

ALINE JAIME LEAL

**DESENVOLVIMENTO DE INOCULANTES MICROBIANOS PARA  
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM ÓLEO  
DIESEL OU GASOLINA**

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  
2009

ALINE JAIME LEAL

**DESENVOLVIMENTO DE INOCULANTES MICROBIANOS PARA  
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM ÓLEO  
DIESEL OU GASOLINA**

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: 02 de junho de 2009

---

**Prof. Arnaldo Chaer Borges**  
(Coorientador)

---

**Prof. Maurício Dutra Costa**  
(Coorientador)

---

**Prof<sup>a</sup> Maria Catarina Megumi Kasuya**

---

**Prof<sup>a</sup> Ann Honor Munteer**

---

**Prof. Marcos Rogério Tótola**  
(Orientador)

“Devo ter serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar,  
coragem para mudar as que posso e sabedoria para distinguir entre  
elas”.

Reinold Nieblur

Aos meus pais, Júlio Silvio e Lidia.  
Ao meu grande amor, Anderson.  
Aos meus irmãos, Juliano e César.  
Aos demais familiares e amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo.

À Universidade Federal de Viçosa, pela acolhida e suporte para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao prof. Marcos Rogério Tótola, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela confiança depositada em mim.

Aos meus conselheiros, professores Arnaldo, Galvão e Maurício, pelos aconselhamentos e contribuições.

Às professoras Catarina e Ann, pelas contribuições e sugestões na revisão deste trabalho.

Aos professores Sérgio e Rafael, por terem cedido seus laboratórios para a realização das análises cromatográficas e análise física do composto de resíduos sólidos urbanos, respectivamente.

Ao técnico Eduardo, pelo auxílio nas análises cromatográficas.

À prof. Eliana, pelos aconselhamentos e disponibilidade.

À Usina de Reciclagem e Compostagem de Lixo do município de Coimbra - MG, pelo fornecimento do composto de resíduos sólidos urbanos.

Aos funcionários do BIOAGRO, pelo auxílio e amizade.

Aos meus colegas de laboratório, pela ajuda, incentivo e amizade.

Ao Adriano, pela ajuda na coleta do composto de resíduos sólidos urbanos.

À Patrícia Leal, pela ajuda nas análises cromatográficas, incentivo e amizade.

À Marcela, pela ajuda, boa vontade, apoio e amizade.

Aos meus estagiários, Florent e Marion, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, amizade e momentos de descontração.

À minha estagiária, Aline, que foi incansável mesmo nos momentos mais difíceis e se tornou uma grande amiga.

À Cássia, pelo auxílio, apoio e incentivo.

Ao José Maria e ao Cristian, pela ajuda nas análises estatísticas e pela amizade.

Aos meus pais, Júlio Silvio e Lidia, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todos os momentos.

À minha avó Cândida e tia Gasparina, pessoas que admiro e que foram muito importantes no caminho trilhado até chegar essa etapa da minha vida.

Aos demais familiares, pelo carinho, incentivo e apoio.

Ao meu grande amor, Anderson, pelo carinho, companheirismo, dedicação, paciência e apoio. Mesmo distante, sempre esteve presente.

Às minhas amigas de Caçapava, pelas conversas no msn que me ajudaram a superar os momentos difíceis e a saudade.

À amiga Isabella, por ter aberto as portas da sua casa para mim, pelo carinho, amizade, cuidado e convívio com sua família, que foram muito importantes para mim.

Ao amigo Yaro, pelas conversas, conselhos e amizade, que me ajudaram a superar as dificuldades dessa etapa da minha vida.

À Juline, minha companheira nessa jornada, pela convivência e amizade.

À Bruna e à Cíntia, pela moradia no primeiro semestre de mestrado, apoio e amizade.

À Laélia, Mariana e Aureliana, por terem me acolhido nos últimos meses de mestrado e pela amizade.

A todas as pessoas, que contribuíram para que essa conquista fosse alcançada.

## **BIOGRAFIA**

Aline Jaime Leal, filha de Júlio Sílvio Corrêa Leal e Lidia Jaime Leal, nasceu em Caçapava do Sul - RS, no dia 15 de maio de 1984.

Em 2007, graduou-se em Ciências Biológicas - Licenciatura Plena pela Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. Em março de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa - UFV, submetendo-se à defesa de dissertação em 02 de junho de 2009.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPÍTULO I – DESENVOLVIMENTO DE INOCULANTES MICROBIANOS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM ÓLEO DIESEL OU GASOLINA.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1 Substrato para o desenvolvimento dos inoculantes.....	13
2.2 Determinação da concentração de óleo diesel ou gasolina a ser adicionada ao composto de resíduos sólidos urbanos.....	14
2.3 Desenvolvimento dos inoculantes.....	14
2.4 Análises dos inoculantes.....	16
2.4.1 Enumeração de populações bacterianas cultiváveis.....	16
2.4.2 Análise de ésteres metílicos de ácidos graxos ligados por ligação éster (EL-FAME).....	16
3. RESULTADOS.....	18
4. DISCUSSÃO.....	26

5. CONCLUSÕES.....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO II - EFICIÊNCIA DE INOCULANTES MICROBIANOS NA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL E GASOLINA.....	37
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	40
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1 Caracterização dos inoculantes microbianos.....	45
2.2 Caracterização do solo.....	45
2.3 Efeito da concentração dos inoculantes sobre a eficiência de mineralização de hidrocarbonetos em solo contaminado com óleo diesel ou gasolina.....	46
2.4 Efeito do armazenamento sobre a eficiência dos inoculantes microbianos na degradação de hidrocarbonetos do óleo diesel ou gasolina no solo.....	48
2.5 Análises dos inoculantes e do solo.....	49
2.5.1 Enumeração de populações bacterianas cultiváveis.....	49
2.5.2 Análise de ésteres metílicos de ácidos graxos.....	50
2.5.2.1 Identificação de bactérias dominantes pelo sistema de identificação microbiano (MIDI).....	50
2.5.2.2 Avaliação da diversidade microbiana pela análise de ésteres metílicos de ácidos ligados por ligação éster (EL-FAME)....	50
2.5.3 Análises cromatográficas.....	51
3. RESULTADOS.....	53
3.1 Determinação da concentração dos inoculantes a ser adicionada ao solo contaminado com óleo diesel ou gasolina.....	53
3.2 Efeito da temperatura de armazenamento sobre as populações bacterianas cultiváveis e sobre o perfil de ácidos graxos dos inoculantes.....	62
3.3 Efeito do armazenamento sobre a eficiência dos inoculantes na degradação dos hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel ou da gasolina.....	65
4. DISCUSSÃO.....	72
4.1 Efeito da concentração dos inoculantes na degradação de	

hidrocarbonetos de petróleo em solos contaminados com óleo diesel ou gasolina.....	72
4.2 Efeito da temperatura de armazenamento sobre as populações bacterianas cultiváveis e sobre o perfil de ácidos graxos dos inoculantes.....	74
4.3 Efeito da temperatura de armazenamento sobre a eficiência dos inoculantes na degradação dos hidrocarbonetos de petróleo do óleo diesel ou da gasolina no solo.....	75
5. CONCLUSÕES.....	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
CONCLUSÕES GERAIS.....	83
APÊNDICE.....	84

## RESUMO

LEAL, Aline Jaime, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2009. **Desenvolvimento de inoculantes microbianos para biorremediação de solos contaminados com óleo diesel ou gasolina.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges e Maurício Dutra Costa.

No Brasil, os derivados do petróleo, como óleo diesel e gasolina, possuem grande importância econômica, sendo produzidos e distribuídos em larga escala. Vazamentos acidentais desses combustíveis de tanques de armazenamento subterrâneos são causa comum de contaminação do solo e de águas subterrâneas no país. Nesse tipo de acidente, a remediação do solo é muito importante, uma vez que previne a contaminação do lençol freático. Neste trabalho, foram desenvolvidos inoculantes microbianos para a biorremediação de solo contaminado com óleo diesel ou gasolina comercial. Para isso, composto de resíduos sólidos urbanos foi enriquecido em populações microbianas com potencial de degradação de hidrocarbonetos, por meio de adições frequentes de óleo diesel ou gasolina. Durante esse processo, verificou-se que as populações de bactérias cultiváveis se adaptaram mais rapidamente ao óleo diesel, havendo inicialmente efeito tóxico da gasolina sobre as mesmas. A adição de gasolina ao composto promoveu alterações no perfil de ácidos graxos da comunidade microbiana, sendo observado aumento dos ácidos graxos marcadores de bactérias gram-positivas e diminuição dos marcadores de gram-negativas e de actinomicetos. A aplicação dos inoculantes

microbianos ao solo contaminado com gasolina aumentou a degradação desse contaminante, fato atribuído ao estabelecimento de populações microbianas mais resistentes aos efeitos tóxicos dos hidrocarbonetos leves contidos nesse combustível. No solo contaminado com óleo diesel, o efeito da aplicação dos inoculantes foi menos expressivo, em virtude da elevada eficiência de degradação dos microrganismos autóctones do solo. A temperatura de refrigeração foi a mais adequada para o armazenamento dos inoculantes. Nessa condição, houve maior viabilidade das populações bacterianas cultiváveis dos inoculantes e maior eficiência de degradação de hidrocarbonetos no solo. O método desenvolvido neste estudo mostrou-se simples e eficiente para a produção de inoculantes aplicáveis à biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos.

