O microcosmo 4, o qual continha surfactina líquida, em particular, apresentou taxas respiratórias sempre mais elevadas, inclusive na fase de estabilização.

Tabela 4. Médias dos valores de CO₂ acumulado (μmol g⁻¹) obtidos em cada microcosmo, após 391 e 135 horas, emitido pelos solos franco-argilo-arenoso (FAA) e argiloso (ARG), respectivamente.

Microcosmos (Solo FAA) ^a	Médias do CO ₂ acumulado (μmol g ⁻¹) ^b	Microcosmos (Solo ARG) ^a	Médias do CO ₂ acumulado (μmol g ⁻¹) ^b
6	137,7a	6	98,5a
5	131,0a	5	90,0a
3	90,9b	4	46,7b
4	79,9b	3	41,4b
2	47,6c	2	35,7b

^a 2 (inoculante + surfactina líquida); 3 (petróleo + inoculante); 4 (petróleo + inoculante + surfactina líquida); 5 (petróleo + inoculante + surfactina em pó); 6 (petróleo + inoculante + maltodextrina).

^b Valores seguidos de diferentes letras na mesma coluna de médias indicam diferenças significativas, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Para a análise, foi escolhida uma faixa de tempo, para cada solo, anterior à estabilização da taxa de emissão de CO₂. Para a definição desse tempo, foi tomado o microcosmo em que a estabilização foi alcançada no menor tempo, a saber: solo FAA, 391 horas; solo ARG, 135 horas.

Houve remoção parcial dos HTPs em todos os microcosmos que receberam petróleo, ao longo do processo de biorremediação (Figuras 3 e 4). Após os 60 dias de análise, as porcentagens de remoção variaram entre 19,6 a 38,4 % e 62,6 a 73,2 % para os solos franco-argilo-arenoso e argiloso, respectivamente. Em geral, o microcosmo 4 (petróleo + inoculante + surfactina líquida) apresentou as maiores porcentagens de remoção de HTPs durante os 60 dias de incubação (38 e 73 % para os solos franco-argilo-arenoso e argiloso, respectivamente), enquanto que o microcosmo 6 (petróleo + inoculante + maltodextrina) apresentou as menores porcentagens de remoção (19,6 e 62,6 % nos solos franco-argilo-arenoso e argiloso, respectivamente).

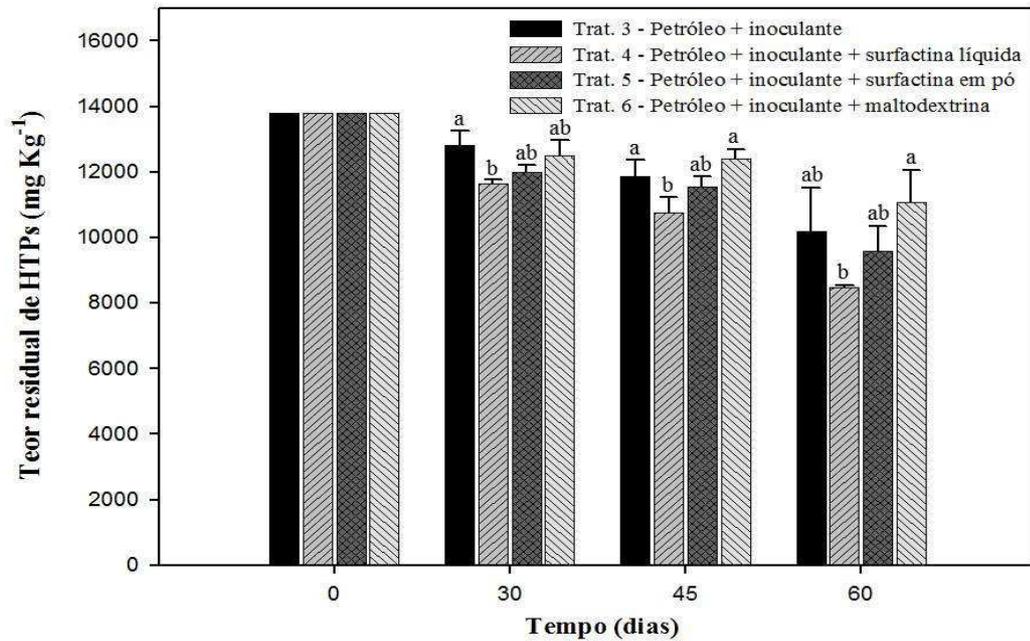


Figura 3. HTP residual nos microcosmos com solo franco-argilo-arenoso nos tempos 0, 30, 45 e 60 dias. Barras contendo diferentes letras para um mesmo tempo indicam diferenças significativas, ao n6vel de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

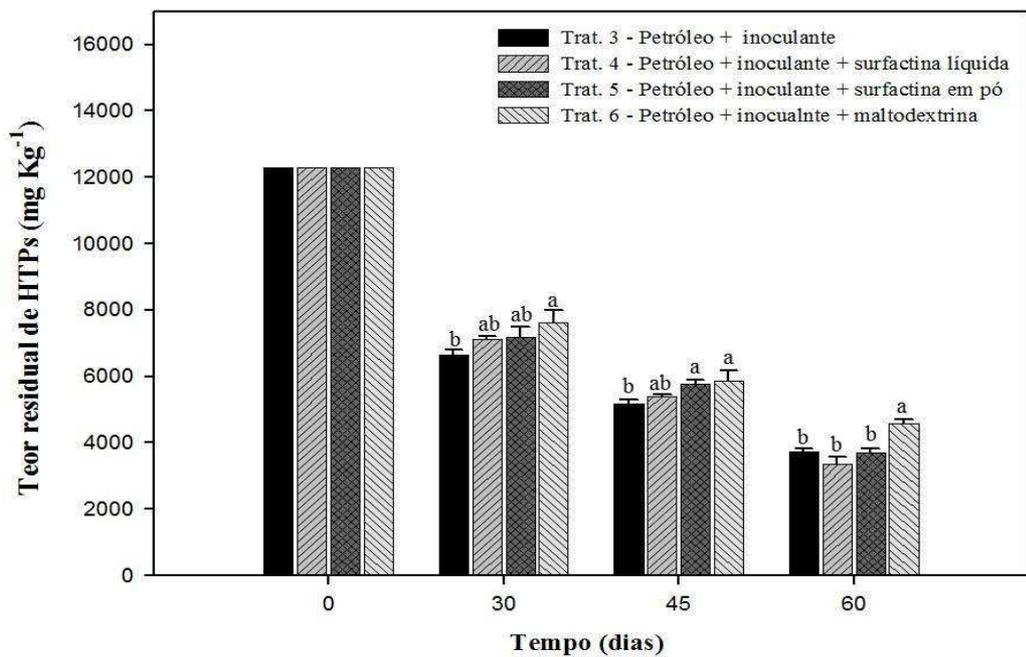


Figura 4. HTP residual nos microcosmos com solo argiloso nos tempos 0, 30, 45 e 60 dias. Barras contendo diferentes letras para um mesmo tempo indicam diferenças significativas, ao n6vel de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

No solo franco-argilo-arenoso (Figura 3), as concentrações residuais de HTPs nos microcosmos 3 e 4 foram diferentes ($p < 0,05$) nos tempos 30 e 45 dias. O menor teor residual de HTPs do microcosmo 4 indica que a surfactina, aplicada na forma de solução, favoreceu a degradação dos HTPs nesse tipo de solo. Os microcosmos 5 e 6 apresentaram teores residuais de HTPs que não diferiram ($p \geq 0,05$) durante todo o período do experimento, mostrando taxas de degradação similares na presença de maltodextrina, independentemente da presença da surfactina. Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre os teores residuais de HTPs dos dois microcosmos que receberam a aplicação de biossurfactante (microcosmos 4 e 5). O microcosmo 4, que continha surfactina aplicada na forma de solução, apresentou teor residual de HTPs menor do que o microcosmo (6) que continha apenas o açúcar ($p < 0,05$) nos dois últimos tempos analisados (45 e 60 dias).