## ABSTRACT

LEAL, Aline Jaime, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2009. **Development microbial inoculant to bioremediation of soils contaminated with diesel or gasoline.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges and Maurício Dutra Costa.

In Brazil, the petroleum derivatives, such as diesel and gasoline, have great economic importance, being produced and distributed on a large scale. Accidental leakages of these fuels from underground storage tanks are a common cause of contamination of soil and groundwater. The prompt remediation of soils contaminated with diesel or gasoline is very important, in order to prevent the contamination of groundwater. In this work, microbial inoculants for bioremediation of soil contaminated with diesel or gasoline were developed. For this, compost of municipal solid waste was enriched in microbial populations with hydrocarbon-degrading potential, by frequent additions of diesel or gasoline. Populations of culturable bacteria adapted rapidly to the hydrocarbons present in diesel. On the other hand, hydrocarbons in gasoline caused a transient toxic effect on these populations. The addition of gasoline to the compost caused changes in the fatty acid profile of the microbial community; an increase of fatty acid markers of gram-positive bacteria and the reduction of gram-negative and actinomycetes fatty acids were observed. The application of microbial inoculants to soil contaminated with gasoline increased the degradation of this contaminant. This is due to the establishment of microbial populations more resistant to the toxic effects of soft hydrocarbons

which are into this fuel. In the soil contaminated with diesel, the effect of inoculants was less significant, due to the high efficiency of degradation of indigenous soil microorganisms. The temperature of refrigeration was the most suitable for the storage of inoculants. Under this condition, higher counts of cultivable bacterial populations and increased efficiency of degradation of hydrocarbons in soil were obtained. The method developed in this study proved to be simple and efficient for the production of microbial inoculants used for the bioremediation of hydrocarbons-contaminated soils.

## INTRODUÇÃO GERAL

O aumento da população humana e da atividade econômica mundial é invariavelmente acompanhado de uma crescente demanda por energia. De acordo com a Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEC, 2007), 90% do suprimento comercial de energia é proveniente de combustíveis fósseis. No Brasil, assim como em outros países, o óleo diesel e a gasolina possuem grande importância para o setor de transportes. Nos últimos anos, houve aumento no consumo e na produção desses combustíveis (ANP - Agência Nacional do Petróleo, 2008). O relatório da Petrobras de 2006 revelou crescimento de 7% na comercialização de gasolina e de 1% na de óleo diesel no mercado interno. Em 2008, o Brasil produziu 127 milhões de barris de gasolina e 255 milhões de barris de óleo diesel (ANP - Agência Nacional do Petróleo, 2008).

As formulações especificadas para óleo diesel e gasolina no país tentam minimizar a emissão de poluentes prejudiciais ao ambiente e à saúde humana. No caso do óleo diesel, desde 1994, a Petrobras produz dois tipos de óleo - o metropolitano e o interior. O metropolitano possui menor teor de enxofre, sendo consumido em regiões que necessitam de óleo com menor emissão de dióxido de enxofre. Já a gasolina é uma mistura com aproximadamente 23% de etanol, que é adicionado no momento em que a mesma é colocada no caminhão-tanque para ser levada aos postos revendedores (SILVA, 2002).

Vazamentos acidentais de gasolina e de outros derivados do petróleo de tanques de armazenamento subterrâneos são causa comum de contaminação do solo e de águas subterrâneas no país, pois a maioria desses tanques foi implantada há mais de 15 anos e sem nenhum tipo de fiscalização no momento de sua instalação (MELO JUNIOR e COSTI, 2004).

Os estudos realizados por CORSEUIL e FERNANDES (1999) indicam que contaminações do lençol freático causadas pela gasolina comercial brasileira podem ter maior magnitude do que as provocadas por gasolinas convencionais de outros países. Isso decorre da habilidade do etanol de aumentar a solubilidade dos hidrocarbonetos de petróleo em água. Os experimentos realizados por esses pesquisadores mostram que frações de etanol na fase aquosa na faixa de 10% aumentam em 30% a massa dos hidrocarbonetos benzeno, tolueno e xileno (BTX). Esse efeito de co-solvência, responsável pela maior concentração de compostos orgânicos hidrofóbicos na água, é maior para os xilenos, que são os compostos menos solúveis dentre os BTX. Assim, é provável também que altas concentrações de etanol na água de aquíferos facilitem a maior solubilização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), que são muito hidrofóbicos e altamente nocivos à saúde humana.

A biorremediação é um tratamento que tem sido utilizado na recuperação de ambientes contaminados com petróleo e seus derivados. Essa biotecnologia é promissora por possuir, em geral, melhor relação custo/benefício do que técnicas físico-químicas, que são mais caras, de difícil implementação e que necessitam de monitoramento contínuo para alcançarem resultados desejáveis (LI et al., 2000; BAPTISTA et al., 2005). Técnicas de biorremediação apresentam grandes possibilidades de desenvolvimento no Brasil, uma vez que o país apresenta condições climáticas favoráveis à biodegradação de contaminantes (JACQUES et al., 2007).

A biorremediação consiste na mineralização ou na transformação de contaminantes em formas menos tóxicas, efetuadas por diferentes grupos de microrganismos (VIDALI, 2001). Esse processo, que tende a ocorrer naturalmente, pode ser acelerado de duas maneiras: (i) pela bioestimulação, a incitação da atividade catabólica dos microrganismos autóctones, por meio da

adição de nutrientes minerais limitantes, do suprimento de oxigênio ou outros aceptores de elétrons e da adequação de fatores como temperatura, pH e umidade ou (ii) pela bioaugmentação, a inoculação de uma população ou de um consórcio de microrganismos eficientes na degradação dos contaminantes (GOGOI et al., 2003; BAPTISTA et al., 2005; MARIANO et al., 2007). A forma mais simples de biorremediação é a atenuação natural, na qual há somente o monitoramento da degradação natural do contaminante no ambiente contaminado, sem que haja intervenção de outra natureza.

A comparação entre as três estratégias de biorremediação em solos contaminados com óleo diesel - atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação - demonstrou que os resultados são sítio-específicos e que variam especialmente com o tipo de solo (BENTO et al., 2005). Como exemplo, solo proveniente de Long Beach, Califórnia, foi o que apresentou a maior taxa de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH), sendo a bioaugmentação com microrganismos pré-selecionados do próprio solo o tratamento mais eficiente. Já no solo coletado em Hong Kong, em que a degradação de TPH foi considerada como fraca, a atenuação natural resultou na maior atividade microbiana e, conseqüentemente, na maior taxa de degradação dos hidrocarbonetos.

Os tipos predominantes de hidrocarbonetos na matriz contaminada e o tempo de contaminação também afetam a eficiência da biodegradação. O processo de “envelhecimento” dos contaminantes diminui a sua biodisponibilidade aos microrganismos e resulta na permanência das frações recalcitrantes no solo (MÁRQUEZ-ROCHA et al., 2001; TRINDADE et al., 2005). Para aumentar a solubilidade aquosa de contaminantes de natureza hidrofóbica, como a maioria dos hidrocarbonetos de petróleo e dos solventes orgânicos, tem sido sugerida a adição de surfactantes, incluindo os de origem microbiológica, ou de microrganismos que os produzam (CARMICHAEL e PFAENDER, 1997; STRAUBE et al., 1999; JACQUES et al., 2007).

O sucesso da bioaugmentação depende da utilização dos microrganismos adequados, assim como da sobrevivência e da atividade dos mesmos no ambiente a ser tratado. Possivelmente, o maior problema enfrentado no desenvolvimento de inoculantes para bioaugmentação seja o uso de um único

critério para a seleção dos microrganismos, qual seja a habilidade de degradar os contaminantes, não sendo considerado seu potencial em se proliferar, sobreviver e se manter ativo no sítio alvo (THOMPSON et al., 2005).