No solo argiloso, os microcosmos 3 e 4 apresentaram teores residuais de HTPs iguais ($p \geq 0,05$) nos três tempos analisados. Os microcosmos 5 e 6, os quais continham maltodextrina, também apresentaram teores residuais de HTPs similares ($p \geq 0,05$) nos tempos 30 e 45 dias. Contudo, ao final do período de incubação (60 dias), o microcosmo 5 apresentou teor residual de HTPs similares ($p < 0,05$) do que o microcosmo 6, indicando efeito positivo do biossurfactante aplicado na formulação em pó em uma fase tardia do processo de biorremediação. Nessa fase, o teor residual de HTPs do microcosmo 6 foi significativamente maior do que o de todos os outros microcosmos ($p < 0,05$). Os microcosmos que continham biossurfactante (microcosmos 4 e 5) não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos teores residuais de HTPs durante todo o período do experimento no solo argiloso.

3.2. Dinâmica das comunidades microbianas

A comunidade de fungos apresentou maiores valores de índice de diversidade (Shannon Weaver – H') do que a de bactérias e de arqueias, nos dois tipos de solos (Figuras 5-9 H'). A menor diversidade dentre os três grupos foi observada para a comunidade de arqueias do solo franco-argilo-arenoso. Os valores de riqueza (S) das comunidades de fungos também foram mais elevados do que os de bactérias nos dois tipos de solo (Figuras 5-9S). No solo argiloso, o número de picos obtidos nos eletroferogramas para arqueias foi muito baixo, optando-se, por isso, por não se calcular os índices de diversidade e de riqueza para esse grupo.

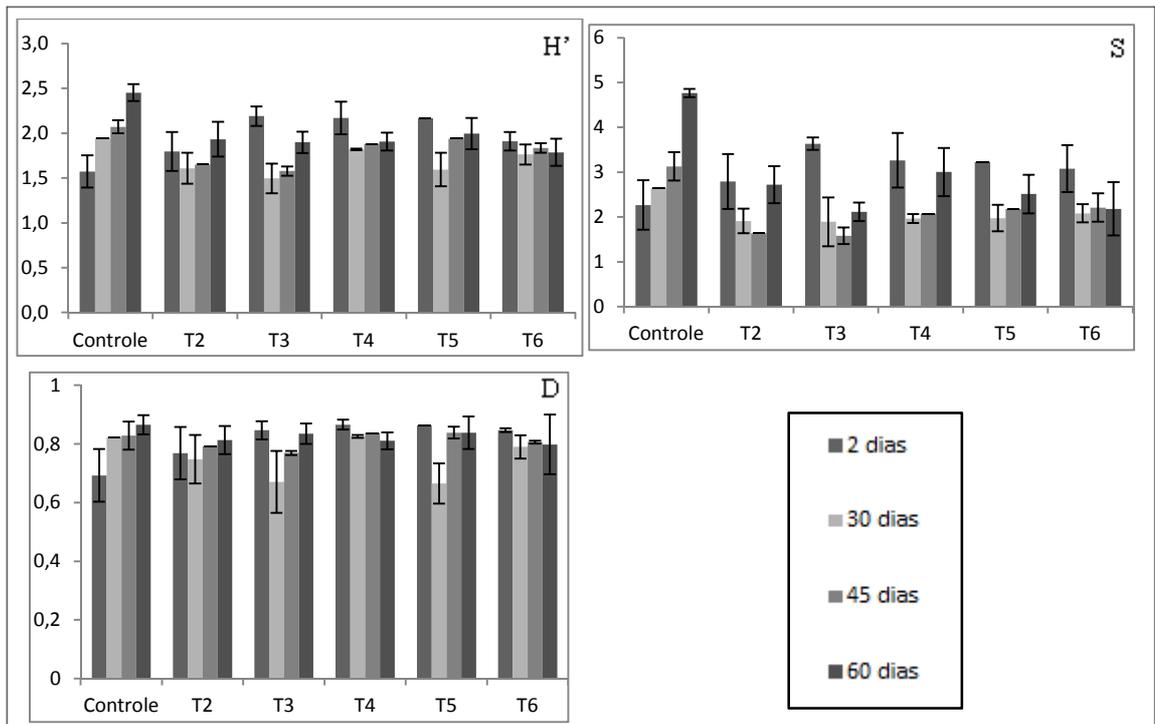


Figura 5. Índice de Shannon-Weaver (H'), Riqueza (S) e índice de Simpson (D) de *Bacteria* em solo franco-argilo-arenoso, calculados com base nos eletroferogramas de T-RFLP nos tempos 2, 30, 45 e 60 dias. T2: inoculante (IN) + surfactina líquida (SL); T3: Petróleo (PT) + IN; T4: PT + IN + SL; T5: PT + IN + surfactina em pó; T6: PT + IN + maltodextrina.