No presente trabalho, o enriquecimento de populações microbianas foi realizado em condições de oscilação de temperatura e de umidade, para induzir tolerância a essas variáveis que interferem na adaptação e eficiência de biodegradação no sítio alvo. Outro aspecto relevante foi o da seleção de populações microbianas mistas sem o isolamento em meio de cultivo, fato importante, uma vez que microrganismos não-cultiváveis podem também atuar na degradação de hidrocarbonetos. O substrato utilizado para o desenvolvimento dos inoculantes microbianos foi composto de resíduos sólidos urbanos maturado. Esse resíduo foi escolhido por apresentar características desejáveis aos inoculantes microbianos, a saber: elevada diversidade microbiana; alta capacidade de adsorção de hidrocarbonetos, podendo prevenir a volatilização de n-alcenos de baixo peso molecular; estabilidade biológica, por ser um material constituído de substâncias húmicas e de uma matriz sólida relativamente inerte; baixa relação C:N (ISHII et al., 2000; NAMKOONG et al., 2002), além do fato de atuar como condicionador de solos (STEGER et al., 2003), melhorando suas propriedades físicas, químicas e biológicas.

## **CAPÍTULO I**

# **DESENVOLVIMENTO DE INOCULANTES MICROBIANOS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM ÓLEO DIESEL OU GASOLINA**

## RESUMO

LEAL, Aline Jaime, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2009. **Desenvolvimento de inoculantes microbianos para biorremediação de solos contaminados com óleo diesel ou gasolina.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges e Maurício Dutra Costa.

A contaminação de solos e águas superficiais e sub-superficiais por hidrocarbonetos de petróleo é um grave problema ambiental. Técnicas de biorremediação têm sido utilizadas na recuperação desses ambientes para uma condição semelhante à encontrada no ambiente não contaminado, em termos de biodiversidade e funções do ecossistema. O objetivo deste estudo foi desenvolver inoculantes microbianos capazes de degradar óleo diesel ou gasolina no solo. Foram desenvolvidos dois tipos de inoculantes por combustível. Para isso, realizou-se o enriquecimento de composto de resíduos sólidos urbanos em microrganismos degradadores de hidrocarbonetos por meio de adições freqüentes de óleo diesel ou gasolina. Foram realizados ensaios respirométricos para se determinar a concentração mais adequada de combustível a ser adicionada ao composto. Nesse ensaio, observou-se o efeito da dose dos contaminantes e do ajuste da umidade sobre a produção de CO<sub>2</sub>. Os tratamentos com ajuste da umidade e com a maior concentração dos contaminantes (50 mL.kg<sup>-1</sup>) apresentaram a maior evolução de CO<sub>2</sub>. Durante o desenvolvimento dos inoculantes, mudanças na estrutura da comunidade microbiana foram avaliadas pela enumeração de populações de bactérias

cultiváveis e análise de ésteres metílicos de ácidos graxos ligados por ligação éster (EL-FAME). Foi observada a ocorrência de uma fase de adaptação/seleção nos primeiros dias de desenvolvimento dos inoculantes. Nos tratamentos com óleo diesel, as populações de bactérias cultiváveis se adaptaram mais rapidamente, enquanto que nos tratamentos com gasolina, verificou-se efeito inibitório transiente desse combustível sobre as populações bacterianas. A análise de EL-FAME foi realizada apenas para os tratamentos com adição de gasolina, por não ter sido possível eliminar a interferência dos hidrocarbonetos contidos no óleo diesel na análise dos EL-FAME. O perfil de ácidos graxos total dos inoculantes foi influenciado pela adição de gasolina ao composto e pelo tempo de incubação do mesmo. Observaram-se também mudanças no perfil de ácidos graxos dos marcadores de grupos microbianos. O marcador de fungos predominou em todas as fases e tratamentos; os marcadores de bactérias apresentaram maiores oscilações, variando com o tipo de inoculante e com o tempo de amostragem.

## ABSTRACT

LEAL, Aline Jaime, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2009. **Development microbial inoculant to bioremediation of soils contaminated with diesel or gasoline.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges and Maurício Dutra Costa.

The contamination of soils and surface and sub-surface water with petroleum hydrocarbons is a serious environmental problem. Bioremediation techniques have been used in the recovery of these environments to a condition similar to that found in the uncontaminated environment in terms of biodiversity and ecosystem functions. This study aimed at developing microbial inoculants for bioremediation of soils contaminated with diesel or gasoline. Two types of inoculants were developed for each fuel, based on the enrichment of compost from municipal solid waste with hydrocarbons-degrading microorganisms by frequent additions of diesel or gasoline. Respirometric analyses were used to determine the best concentration of fuel to be added to the compost. Highest CO<sub>2</sub> emission rates were obtained in treatments with moisture adjustment and with the highest concentration of contaminants, 50 mL.kg<sup>-1</sup>. During the development of inoculants, changes in microbial community structure were evaluated by the enumeration of culturable bacteria and by analysis of ester-linked fatty acid methyl esters (EL-FAME). It was observed the occurrence of an adaptation/selection phase of heterotrophic bacteria at the beginning of the development of inoculants. In treatments with diesel, the population of

culturable bacteria adapted more quickly, whereas in treatments with gasoline, an inhibitory effect of this fuel on the bacterial populations was observed. The analysis of EL-FAME was used only for the treatments with gasoline, because the method for the removal of diesel interference on EL-FAME analysis was not efficient. Fatty acids profiles of inoculants were influenced by the addition of gasoline to the compost. Changes in EL-FAME profiles were also observed along the incubation period. EL-FAME characteristic of fungi were predominant during inoculum development. Markers of bacteria showed higher oscillation, depending on the type of inoculant and the time of sampling.

## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação de solos e águas superficiais e sub-superficiais por hidrocarbonetos de petróleo é um grave problema ambiental, causado por acidentes e vazamentos durante a extração, transporte e refino do petróleo, ou durante o armazenamento de seus derivados em postos revendedores. A recuperação desses ambientes tem sido intensamente estudada e novas tecnologias desenvolvidas para essa finalidade.

As técnicas de biorremediação são utilizadas para acelerar a biodegradação de contaminantes e recuperar o ambiente contaminado para uma condição semelhante à encontrada no estágio original, em termos de biodiversidade e funções do ecossistema (RÖLING et al., 2002; STROUD et al., 2007). Para assegurar a ótima atividade biológica durante o processo de biorremediação é comum a manipulação do ambiente e das populações microbianas envolvidas no processo de biodegradação (STROUD et al., 2007). Assim, algumas aproximações podem ser empregadas, a exemplo da bioestimulação pela otimização dos fatores ambientais; da bioaugmentação, em que se efetua a inoculação de microrganismos degradadores do contaminante; aumento da biodisponibilidade dos contaminantes por meio da aplicação de surfactantes ou de microrganismos que os produzam (GOGOI et al., 2003; BAPTISTA et al., 2005; MARIANO et al., 2007; STROUD et al., 2007; CARMICHAEL e PFAENDER, 1997; STRAUBE et al., 1999; JACQUES et al., 2007).

A recomendação da bioaugmentação é assunto ainda controverso entre os pesquisadores da área. Alguns estudos demonstram que a degradação é acelerada com a utilização de microrganismos alóctones (STRAUBE et al., 1999; WU et al., 2008), enquanto outros apontam sua ineficiência quando se compara com a bioestimulação ou apenas com a atenuação natural (TRINDADE et al., 2005; GALLEGO et al., 2001; RUBERTO et al., 2009). O sucesso da bioaugmentação depende da utilização de microrganismos adequados e da sobrevivência e atividade dos mesmos no habitat alvo. Evidencia-se, assim, que a utilização de um único critério para a seleção de isolados, a habilidade de degradar os contaminantes, pode não ser a melhor estratégia (THOMPSON et al., 2005).

No presente estudo de desenvolvimento de inoculantes microbianos capazes de degradar óleo diesel ou gasolina no solo, o enriquecimento de populações microbianas foi realizado utilizando-se como substrato composto de resíduos sólidos urbanos maturado. Durante o processo de enriquecimento, o substrato foi mantido em condições de oscilação de temperatura e umidade, para induzir tolerância a variações de fatores ambientais que interferem na adaptação das populações e na eficiência de biodegradação no sítio alvo. Outro diferencial foi o do enriquecimento de populações microbianas mistas, sem o isolamento em meio de cultivo, fato importante quando se considera que microrganismos não-cultiváveis podem também atuar na degradação de hidrocarbonetos.

Em estudos recentes, a utilização de resíduos orgânicos na bioestimulação de solos contaminados com hidrocarbonetos tem alcançado resultados satisfatórios (SARKAR et al., 2005; TEJADA et al., 2008). Composto de resíduos sólidos urbanos foi o substrato escolhido neste trabalho por apresentar características desejáveis aos inoculantes microbianos, tais como: elevada diversidade microbiana; alta capacidade de adsorção de hidrocarbonetos, podendo prevenir a volatilização de n-alcenos de baixo peso molecular; estabilidade biológica, por ser constituído de substâncias húmicas e de uma matriz sólida relativamente inerte e baixa relação C:N (ISHII et al., 2000; NAMKOONG et al., 2002), além de ser um bom condicionador de solos (STEGER et al., 2003), melhorando suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Dessa forma, o material pode funcionar como um substrato

adequado para o desenvolvimento de inoculantes que serão dispostos em solos, sem causar impacto negativo nesse ambiente.