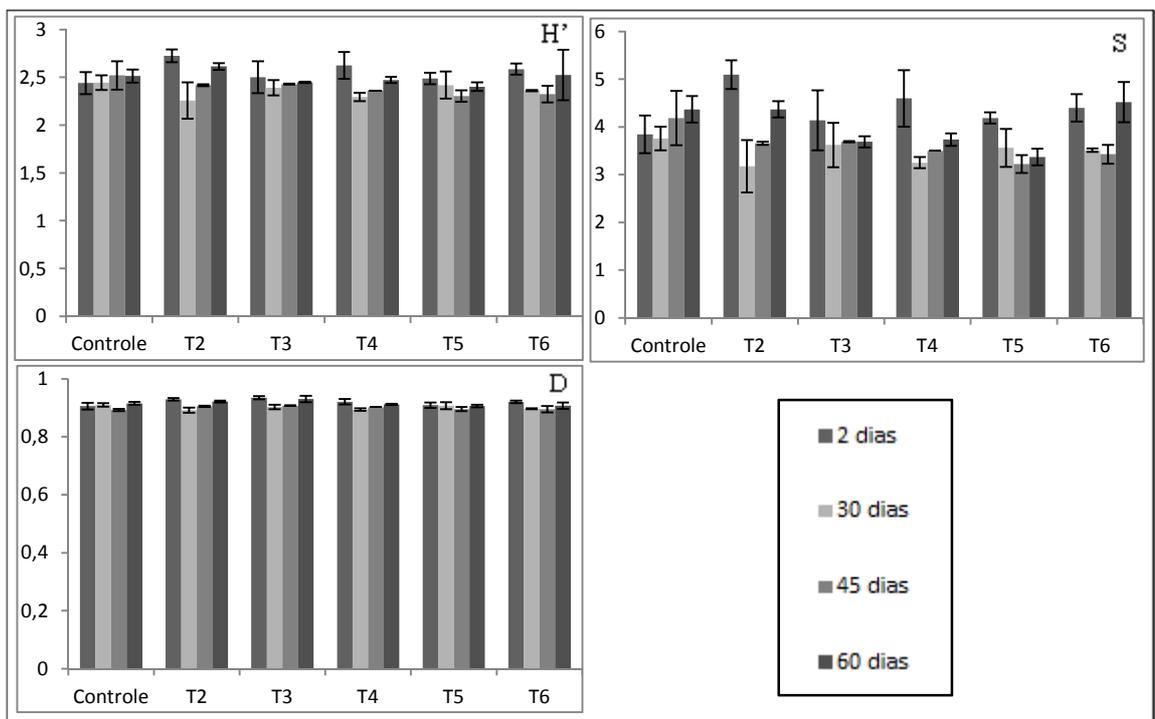


Figura 6. Índice de Shannon-Weaver (H'), Riqueza (S) e índice de Simpson (D) de *Fungi* em solo franco-argilo-arenoso, calculados com base nos eletroferogramas de T-RFLP nos tempos 2, 30, 45 e 60 dias. T2: inoculante (IN) + surfactina líquida (SL); T3: Petróleo (PT) + IN; T4: PT + IN + SL; T5: PT + IN + surfactina em pó; T6: PT + IN + maltodextrina.

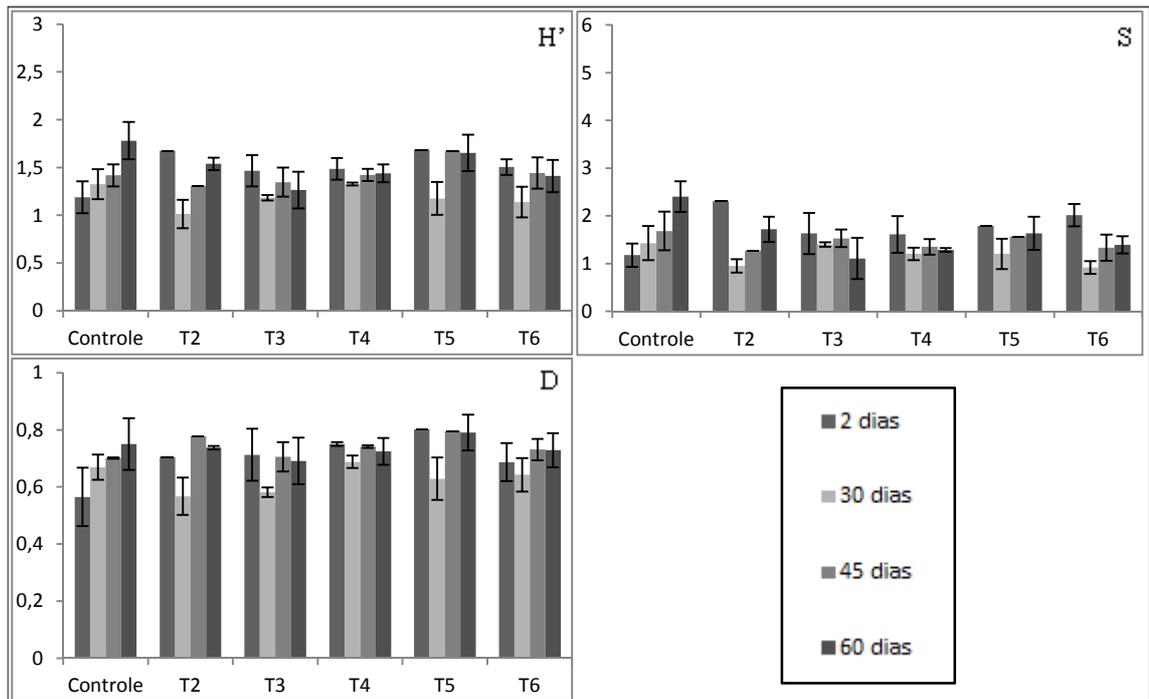


Figura 7. Índice de Shannon-Weaver (H'), Riqueza (S) e índice de Simpson (D) de *Archaea* em solo franco-argilo-arenoso, calculados com base nos eletroferogramas de T-RFLP nos tempos 2, 30, 45 e 60 dias. T2: inoculante (IN) + surfactina líquida (SL); T3: Petróleo (PT) + IN; T4: PT + IN + SL; T5: PT + IN + surfactina em pó; T6: PT + IN + maltodextrina.

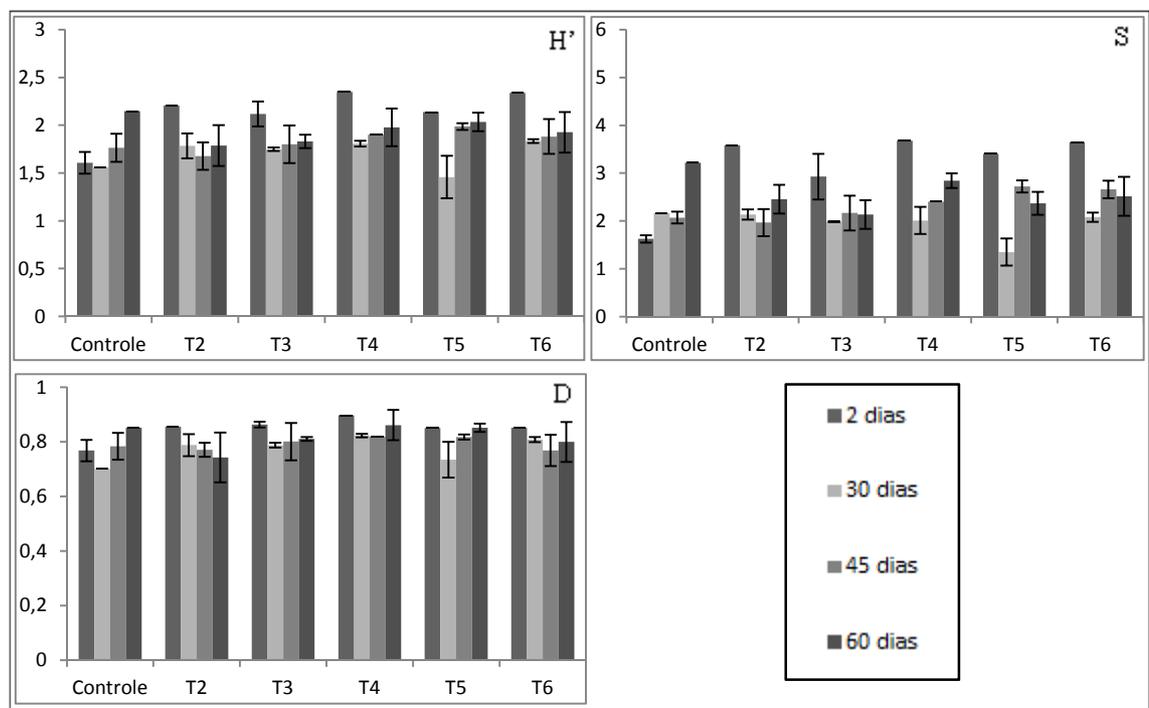


Figura 8. Índice de Shannon-Weaver (H'), Riqueza (S) e índice de Simpson (D) de *Bacteria* em solo argiloso, calculados com base nos eletroferogramas de T-RFLP nos tempos 2, 30, 45 e 60 dias. T2: inoculante (IN) + surfactina líquida (SL); T3: Petróleo (PT) + IN; T4: PT + IN + SL; T5: PT + IN + surfactina em pó; T6: PT + IN + maltodextrina.

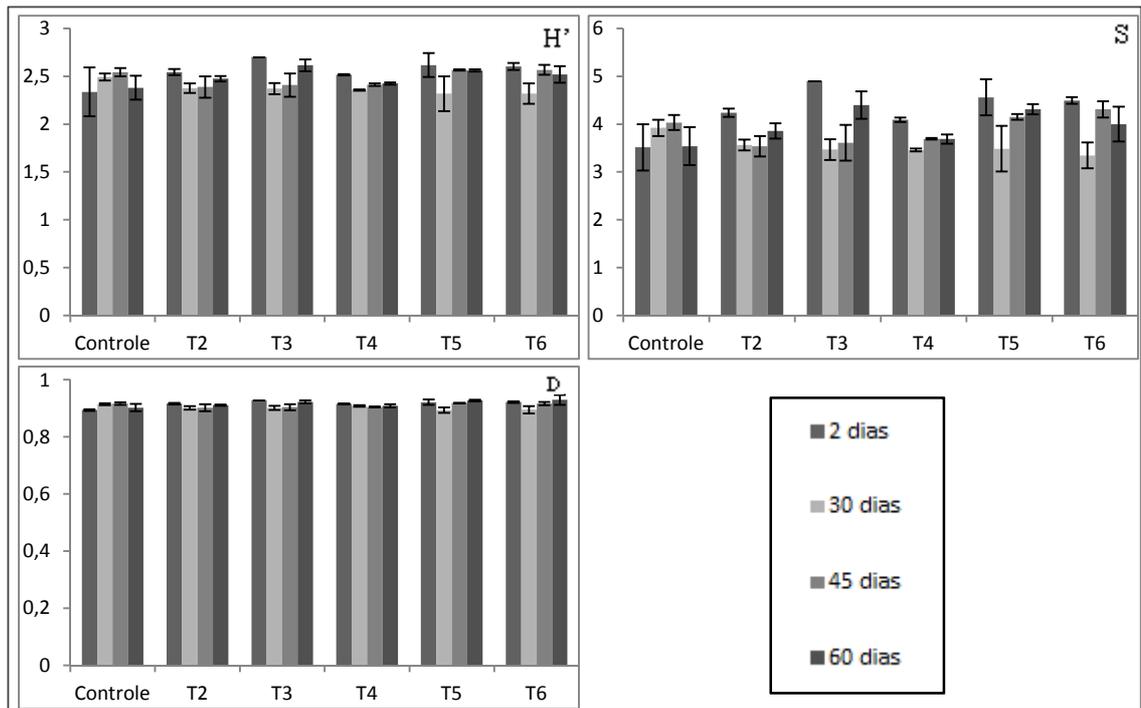


Figura 9. Índice de Shannon-Weaver (H'), Riqueza (S) e índice de Simpson (D) de *Fungi* em solo argiloso, calculados com base nos eletroferogramas de T-RFLP nos tempos 2, 30, 45 e 60 dias. T2: inoculante (IN) + surfactina líquida (SL); T3: Petróleo (PT) + IN; T4: PT + IN + SL; T5: PT + IN + surfactina em pó; T6: PT + IN + maltodextrina.

De modo geral, as comunidades microbianas dos microcosmos que receberam petróleo, assim como as do microcosmo 2, o qual continha inoculante e surfactina líquida, em ambos os tipos de solo, apresentaram dinâmicas temporais semelhantes ao longo do processo de biorremediação: redução da diversidade (H') e da riqueza na primeira fase do experimento (2 a 30 e alguns 45 dias) (Figuras 5-9H'S), e aumento desses dois índices nos tempos 45 e 60 dias. Em alguns microcosmos, foi observada a redução dos índices com 30 dias, aumento com 45 dias e nova redução ao final do experimento (*Bacteria* no microcosmo 6, *Fungi* no microcosmo 3 e *Archaea* nos microcosmos 3, 4, 5 e 6 do solo FAA; *Bacteria* nos microcosmos 3, 5 e 6 e *Fungi* nos microcosmos 4 e 6 do solo ARG). Exceção é feita para a comunidade de fungos no microcosmo 3 do solo franco argilo-arenoso, cujos índices H' e S permaneceram praticamente inalterados após 30 dias de incubação, e para as comunidades de bactérias e arqueias no solo franco-argilo-arenoso no microcosmo-controle (microcosmo 1), as quais apresentaram aumento progressivo nos valores do índice H' e de S durante todo o período do experimento. Os maiores valores do índice H' e de S foram observados no início do período de incubação (2 dias) para quase todos os microcosmos, nos dois tipos de solos.

O índice de Simpson (D) fornece a distribuição de abundância das espécies e confere maior peso às espécies dominantes do que o de Shannon-Weaver (H') (Hill *et al.*, 2003). Apesar de os hidrocarbonetos de petróleo atuarem como agentes seletivos em ambientes contaminados com petróleo ou derivados, de acordo com o índice D no presente trabalho não foi observada dominância nos tempos analisados subsequentes ao início do processo de biorremediação, em quase todos os microcosmos que receberam petróleo e para os três grupos de micro-organismos (Figuras 5-8D). As comunidades bacterianas na maioria dos microcosmos de ambos os solos apresentaram redução nos valores do índice de diversidade de Simpson com 30 dias de incubação, seguida de aumento após esse tempo (Figuras 5 e 8D). Dinâmicas semelhantes foram observadas para as comunidades de arqueias do solo franco-argilo-arenoso (Figura 5D), com exceção do controle e do microcosmo 6, os quais apresentaram crescimento progressivo nos valores do índice D durante todo o experimento. As comunidades de fungos mostraram-se ser mais estáveis do que as dos outros grupos de micro-organismos, em resposta às mudanças ocorridas no solo ao longo do experimento, apresentando pouca variação nos valores do índice D em todos os microcosmos, nos dois tipos de solos (Figuras 6 e 9D).