Durante o enriquecimento do composto, o impacto da adição de óleo diesel ou gasolina sobre a comunidade microbiana foi avaliado pela contagem de bactérias cultiváveis e análise de ésteres metílicos de ácidos graxos ligados por ligações éster (EL-FAME). A contagem de populações cultiváveis é uma maneira rápida de se avaliar o efeito dos contaminantes sobre esses microrganismos, bem como sua toxicidade no solo (ÖSTERREICHER-CUNHA et al., 2009). Já o método EL-FAME possui a grande vantagem de ser independente de cultivo, dando informação mais abrangente sobre a estrutura das comunidades microbianas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Substrato para o desenvolvimento dos inoculantes

O substrato utilizado para o desenvolvimento dos inoculantes foi composto de resíduos sólidos urbanos maturado, obtido da Usina de Reciclagem e Compostagem de Lixo do município de Coimbra, MG. O composto foi peneirado através de malha de 5 mm e analisado quanto às suas propriedades físicas e químicas (Tabela 1).

Tabela 1 - Características físicas e químicas do composto de resíduos sólidos urbanos utilizado para produção dos inoculantes microbianos

<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Umidade (%)	24,78
CRA (%)	59,62
pH (H <sub>2</sub> O)	8,5
MO (%)	19,32
C org (%)	4,83
P (%)	0,47
N total (%)	1,16
<b>Metais pesados*</b>	<b>mg.kg<sup>-1</sup></b>
Cd	3,29
Cr	31,80
Pb	51,25
Ni	22,07

CRA: capacidade máxima de retenção de água; MO: matéria orgânica; C org: carbono orgânico. \* Teor de metais pesados do composto de resíduos sólidos urbanos está de acordo com o recomendado na Circular Técnica da Embrapa (SILVA et al., 2002) para disposição no solo, ou seja, cádmio (Cd) ≤ 5, chumbo (Pb) ≤ 150, cromo (Cr) ≤ 200 e níquel (Ni) ≤ 100 mg.kg<sup>-1</sup>.

## **2.2 Determinação da concentração de óleo diesel ou gasolina a ser adicionada ao composto de resíduos sólidos urbanos**

A concentração adequada de óleo diesel ou gasolina para o enriquecimento de populações microbianas degradadoras de hidrocarbonetos foi determinada testando-se as proporções de 0, 10, 20 e 50 mL.kg<sup>-1</sup> desses combustíveis em relação à massa seca do composto. Para isso, amostras de 10 g de composto, com relação C:N:P ajustada para 100:10:2, foram contaminadas com os combustíveis e analisadas quanto à evolução de CO<sub>2</sub> em um respirômetro dotado de um detector de infravermelho, com fluxo intermitente de ar (Sable System, NE, USA). As amostras sob análise foram recontaminadas a cada cinco dias adicionando-se a mesma concentração inicial de óleo ou gasolina (10, 20 e 50 mL.kg<sup>-1</sup>) para novas avaliações.

A influência da umidade na biodegradação dos combustíveis foi verificada em cada um dos tratamentos, sob duas condições estabelecidas, a primeira em que não houve ajuste da umidade e, na outra, em que o ajuste correspondeu a 60% da capacidade máxima de retenção da água (CRA). Nos tratamentos com correção da umidade, ajustes subsequentes foram realizados quando o teor de umidade atingia 40% da CRA, que foi determinado pela perda de massa do composto contido no frasco respirométrico, de modo que a variação foi mantida entre 40 e 60% da CRA. Durante o experimento, os frascos respirométricos permaneceram em temperatura constante de 30 °C. Como controle, utilizou-se composto não-contaminado com derivados do petróleo. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2, com quatro concentrações de combustível e duas condições de umidade, com 3 repetições para cada combustível.

## **2.3 Desenvolvimento dos inoculantes**

Os inoculantes foram desenvolvidos a partir do enriquecimento de composto de resíduos sólidos urbanos com óleo diesel ou gasolina. Durante esse procedimento, foram testados dois tempos de contaminação para cada combustível (Tabela 2), sendo menor o intervalo para a gasolina, por possuir

hidrocarbonetos mais leves e, supostamente de mais fácil biodegradação do que o óleo diesel. Antes do enriquecimento, a relação C:N:P do composto foi corrigida para 100:10:2 e a umidade para 60% da CRA. Cada tratamento foi conduzido com três repetições, sendo utilizados 2 kg de composto maturado por parcela experimental.

Tabela 2 - Frequência de aplicação de óleo diesel (D) e gasolina comercial (G) para o desenvolvimento dos inoculantes microbianos em composto de resíduos sólidos urbanos

Tratamentos*	Intervalo de tempo entre as aplicações de óleo diesel ou gasolina
<b>Óleo diesel</b>	
AD	4 dias
BD	8 dias
C	Composto não-enriquecido
<b>Gasolina</b>	
AG	3 dias
BG	6 dias
C	Composto não-enriquecido

\* O composto de resíduos sólidos urbanos (2 kg) foi acondicionado em bandejas plásticas e contaminado com 50 mL.kg<sup>-1</sup> de óleo diesel ou gasolina comercial em relação à massa seca do composto. Os tratamentos foram incubados em ambiente aberto, durante 18 dias para os tratamentos com adição de gasolina e 24 dias para os com óleo diesel. O teor de água foi mantido entre 40% e 60% da CRA e a relação C:N:P ajustada inicialmente para 100:10:2.

O composto foi acondicionado em bandejas plásticas, colocadas em ambiente com temperatura variável, ficando sujeito à perda de umidade, que foi corrigida periodicamente para 60% da CRA quando o teor de umidade chegava a 40% da CRA. A temperatura foi registrada e o composto revolvido diariamente. O tratamento composto não-enriquecido consistiu de composto não-contaminado com óleo diesel ou gasolina, com relação C:N:P ajustada

para 100:10:2 e umidade corrigida para 60% da CRA, mantido nas mesmas condições dos inoculantes.

## **2.4 Análises dos inoculantes**

As análises de enumeração de populações bacterianas cultiváveis e de ésteres metílicos de ácidos graxos ligados por ligação éster (EL-FAME) dos inoculantes foram realizadas nas amostras coletadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 6, 12 e 18 dias para os tratamentos com gasolina e nos tempos de 2, 4, 8, 16 e 24 dias para os tratamentos com óleo diesel. A amostragem foi realizada anteriormente a adição dos combustíveis. O composto não-enriquecido também foi analisado do mesmo modo que os inoculantes nos períodos indicados acima.

### **2.4.1 Enumeração de populações bacterianas cultiváveis**

Para a contagem de populações de bactérias heterotróficas cultiváveis, 10 g de cada inoculante foram diluídos em 95 mL de pirofosfato de sódio a 0,1% (massa/volume). Após agitação a 200 rpm por 20 min, foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento de 0,1 mL em placas contendo ágar nutriente. Para inibir o crescimento fúngico, foi adicionada ciclohexamida (50 mg.L<sup>-1</sup>) ao meio. As placas foram incubadas a 30 °C até a contagem das colônias formadas. Essa análise foi realizada a partir do segundo dia do início da produção dos inoculantes.

### **2.4.2 Análise de ésteres metílicos de ácidos graxos ligados por ligação éster (EL-FAME)**

Primeiramente, foi desenvolvido um método para a remoção dos hidrocarbonetos dos combustíveis antes da extração dos ácidos graxos. Para isso, em cada amostra de 1 g de massa fresca, foram adicionados 3 mL de água destilada esterilizada e 1 mL de hexano. Após homogeneização, as

amostras foram centrifugadas a 544 g por 15 minutos. A seguir, a camada de hexano contendo os hidrocarbonetos foi removida, seguindo-se a remoção da água. A água foi utilizada somente para a visualização das fases distintas, composto, água e hexano. Esse processo foi repetido três vezes.

Para extração dos ácidos graxos foi utilizado o método EL-FAME, como descrito por SCHUTTER e DICK (2000), com modificações. Foi realizada uma redução de 1/3 do volume dos reagentes e da amostra. Na última etapa do processo, o solvente, contendo os FAME, foi evaporado em estufa a vácuo até secagem completa e o resíduo foi ressuspensionado em 1:3 do volume original do solvente de corrida. Em seguida, as amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890. A identificação dos ácidos graxos foi feita pelo sistema Sherlock da Microbial Identification System® (MIDI, Newark, DE, EUA), utilizando-se os métodos de referência ITSA, IR2A ou RTSBA. Os ácidos graxos marcadores dos grupos microbianos analisados estão representados na tabela 3. A partir dos dados obtidos nos cromatogramas, foi calculada a proporção relativa de cada marcador específico em relação ao total de marcadores analisados.