4. DISCUSSÃO

A avaliação da atividade respiratória dos organismos do solo é uma técnica consagrada para o monitoramento de alterações ambientais nesse ecossistema microbiano, fornecendo informação sobre a presença de micro-organismos viáveis e a extensão do impacto de contaminantes sobre a atividade metabólica do solo (Huang *et al.*, 2006, Labud, *et al.*, 2007). A ausência de uma fase lag e a rápida elevação da taxa respiratória em um curto espaço de tempo (20 a 50 horas), observada em todos os microcosmos e em ambos os solos (Figuras 1 e 2), refletem condições experimentais adequadas de pH, umidade e teor de nutrientes, além da aplicação de um inoculante, sobretudo nos microcosmos que receberam petróleo (3-6), o qual possibilitou uma resposta adaptativa rápida ao poluente aplicado aos solos. Numa fase posterior, o declínio, seguido de estabilização da atividade respiratória, em todos os microcosmos de ambos os solos, é uma resposta similar à reportada por Mortazavi *et al.* (2013), exceto pela fase de elevação inicial.

As maiores taxas respiratórias (Figuras 1 e 2) e CO₂ acumulado até a estabilização das taxas respiratórias (Tabela 4), nos dois tipos de solo, foram obtidas nos microcosmos que receberam a aplicação de maltodextrina (microcosmos 5 e 6). Esse polissacarídeo de baixo peso molecular é facilmente assimilável e utilizado para a produção de energia e biomassa por micro-organismos organotróficos, o que justifica as elevadas taxas respiratórias e as maiores médias de CO₂ acumulado apresentadas por aqueles microcosmos. Esses dois microcosmos também apresentaram os maiores intervalos de tempo para se atingir a estabilização da taxa de emissão de CO₂, sugerindo que a maltodextrina pode ter sido utilizada como substrato preferencial no início do processo de biorremediação. A fase de estabilização da taxa respiratória pode estar relacionada à depleção da maltodextrina, concomitantemente a uma fase de adaptação da microbiota do solo aos hidrocarbonetos remanescentes e mais recalcitrantes, como os HAPs de alto peso molecular, por exemplo. Isso é evidenciado quando se observa branda elevação da taxa respiratória em torno de 1.100 horas (Figura 1), após a fase de estabilização, para os microcosmos 5 e 6, indicando uma nova fase de adaptação metabólica e de degradação dos hidrocarbonetos remanescentes no solo.

As taxas respiratórias intermediárias apresentadas pelos microcosmos 3 e 4, para os dois tipos de solos, indicaram existência de biodegradação dos HTPs, já que a taxa respiratória basal relacionada à degradação da matéria orgânica nativa dos solos

(microcosmo 1) foi subtraída de todos os microcosmos com petróleo (microcosmos 3 a 6). Intervalos de tempo menores gastos para se atingir a estabilização apresentados por esses microcosmos, nos dois tipos de solos, são atribuídos à degradação acelerada dos hidrocarbonetos. A maior atividade respiratória no microcosmo 4, que recebeu aplicação de surfactina em solução, comparativamente ao microcosmo 3, é evidência da ação da surfactina sobre os HTPs adsorvidos ao solo. Isso é especialmente detectável no solo argiloso (Figura 2), em que se observa que as diferenças nas taxas respiratórias entre esses dois microcosmos são mais pronunciadas após cerca de 150 horas de incubação, fase em que, possivelmente, os hidrocarbonetos mais biodisponíveis já teriam sido degradados. Nesse caso, sugere-se que a surfactina tenha auxiliado na dessorção das frações mais hidrofóbicas e mais fortemente aderidas às partículas do solo argiloso, resultando na manutenção de maiores taxas respiratórias. O microcosmo 2, que representa os solos que receberam inoculante e surfactina líquida, mas não o petróleo, apresentou taxa respiratória relativamente elevada, em ambos os tipos de solos. Nos microcosmos com surfactina, foi estimada uma concentração suficiente para se atingir duas vezes a concentração micelar crítica na solução do solo, valor correspondente a 20 mg L^{-1} . Levando-se em consideração os volumes de água adicionados a cada solo para a correção da umidade para 60 % da capacidade máxima de retenção de água (CRA), tem-se que as quantidades de surfactina aplicadas foram de 0,42 e 0,506 mg por unidade experimental, o que corresponde a 0,405 e 0,488 μmol de surfactina para os solos franco-argilo-arenoso e argiloso, respectivamente. O carbono presente nessas quantidades de surfactina adicionadas corresponde a cerca de 22 e 26 μmol por unidade experimental para os solos franco-argilo-arenoso e argiloso, respectivamente. Uma das características desse biossurfactante é sua elevada biodegradabilidade (Lima, 2008). Considerando que a surfactina tenha sido consumida pela microbiota do solo, e estimando-se que aproximadamente 50 % das moléculas tenham sido incorporados à biomassa, tem-se que cerca de 11 μmol e 13 μmol para os solos franco-argilo-arenoso e argiloso, respectivamente, teriam sido emitidos na forma de CO_2 , o que teria contribuído com parte do CO_2 emitido pelo microcosmo 2 observado na Tabela 5. O restante foi atribuído à utilização de compostos orgânicos aplicados aos solos juntamente com o inoculante e de compostos da matéria orgânica dos solos.

No solo franco-argilo-arenoso, a maior remoção dos HTPs no microcosmo 4, comparativamente ao seu controle (microcosmo 3), nos tempos 30 e 45 dias (Figura 3), foi atribuída à dessorção dos hidrocarbonetos promovida pelo biossurfactante, aplicado

na forma de solução, aumentando a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos. Resultado semelhante foi obtido em um solo arenoso (84 % de areia), tendo sido alcançada uma remoção de 94 % dos contaminantes, na presença de surfactina a uma concentração também acima da CMC (Whang *et al.*, 2008). No presente trabalho, a eficiência de remoção dos HTPs no solo FAA (68 % de areia) foi menor, correspondendo a 38 % e 30 % nos microcosmos que receberam a aplicação de surfactina na forma líquida e em pó, respectivamente. Porém, esse resultado pode ser explicado por algumas diferenças experimentais entre os trabalhos, assim como ao alto conteúdo de matéria orgânica (MO) presente no solo utilizado neste estudo, uma vez que o aumento da sorção de contaminantes é diretamente proporcional ao aumento do percentual de MO (Providenti *et al.*, 1993). Portanto, o alto teor de MO presente no solo FAA pode ter interferido negativamente na desorção dos hidrocarbonetos (HCs) pela surfactina, resultando em uma menor taxa de degradação do contaminante. Neste tipo de solo, assim como no solo ARG, a maltodextrina não interferiu na degradação dos contaminantes na presença da surfactina desidratada (microcosmo 5). Portanto, esse açúcar poderia ser usado junto ao biosurfactante (como adjuvante no processo de *spray drying*) na biorremediação de ambientes contaminados com petróleo, sem reduzir a eficiência do mesmo em estimular a biodegradação.