Tabela 3 - Ácidos graxos marcadores usados na determinação dos grupos microbianos presentes nos inoculantes microbianos e no composto não-enriquecido

ÁCIDOS GRAXOS MARCADORES	GRUPO DE MICRORGANISMO	FONTE
17:1w8c; 16:1w5c	Bactérias gram-negativas	Klamer e Baath (1998), Kato e Miura (2008)
i/a15:00; i16:00; i/a17:00	Bactérias gram-positivas	Klamer e Baath (1998), Kato e Miura (2008)
10Me17:00; 10Me18:0	Actinomicetos	Klamer e Baath (1998), Steger et al. (2005), Kato e Miura (2008)
17:1w8c; 16:1w5c, i/a15:00; i16:00; i/a17:00, 10Me17:00; 10Me18:0	Bactérias totais	Klamer e Baath (1998), Steger et al. (2005), Steger et al. (2007), Kato e Miura (2008),
18:1w9c	Fungos	Klamer e Baath. (1998), Steger et al. (2007)

### 3 RESULTADOS

Nos ensaios respirométricos para determinação da concentração mais adequada de óleo diesel ou gasolina a ser usada na produção dos inoculantes, verificou-se interação entre a concentração desses combustíveis e a umidade ( $p < 0,05$ ). As maiores taxas de evolução de  $\text{CO}_2$  ocorreram nos tratamentos em que a umidade foi corrigida periodicamente (Figuras 1 e 2). A resposta da comunidade microbiana à contaminação com hidrocarbonetos foi específica para cada combustível, sendo mais acentuada para o óleo diesel. A taxa de produção de  $\text{CO}_2$  aumentou de forma considerável durante os episódios de recontaminação e ajuste da umidade do composto (Figuras 1 A e 2 A).

O efeito da dose dos combustíveis foi observado nos tratamentos com ajuste da umidade, ocorrendo maior produção de  $\text{CO}_2$  e, portanto, maior degradação dos contaminantes, nos tratamentos que receberam as maiores doses dos mesmos (Figuras 1 e 2). Assim, considerou-se o melhor tratamento para produção dos inoculantes o composto adicionado de  $50 \text{ mL.kg}^{-1}$  dos combustíveis e com ajuste da umidade.

Durante o desenvolvimento dos inoculantes, as temperaturas mínima e máxima registradas foram de 21 e 38 °C, ocorrendo variações diárias de até 13 °C entre as mesmas.

A análise dos dados relativos à enumeração de bactérias cultiváveis (Figura 3) mostra a ocorrência de uma fase de adaptação/seleção nos primeiros dias de desenvolvimento dos inoculantes. Após 12 dias, houve um rápido crescimento das populações bacterianas nos dois inoculantes enriquecidos com gasolina (Figura 3 A). Nos tratamentos com óleo diesel, o crescimento bacteriano foi maior, principalmente após 8 dias de enriquecimento (Figura 3 B). Obteve-se maior contagem de bactérias heterotróficas nos inoculantes A para ambos os combustíveis (Figura 3). O resultado reflete o enriquecimento específico de populações que utilizam hidrocarbonetos de petróleo, estimuladas pela aplicação mais freqüente de hidrocarbonetos no inoculante A (Tabela 2).

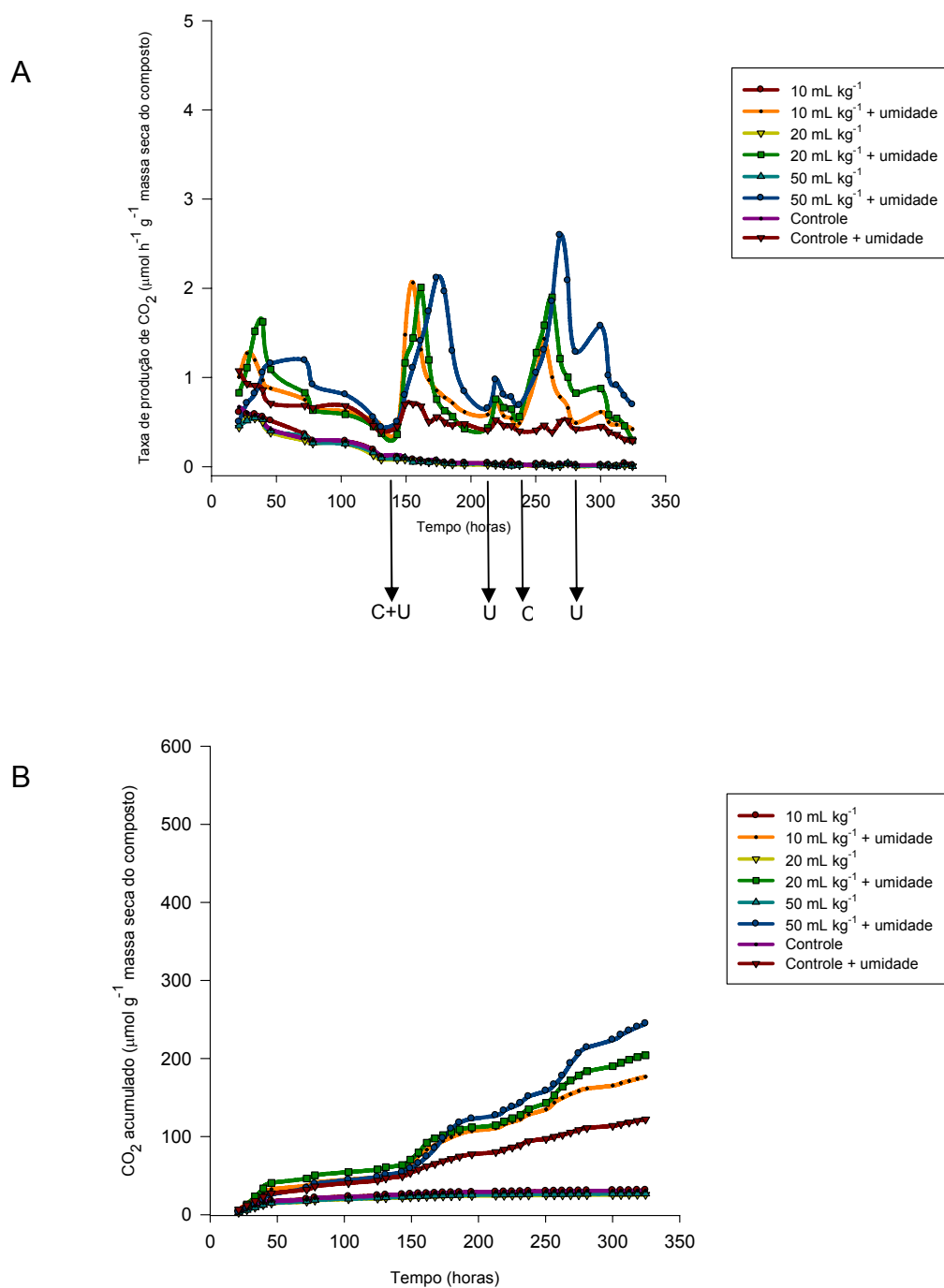


Figura 1 - Atividade respiratória da comunidade microbiana de composto de resíduos sólidos urbanos em resposta à aplicação de gasolina comercial. A) Taxa de produção de CO<sub>2</sub>. B) Produção acumulada de CO<sub>2</sub>. Foram aplicadas as doses de 0, 10, 20 e 50 mL.kg<sup>-1</sup> de gasolina comercial ao composto de resíduos sólidos urbanos. No tratamento controle, não foi adicionada gasolina. Tratamentos que tiveram sua umidade mantida entre 40 e 60% da CRA durante o experimento são indicados por + umidade. As setas indicam os episódios de contaminação (C) e/ou ajuste da umidade (U).

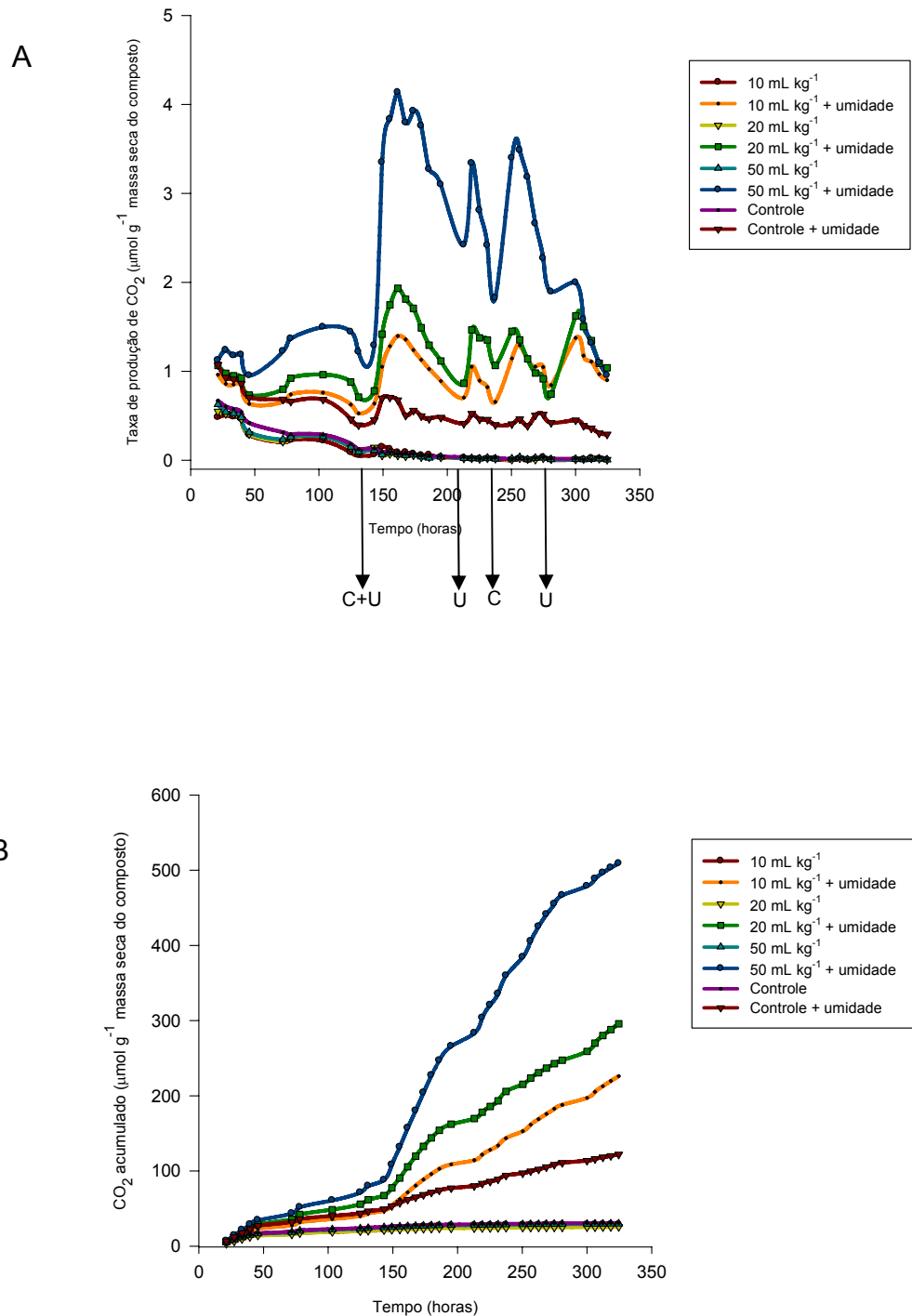


Figura 2 - Atividade respiratória da comunidade microbiana de composto de resíduos sólidos urbanos em resposta à aplicação de óleo diesel. A) Taxa de produção de  $\text{CO}_2$ . B) Produção acumulada de  $\text{CO}_2$ . Foram aplicadas as doses de 0, 10, 20 e  $50 \text{ mL.kg}^{-1}$  de óleo diesel ao composto de resíduos sólidos urbanos. No tratamento controle, não foi adicionado óleo diesel. Tratamentos que tiveram sua umidade mantida entre 40 e 60% da CRA durante o experimento são indicados por + umidade. As setas indicam os episódios de contaminação (C) e/ou ajuste da umidade (U).

O composto não-enriquecido apresentou variação pouco expressiva da contagem de populações bacterianas heterotróficas, comparativamente aos tratamentos contaminados com gasolina ou óleo diesel (Figuras 3).

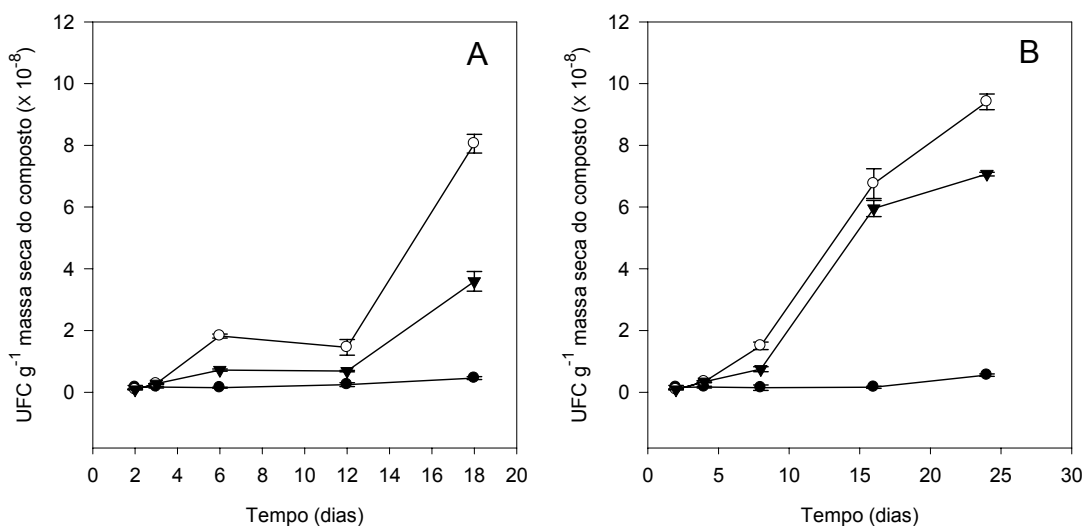


Figura 3 - População de bactérias heterotróficas cultiváveis durante o desenvolvimento dos inoculantes. A) Gasolina. B) Óleo diesel. Composto não-enriquecido ●, inoculante A ○, inoculante B ▼. Nos inoculantes A, a aplicação de gasolina ocorreu a cada 3 dias e do óleo diesel a cada 4 dias. Nos inoculantes B, o intervalo de contaminação foi de 6 dias para gasolina e 8 para o óleo diesel.

O procedimento para remoção dos combustíveis antes da extração dos EL-FAME foi eficiente para o tratamento com gasolina, uma vez que, na análise de agrupamento dos perfis de ácidos graxos, o perfil do composto adicionado de gasolina, analisado logo após a aplicação do contaminante, agrupou-se com o tratamento-controle, composto não-contaminado (Figura 4). Já os hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel não foram completamente removidos do composto, havendo interferência dos hidrocarbonetos na análise e interpretação dos perfis de EL-FAME (Figura 4). Assim, no restante do experimento, foram realizadas análises de EL-FAME somente para os tratamentos que receberam adição de gasolina.

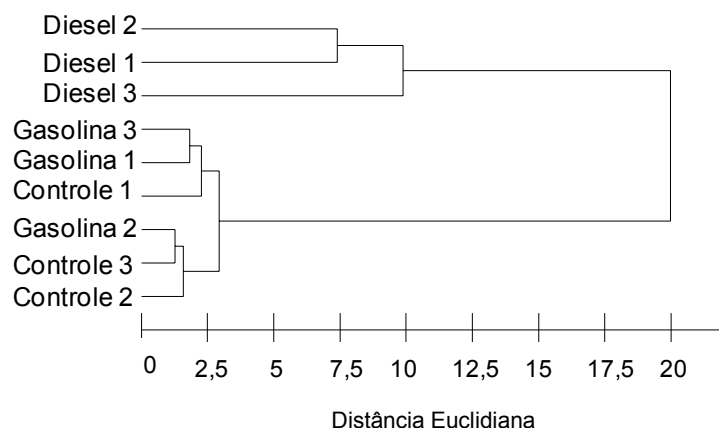


Figura 4 - Dendrograma da análise de agrupamento dos perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos ligados por ligação éster (FAME) após a extração dos combustíveis do composto de resíduos sólidos urbanos com hexano. Os números 1, 2 e 3 representam as repetições de cada amostra. No tratamento-controle não foi aplicado óleo diesel nem gasolina.

A análise de agrupamento dos perfis de ácidos graxos demonstrou não haver diferenças nos EL-FAME analisados entre zero e 3 dias (dados não-apresentados), indicando que, nesse período, a composição da comunidade microbiana não se alterou em resposta à aplicação da gasolina. Esse resultado é coerente com os dados da contagem de populações heterotróficas (Figura 3 A). Desse modo, optou-se por avaliar somente os EL-FAME extraídos nos tempos 0, 6, 12 e 18 dias de incubação do composto contaminado com gasolina (Figura 5).

De acordo com a análise de componente principal (PCA) dos dados de EL-FAME, observou-se que as mudanças no perfil dos ácidos graxos dos inoculantes foram influenciadas pela adição de gasolina e pelo tempo de incubação do composto (Figura 5). As amostras do tempo zero ficaram dispostas no grupo I, no qual observa-se também a presença do composto não-enriquecido do décimo oitavo dia.