Ainda que os microcosmos 5 e 6 (solo FAA) tenham sido significativamente iguais ao longo do período de incubação, pressupõe-se que a surfactina em pó presente no microcosmo 5 tenha tido efeito positivo sobre a desorção dos HTPs. As diferenças entre os valores absolutos nos teores residuais de HTPs entre esses dois microcosmos aumentaram ao longo do período de incubação (Figura 3), com o microcosmo 5 mostrando sempre os menores valores absolutos. Isso indica que a surfactina possa ter tido efeito significativamente mais forte em fases tardias do processo de biorremediação (60 dias). Nessa fase, os hidrocarbonetos ainda presentes no solo são, possivelmente, os mais hidrofóbicos e, portanto mais adsorvidos. Nessa fase, a surfactina teria agido na desorção e solubilização desses compostos, aumentando a sua biodisponibilidade, acelerando a biodegradação. Assim, se o período de incubação tivesse sido mantido após 60 horas, as diferenças nos valores absolutos nos teores residuais de HTPs poderiam ter sido maiores e, portanto, diferenças estatísticas entre tais valores dos microcosmos 5 e 6 poderiam vir a ser observadas. Isso é comprovado ao se observar os mesmos microcosmos do solo ARG (Figura 4), onde o efeito da desorção é mais intenso devido à presença da argila e então a surfactina apresenta um papel mais importante ao

final do período do experimento. Nesse solo, o teor residual de HTPs no microcosmo com surfactina em pó (microcosmo 5) foi significativamente menor do que o de seu controle (microcosmo 6) aos 60 dias de incubação.

O efeito da surfactina sobre a degradação dos HTPs em fase tardia também pôde ser observado nos microcosmos 3 e 4 do solo ARG (Figura 4), onde o valor absoluto do teor de HTPs residuais do microcosmo 4, contendo surfactina em solução, decresceu em relação à média do seu controle (microcosmo 3). A igualdade estatística entre os valores dos teores de HTPs residuais desses dois microcosmos, durante todo o período de incubação, não reflete os resultados da taxa respiratória (Figura 2), os quais demonstram que o microcosmo 4 apresentou maior atividade respiratória após 150 horas. Essa aparente discrepância pode estar relacionada com problemas na extração dos HTPs do solo. A extração e a quantificação precisa de HTPs em solos são bastante complexas, dadas as limitações dos métodos de extração e, principalmente, ao processo denominado *aging* ou *weathering*. Nesse processo, há efeito do tempo sobre a sorção dos HCs do petróleo à matéria orgânica e às frações minerais dos solos, sendo essa sorção tanto maior quanto mais prolongado é o tempo de contato dos compostos com a matriz do solo (Chikere *et al.*, 2011, Riding *et al.*, 2013). Nos solos argilosos, a dificuldade pode ser ainda maior, em razão da maior capacidade de sorção de compostos orgânicos (Labud *et al.*, 2007). Uma vez que as análises de HTPs foram realizadas nos tempos 30, 45 e 60 dias, o processo de *aging* pode ter atuado sobre esses compostos, especialmente no solo argiloso e, assim, influenciado nas etapas de extração/quantificação, resultando em teores residuais de HTPs similares para os microcosmos 3 e 4.

A microestrutura e o tipo de solo influenciam de modo significativo a biodisponibilidade de contaminantes orgânicos, como também podem definir a resposta de micro-organismos específicos à contaminação. A elevada capacidade de adsorção de compostos orgânicos por argila foi observado por Abdel-Moghny e colaboradores (2012), os quais compararam a eficiência de remoção de óleo diesel residual utilizando solução de surfactante de solos com diferentes texturas e obtiveram a menor eficiência de remoção dos compostos presentes em solo argiloso. Em contraste, alguns autores obtiveram bons resultados em estudos de biorremediação de solos argilosos contaminados com compostos do petróleo. A remoção de cerca de 96 % de HTPs foi conseguida em 60 dias através de bioestimulação (Sarkar *et al.*, 2005); Em outro trabalho, foi obtida remoção de 45 % de HTPs também com bioestimulação utilizando nutrientes com 45 dias de incubação (Baptista *et al.*, 2005). No presente trabalho, as

maiores taxas de remoção de HTPs foram obtidas no solo argiloso (Figura 4), o que pode estar relacionado com as maiores atividade e biomassa microbiana nesse tipo de solo. De fato, por conter partículas mais finas e, portanto, maior área superficial, a argila fornece maior superfície para a adesão microbiana, contendo uma superfície rica em nutrientes disponíveis para os micro-organismos, e a maior parte dos micro-organismos no solo estaria associada às suas frações (Calvo e Jimenez, 1998; Warr, 2012).

A diversidade microbiana é considerada como um bom indicador da qualidade do solo, uma vez que os micro-organismos são bastante sensíveis às mudanças no ambiente, alterando rapidamente a estrutura e atividade da comunidade. Os valores gerais do índice H' obtidos nesse estudo foram similares ou maiores do que os índices encontrados por Denaro *et al.* (2005) e Baek *et al.* (2007). O índice H' é sensível tanto à riqueza como à abundância relativa das espécies (Atlas e Bartha, 1997). Portanto, quanto maiores a equitabilidade e a riqueza, maior é o seu valor. Analisando-se a dinâmica das populações de bactérias, fungos e arqueias ao longo do processo de biorremediação (Figuras 5-9 H'), constatou-se que os menores valores do índice H' com 30 dias de experimento, observados para a maioria dos microcosmos que receberam petróleo em ambos os tipos de solos, indicam que houve um impacto negativo do contaminante sobre a microbiota, como consequência do efeito tóxico dos HCs ou do estímulo de algumas populações capazes de utilizar os hidrocarbonetos como fontes de carbono e energia. Apesar de o microcosmo 2 não ter recebido petróleo, a redução dos seus valores do índice H' e da riqueza (Figuras 5-9 $H'S$) nos três grupos de micro-organismos, com 30 dias de experimento, podem indicar uma possível competição por nutrientes entre a microbiota indígena e a do inoculante, episódios de predação e parasitismo (Dua *et al.*, 2002; Baek *et al.*, 2007), ou até um possível efeito antimicrobiano da surfactina. Dessa forma, pode-se inferir que a redução destes dois índices ao longo do estudo, nos microcosmos contendo solo contaminado, ocorreu não só pelo estresse causado pelo contaminante sobre a microbiota, mas também pelas razões citadas anteriormente. Contudo, também foi observada uma resiliência da comunidade microbiana, evidenciada pelo aumento dos valores do índice H' e de S em quase todos os microcosmos nos dois tipos de solo, nos tempos 45 e 60 dias. À medida que houve a degradação do petróleo pelos micro-organismos do inoculante e da microbiota indígena, houve redução da concentração de HTPs no solo (Figuras 3 e 4), convertendo os compostos em formas mais simples e menos tóxicas (Wang *et al.*, 2011). Como resultado, ocorreu uma redução da toxicidade do contaminante sobre toda

a microbiota do solo, o que possibilitou o ressurgimento daquelas espécies cujas populações foram reduzidas no início do experimento.

A resiliência de comunidades microbianas em estudos de biorremediação de HCs de petróleo tem sido reportada na literatura (Franco *et al.*, 2004; Bordenave *et al.*, 2007). Dentre os microcosmos que receberam petróleo, a resiliência ao longo do experimento não apresentou um padrão exatamente igual entre os três grupos de micro-organismos para um mesmo microcosmo. Por isso, não se pôde tirar claras conclusões que correlacionassem o padrão de resiliência de cada microcosmo específico com os resultados da análise de HTPs. Esses resultados indicam que a microbiota foi fracamente influenciada pela concentração específica do contaminante nos solos e que o tempo do experimento, assim como a presença de alguns aditivos, tiveram um impacto maior nas mudanças da estrutura das comunidades dos micro-organismos.