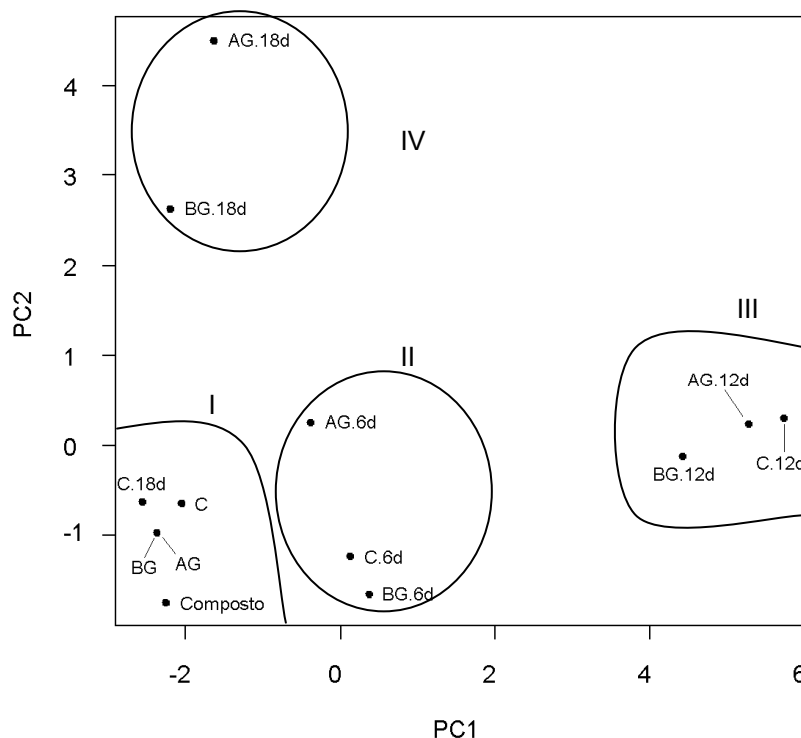


Figura 5 - Análise de componentes principais dos perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) durante o desenvolvimento dos inoculantes da gasolina. C: composto não-enriquecido; AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina; composto: originalmente utilizado neste estudo sem aditivos. Foram analisadas amostras nos tempos zero (sem indicação), seis (6d), doze (12d) e dezoito dias (18d). I – amostras do tempo zero e composto não-enriquecido do décimo oitavo dia, II – amostras do sexto dia, III – amostras do décimo segundo dia, IV – amostras do décimo oitavo dia.

Quanto aos ácidos graxos marcadores dos grupos microbianos, no tempo zero, nos inoculantes AG e BG, ocorreu uma redução dos marcadores de bactérias gram-positivas e de fungos e aumento considerável dos marcadores de actinomicetos (> 2,3 vezes) em relação ao composto não-enriquecido (Figuras 6 C e D).

O grupo II corresponde às amostras com seis dias de incubação, Nesse tempo de amostragem, observa-se maior discrepância do perfil de ácidos graxos do inoculante AG em relação às outras amostras (Figura 5). O inoculante AG recebeu maior quantidade de gasolina, que foi contaminado a cada três dias, o que aparentemente impôs maior perturbação na comunidade microbiana. Essas perturbações se refletem no aumento dos ácidos graxos

marcadores de bactérias gram-positivas e redução dos marcadores das gram-negativas e actinomicetos, em relação ao composto não-enriquecido (Figura 6 C).

Houve pequeno efeito da gasolina sobre o perfil dos ácidos graxos do inoculante BG, que foi contaminado apenas uma vez antes da amostragem (tempo zero), havendo maior similaridade com o perfil do composto não-enriquecido (Figura 5).

Mudanças mais acentuadas no perfil de ácidos graxos dos inoculantes AG e BG e do composto não-enriquecido foram verificadas no décimo segundo dia (Figura 5). Nesse tempo de amostragem, foi observada a maior proporção relativa de marcadores de fungos em todos os tratamentos. Observou-se ainda redução dos ácidos graxos marcadores de bactérias gram-positivas e oscilações dependentes do tratamento para as gram-negativas e actinomicetos (Figura 6).

A PCA revelou que as amostras do décimo oitavo dia ficaram mais próximas das do tempo zero e do sexto dia (Figura 5). Nessa fase, houve um aumento dos marcadores para gram-positivas e diminuição dos marcadores de gram-negativas e de actinomicetos nos inoculantes, sendo essa redução mais acentuada para o inoculante AG (Figura 6 C e D). A diminuição dos marcadores para actinomicetos, nessa época de avaliação, também foi observada no composto não-enriquecido (Figura 6 B).

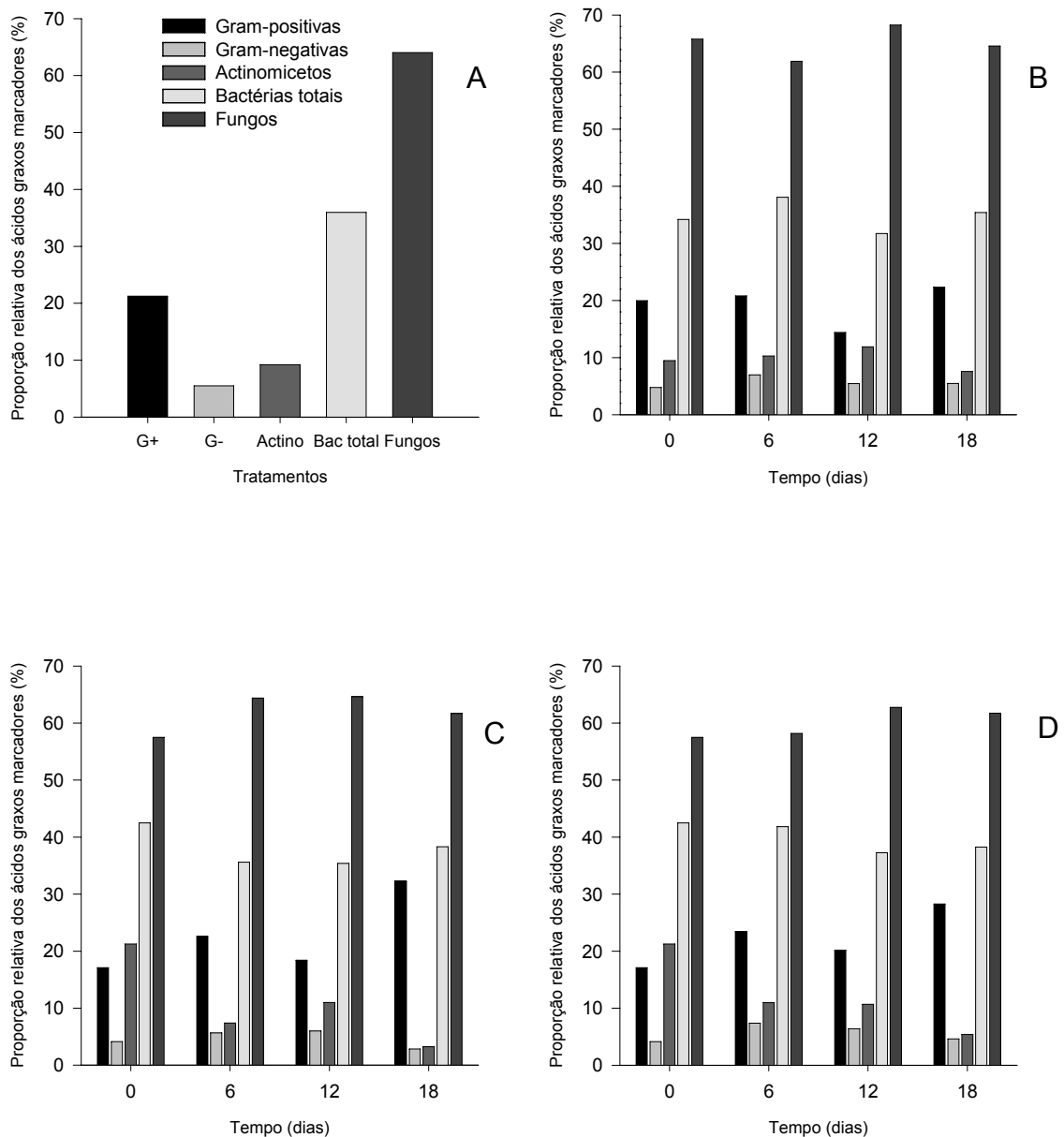


Figura 6 - Proporções relativas de ácidos graxos marcadores para os seguintes grupos microbianos: bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas, actinomicetos, bactérias totais e fungos. As bactérias totais compreendem a soma dos ácidos graxos marcadores das bactérias gram-positivas, gram-negativas e actinomicetos. A - composto sem aditivos; B - composto não-enriquecido com adição de nutrientes e umidade corrigida; C - inoculante A; D - inoculante B.