O solo argiloso apresentou maior atividade microbiana durante o estudo, mas seus valores do índice H' e de S foram semelhantes aos valores do solo franco-argilo-arenoso ao longo do experimento. Os micro-organismos degradadores ajustam-se às mudanças nas condições do substrato, aumentando sua atividade metabólica em compensação à perturbação no ambiente, o que limita o aumento do número de populações microbianas (Bento *et al.*, 2005). Dessa forma, uma atividade microbiana mais elevada não implica necessariamente em um aumento da diversidade e de riqueza, justificando assim as semelhanças dos índices H' e de S nos dois tipos de solo.

A comunidade de fungos mostrou maiores valores do índice de Shannon-Weaver (H'), do índice de Simpson (D) e da Riqueza (S) do que a comunidade de bactérias ao longo do estudo, independentemente do tipo de solo e microcosmo. A maioria dos trabalhos da literatura tem relatado encontrar maior diversidade e dominância de bactérias do que de fungos em experimentos de biorremediação de compostos do petróleo (Boopathy, 2000, Zou *et al.*, 2013). Contudo, alguns autores observaram a dominância de fungos em determinadas fases da biorremediação de compostos do petróleo, sobretudo em estágios onde havia maiores proporções de HCs recalcitrantes no solo. Chagas-Spinelli e colaboradores (2012) observaram um declínio na população de bactérias, concomitantemente com um aumento da população de fungos, em tratamentos onde houve bioestimulação, nos primeiros 17 dias de biorremediação. Em outro trabalho (Liu *et al.*, 2011), foi observada uma maior dominância de bactérias nos primeiros 70 dias de biorremediação de HCs de petróleo, seguida da dominância pela comunidade de fungos, a qual foi responsável pela degradação das frações mais

recalcitrantes de HCs. Desse modo, as maiores diversidade e riqueza de fungos observadas para os dois tipos de solos nesse trabalho, durante todo o tempo de experimento, foi atribuída à constituição do petróleo utilizado para a contaminação dos solos. Esse continha frações mais pesadas e recalcitrantes, como resultado da eliminação das frações mais leves durante o processo de preparação desse contaminante (ver Material e Métodos), o que teria favorecido a comunidade de fungos. Com relação à comunidade de arqueia no FAA, houve uma ampla oscilação dos índices H', S e D ao longo do período de incubação. Considerando a existência de trabalhos que demonstram a capacidade de micro-organismos desse grupo de degradar hidrocarbonetos (Anderson e Lovley, 2000; Bonfá *et al.*, 2011; Erdogmus *et al.*, 2013), essas oscilações no perfil genético da comunidade de arqueias indicam que esse grupo, no solo franco-argilo-arenoso, participou da biodegradação dos contaminantes. Ao contrário, no solo argiloso, a baixa riqueza, refletida pelo baixo número de picos obtidos, em todo o período de incubação, não teve papel significativo.

Dada a pressão seletiva exercida pelo petróleo sobre a comunidade microbiana de um ambiente contaminado, algumas espécies de micro-organismos tornam-se dominantes (Margesin *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2011). Entretanto, no presente trabalho, foi observada uma falta de dominância nos tempos subsequentes ao início do estudo, para os microcosmos que receberam petróleo (3-6), nos três grupos de micro-organismos e nos dois tipos de solo (Figuras 5-9D). Resultado semelhante foi obtido no trabalho de Baek *et al.* (2007). No presente trabalho, a falta de dominância no decorrer do estudo pode ser atribuída à presença do inoculante, o qual teria fornecido populações que já seriam adaptadas à utilização dos hidrocarbonetos de petróleo, preenchendo o lugar das populações microbianas indígenas que desapareceram em resposta ao efeito tóxico do contaminante ou à baixa capacidade de competição pelas fontes de carbono oriundas do petróleo, o que teria resultado em uma distribuição mais homogênea das populações já adaptadas a essas fontes introduzidas como inoculante.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a efetividade da surfactina em pó acrescida de maltodextrina em acelerar a biorremediação de solos tropicais contaminados com petróleo. Ambas as formas de surfactina (líquida e desidratada) tiveram efeito sobre a degradação dos HTPs, auxiliando na redução dos teores desses compostos nos solos. O solo argiloso apresentou as maiores porcentagens de remoção de HTPs, indicando que a degradação de HTPs parece estar relacionada não só ao efeito dos tratamentos, mas também à textura dos solos. Isso demonstra que se deve levar em consideração a textura do solo ao se aplicar o processo de biorremediação. A presença da maltodextrina, juntamente com a surfactina desidratada, não promoveu maior remoção de HTPs, mas também não interferiu negativamente na biodegradação dos compostos. Portanto, esse açúcar pode ser usado como adjuvante de secagem para a desidratação de biossurfactante a ser utilizado em processo de biorremediação. Quanto à dinâmica das comunidades microbianas observada em resposta ao estresse causado pelo contaminante, assim como aos tipos de solo e de tratamentos, foi observada a resiliência das comunidades microbianas ao longo do processo de biorremediação, sendo essas afetadas principalmente pelo tempo de experimento. Novos estudos devem ser conduzidos com o propósito de se avaliar a ação da surfactina associada a outros adjuvantes de secagem, a fim de se reduzir o custo de produção de biossurfactantes e assim viabilizar o seu emprego, incluindo a biorremediação de áreas contaminadas com petróleo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 150, n. 3, p. 289-303, 2008.

ABDEL-MOGHNY, T.; MOHAMED, R. S. S.; EL-SAYED, E.; ALY, S. M.; SNOUSY, M. G. Effect of soil texture on remediation of hydrocarbons-contaminated soil at El-Minia District, Upper Egypt. *ISRN Chemical Engineering*, v. 2012, 2012.

ADEYEMO, A. J. Bioremediation of brazilian soils contaminated with used lubricating oil. 108 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

ALISI, C.; MUSELLA, R.; TASSO, F.; UBALDI, C.; MANZO, S.; CREMISINI, C.; SPROCATI, A. R. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment*, v. 407, n. 8, p. 3024-3032, 2009.

ANDERSON, R. T.; LOVLEY, D. R. Hexadecane decay by methanogenesis, *Nature*, v. 404, p. 722-723, 2000.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 31, n. 3, p. 488-494, 1968.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. 4th ed. Benjamin Cummings Publishers, 1997.

BAEK, K. H.; YOON, B. D.; KIM, B. H.; CHO, D. H.; LEE, I. S.; OH, H. M.; KIM, H. S. Monitoring of microbial diversity and activity during bioremediation of crude oil-contaminated soil with different treatments. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 17, n.1, p. 67-73, 2007.

BAPTISTA, S. J.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. D. C. Production of CO₂ in crude oil bioremediation in clay soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 249-255, 2005.

BARCELOS, G. C.; DIAS, L. C.; FERNANDES, P. L.; FERNANDES, R. C. R.; BORGES, A. C.; KARLOS HM KALKS, K. H. M.; TÓTOLA, M. R. Spray drying as a strategy for biosurfactant recovery, concentration and storage. *SpringerPlus*, v. 3, n. 49, 2014.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 9, p. 1049-1055, 2005.

BONFÁ, M. R. L.; GROSSMAN, M. J.; MELLADO, E.; DURRANT, L. R. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by *Haloarchaea* and their use for the reduction of the chemical oxygen demand of hypersaline petroleum produced water. *Chemosphere*, v. 84, p. 1671-1676, 2011.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 63-67, 2000.

BORDENAVE, S.; GOÑI-URRIZA, M. S.; CAUMETTE, P.; DURAN, R. Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 19, p. 6089-6097, 2007.

CALVO, J. J. O.; JIMENEZ, C. S. Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 8, p.3123-3126, 1998.

CARNEIRO, H. C. F.; TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F.; HUBINGER, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, v. 115, n. 4, p. 443-451, 2013.

CAUWENBERGHE, L. V., ROOTE, D. S. In Situ Bioremediation. Technology Overview Report, TO-98-01, Groundwater Remediation Technologies Analysis Center, Pittsburgh, PA, 1998.

CHAGAS-SPINELLI, A. C.; KATO, M. T.; DE LIMA, E. S.; GAVAZZA, S. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *Journal of Environmental Management*, v. 113, n. 30, p. 510-516, 2012.

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

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, D. F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, n. 1, p. 4-10, 1979.

CUBITTO, M. A.; MORÁN, A. C.; COMMENDATORE, M.; CHIARELLO, M. N.; BALDINI, M. D.; SIÑERIZ, F. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation*, v. 15, n. 5, p. 281-287, 2004.

DENARO, R.; D'AURIA, G.; DI MARCO, G.; GENOVESE, M.; TROUSSELLIER, M.; YAKIMOV, M. M.; GIULIANO, L. Assessing terminal restriction fragment length polymorphism suitability for the description of bacterial community structure and dynamics in hydro-carbon marine environments. *Environmental Microbiology*, v. 7, p. 78-87, 2005.

DUA, M., SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A. K. Biotechnology and bioremediation: Succession and limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 143-152, 2002.

DUNBAR, J.; TICKNOR, L. O.; KUSKE, C. R. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 2943-2950, 2000.

ERDOGMUS, S. F.; MUTLU, B.; KORCAN, S. E.; GÜVEN, K.; KONUK, M. Aromatic hydrocarbon degradation by halophilic *Archaea* isolated from Camalti Saltern, Turkey. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 224, n. 3, 2013.

FERNANDES, P. L. Biossurfactantes e polímeros de *Bacillus subtilis* RI4914 e sua aplicação em recuperação avançada de petróleo. 93 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

FRANCO, I.; CONTIN, M.; BRAGATO, G.; NOBILI, M. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. *Geoderma*, v. 121, p. 17-30, 2004.

HILL, T. C. J.; WALSH, K. A.; HARRIS, J. A.; MOFFETT, B. F. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 43, n. 1, p. 1-11, 2003.

HUANG, Y. F.; HUANG, G. H.; WANG, G. Q.; LIN, Q. G.; Chakma, A. An integrated numerical and physical modeling system for an enhanced in situ bioremediation process. *Environmental Pollution*, v. 144, n. 3, p. 872-885, 2006.

JAYASHREE, R.; VASUDEVAN, N.; CHANDRASEKARAN, S. Surfactants enhanced recovery of endosulfan from contaminated soils. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 3, n. 3, p. 251-259, 2006.

JÚLIO, A. D. L. Otimização da adição de fósforo para a biorremediação de solos tropicais contaminados com óleo diesel, em função do fósforo remanescente. 51p. (Monografia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

LABUD, V.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, v. 66, p. 1863-1871, 2007.

LEAL, A. J. Desenvolvimento de inoculantes microbianos para biorremediação de solos contaminados com óleo diesel ou gasolina. 120 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

LIANG, Y.; NOSTRAND, J. D. V.; DENG, Y.; HE, Z.; WU, L.; ZHANG, X.; LI, G.; ZHOU, J. Functional gene diversity of soil microbial communities from five oil-contaminated fields in China. *ISME Journal*, v. 5, p. 403-413, 2011.

LIMA, T. M. S. Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficiência de biossurfactantes na remoção de cádmio e fenantreno de solo. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

LIN, S. C. Biosurfactants: recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 66, p. 109-120, 1996.

LIU, P. W. G.; CHANG, T. C.; WHANG, L.-M.; KAO, C.-H.; PAN, P.-T.; CHENG, S.-S. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, p. 1119-1127, 2011.

MARGESIN, R.; LABBE, D.; SCHINNER, F.; GREER, C. W.; WHYTE, L. G. Characterization of hydrocarbon degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 3085-3092, 2003.

MORTAZAVI, B.; HOREL, A.; BEAZLEY, M. J.; SOBECKY, P. A. Intrinsic rates of petroleum hydrocarbon biodegradation in Gulf of Mexico intertidal sandy sediments and its enhancement by organic substrates. *Journal of Hazardous Materials*, v. 244-245, p. 537-544, 2013.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v. 6, n. 6, p. 975-1006, 2012.

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

RIDING, M. J.; DOICK, K. J.; MARTIN, F. L.; JONES, K. C.; SEMPLE, K. T. Chemical measures of bioavailability/bioaccessibility of PAHs in soil: Fundamentals to application. *Journal of Hazardous Materials*, v. 15, n. 261, p. 687-700, 2013.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*, v. 136, n. 1, p. 187-95, 2005.

SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M.; CHOPADE, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 30, n. 2, p. 127-44, 2010.

SHIN, HO-S.; KWON, OH-S. The simultaneous analysis of benzene, toluene, ethylbenzene, o,m,p-xylenes and total petroleum hydrocarbons in soil by GC-FID after ultra-sonication. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2000, v. 21, n. 11, p. 1101-1105, 2000.

SHUKLA, K. P.; SINGH, N. K.; SHARMA, S. Bioremediation: Developments, Current Practices and Perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, v. 2010, 2010.

SINGH, B. K.; NAZARIES, L.; MUNRO, S.; ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D. Use of multiplex-terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil

microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 7278-7285, 2006.

SCHWAB, A. P.; SU, J.; WETZEL, S.; PEKAREK, S.; BANKS, M. K. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environmental Science & Technology*, v. 33, p. 1940-1945, 1999.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

WANG, Z.; XU, Y.; ZHAO, J.; LI, F.; GAO, D.; XING, B. Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation. *Journal of Hazardous Materials*, v. 190, p. 677-685, 2011.

WARR, L. N. Using clay to bioremediate oil spills. *Revista de la Sociedad Española de Mineralogía*, n. 16, 2012.

WHANG, L. M.; LIU, P. W.; MA, C. C.; CHENG, S. S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 151, n. 1, p. 155-63, 2008.

ZOU, J.; LIU, X.; HE, C.; ZHANG, X.; ZHONG, C.; WANG, C.; WEI, J. Effect of *Scripus triqueter* of its rhizosphere and root exudates on microbial community structure of simulated diesel-spiked wetland. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 82, p. 110-116, 2013.