## 4 DISCUSSÃO

Durante as análises respirométricas, ficou evidenciada a importância do controle da umidade no processo de biodegradação dos combustíveis. Tanto o ajuste da umidade como os eventos de adição dos contaminantes levaram a um aumento na taxa de produção de CO<sub>2</sub> (1 A e 2 A). O revolvimento do composto realizado durante esses episódios pode ter contribuído para isso, uma vez que favoreceu o contato do contaminante com os microrganismos (SEMPLE et al., 2006). Deste modo, a fração bioacessível - potencialmente disponível (SEMPLE et al., 2004) - pode ter se tornado disponível aos microrganismos.

A exposição prévia de comunidades microbianas a contaminantes orgânicos induz adaptações fisiológicas e seleção dos microrganismos capazes de metabolizá-los. As sucessivas aplicações de óleo diesel ou de gasolina ao composto ocasionaram resposta rápida e acentuada dos microrganismos, sugerindo a adaptação dos mesmos aos hidrocarbonetos presentes nesses combustíveis. Essa resposta, visualizada por meio da taxa de produção de CO<sub>2</sub>, foi dose-dependente, sendo mais elevada nas maiores concentrações dos contaminantes (Figuras 1 e 2).

Durante o desenvolvimento dos inoculantes, observou-se rápida adaptação das populações bacterianas heterotróficas cultiváveis nos tratamentos com óleo diesel, com aumento considerável da contagem desse grupo após 8 dias de enriquecimento (Figura 3). Nos inoculantes para gasolina, o efeito inibitório sobre as populações bacterianas foi constatado e pode estar

relacionado à presença de hidrocarbonetos mais leves nesse combustível, que são mais tóxicos aos microrganismos (LABUD et al., 2007). Portanto, a expressão de mecanismos de tolerância ou resistência é requerida, o que leva a uma maior fase *lag* para adaptação dos microrganismos a esses compostos. O efeito tóxico da gasolina também foi observado por ÖSTERREICHER-CUNHA et al. (2009), ao analisarem populações bacterianas do solo. Esses pesquisadores constataram que a toxicidade da gasolina foi mais prolongada nos tratamentos com gasolina acrescida de etanol, o mesmo tipo de gasolina utilizada neste estudo.

Na gasolina comercial brasileira, tanto os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno e xileno (BTEX) quanto o etanol contribuem para a toxicidade desse combustível. Dada à propriedade lipofílica dos hidrocarbonetos, os mesmos tendem a se acumular na membrana plasmática das células, causando uma permeabilização inespecífica da mesma (DULDHARDT et al., 2007; ISKEN e BONT, 1996; ISKEN e BONT, 1998). Deste modo, esses compostos interferem na integridade da membrana plasmática, bem como nas suas funções como barreira, matriz para enzimas e transdutora de energia (ISKEN e BONT, 1998).

Vários mecanismos de tolerância a esses compostos orgânicos têm sido descritos, tais como: diminuição da fluidez da membrana plasmática com a modificação da configuração *cis* para *trans* dos ácidos graxos insaturados (HEIPIEPER e BONT, 1994; ISKEN e BONT, 1996) ou saturação das cadeias acil dos ácidos graxos (SIKKEMA et al., 1995); redução da hidrofobicidade da parede celular por meio de alterações nos polissacarídeos da membrana externa em bactérias gram-negativas (SIKKEMA et al., 1995; ISKEN e BONT, 1996); efluxo ativo dos contaminantes (ISKEN e BONT, 1996); perda de porinas, evitando-se com isso a entrada dos hidrocarbonetos (AONO e KOBAYASHI, 1997); aumento do tamanho da célula, diminuindo sua área superficial e, assim, reduzindo a ligação do composto tóxico à sua superfície (NEUMANN et al., 2005). A comunidade microbiana do composto não utilizou a isomerização de seus ácidos graxos insaturados como mecanismo de tolerância à gasolina, visto que, na análise de ésteres metílicos de ácidos graxos, não foi encontrada a configuração *trans* (dados não-mostrados). Portanto, outros mecanismos de adaptação devem ter sido empregados.

A prevalência de bactérias gram-positivas, incluindo os actinomicetos, nos inoculantes deve-se supostamente à composição microbiana do composto maturado (Figura 6 A), uma vez que essas bactérias são mais resistentes ao aumento da temperatura ocorrido na fase termófila durante a compostagem. Já as gram-negativas tendem a ser eliminadas durante essa fase, podendo recolonizar o composto ao final do processo. A concentração de ácidos graxos marcadores de bactérias gram-positivas, ácidos graxos ramificados, e de gram-negativas, ácidos graxos hidroxil e de cadeia reta, podem ser indicativos da maturidade do composto (KATO et al., 2005). Há uma correlação positiva entre a concentração de ácidos graxos ramificados com parâmetros físico-químicos e biológicos utilizados para avaliar a maturidade do composto, sendo inversa essa relação para os ácidos graxos hidroxil e de cadeia reta. Assim, no composto maturado há o predomínio de ácidos graxos marcadores para bactérias gram-positivas em detrimento das gram-negativas, característica que se mantém mesmo depois de prolongado período de armazenamento (KATO et al., 2005). Os marcadores para fungos são dominantes na fase de maturação ou fase mesófila da compostagem (AMIR et al., 2008). O mesmo foi observado no composto utilizado neste estudo (Figura 6 A).

Após as sucessivas contaminações com gasolina, mudanças na proporção relativa dos ácidos graxos marcadores para os grupos microbianos foram observadas. A predominância dos marcadores para fungos se manteve como originalmente encontrado no composto de resíduos sólidos urbanos, assim como, dentre as bactérias, os marcadores para gram-positivas foram mais abundantes. Nos inoculantes, o efeito da contaminação foi marcado pelo aumento dos marcadores para gram-positivas e diminuição dos marcadores para gram-negativas e actinomicetos.

Os microrganismos têm diferentes estratégias de sobrevivência para se adaptarem às condições do ambiente. Os estrategistas r são caracterizados pela alta taxa de crescimento e apresentam elevada atividade metabólica quando há disponibilidade de substrato (THOMPSON et al., 2005). Já os estrategistas K têm como principais características a eficiência de utilização do substrato, o crescimento lento e a atividade metabólica reduzida, porém constante (MARGESIN et al., 2007; THOMPSON et al., 2005). Em termos de bioaugmentação, quando há constante contaminação do ambiente,

microrganismos com maior sobrevivência no meio podem degradar o contaminante lenta e continuamente (estrategistas K). Porém, em episódios esporádicos de contaminação, a inoculação de estrategistas r é mais vantajosa, uma vez que altas concentrações do contaminante estimularão o seu rápido crescimento e atividade metabólica (THOMPSON et al., 2005). As bactérias gram-negativas são tipicamente caracterizadas como sendo estrategistas r, enquanto que as gram-positivas são predominantemente estrategistas K (MARGESIN et al., 2007). Porém, tem sido verificado que as bactérias podem mudar sua estratégia de sobrevivência de acordo com os fatores ambientais, como relatado para *Bacillus* spp., que pode, em condições ótimas, exibir crescimento característico de estrategistas r (GOLOVLEV, 2001). Neste estudo, a adição de gasolina ao composto de resíduos sólidos urbanos favoreceu as populações de gram-positivas e, por estarem mais bem adaptadas às condições do composto, foram melhores competidoras do que as gram-negativas.

## 5 CONCLUSÕES

Membros da comunidade microbiana presentes em composto de resíduos sólidos urbanos maturado são eficientes na degradação de hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel e da gasolina.

Doses elevadas de óleo diesel ou gasolina, juntamente com o controle da umidade, favorecem o enriquecimento de populações capazes de degradar os hidrocarbonetos presentes nesses combustíveis.

As populações de bactérias heterotróficas cultiváveis presentes no composto de resíduos sólidos urbanos adaptam-se mais rapidamente ao óleo diesel do que à gasolina.

A adição de gasolina ao composto promove alterações no perfil de ácidos graxos da comunidade microbiana.

Mudanças nas proporções relativas dos ácidos graxos marcadores para os grupos microbianos: bactérias gram-positivas, gram-negativas, bactérias totais, actinomicetos e fungos são observadas durante o desenvolvimento dos inoculantes da gasolina.

O ácido graxo marcador para fungos é predominante e se mantém mais constante; os marcadores para bactérias apresentam maiores oscilações e são dependentes do tipo de inoculante e do tempo de amostragem.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIR, S.; MERLINA, G.; PINELLI, E.; WINTERTON, P.; REVEL, J. C.; HAFIDI, M. Microbial community dynamics during composting of sewage sludge and straw studied through phospholipid and neutral lipid analysis. **Journal of Hazardous Materials**, v.159, p. 593-601, 2008.

AONO, R.; KOBAYASHI, H. Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K-12. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3637-3642, 1997.

BAPTISTA, S. J.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. D. C. Production of CO<sub>2</sub> in crude oil bioremediation in clay soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 249-255, 2005.

CARMICHAEL, L. M.; PFAENDER, F. K. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. **Biodegradation**, v. 8, p. 1-13, 1997.

DULDHARDT, I.; NIJENHUIS, I.; SCHAUER, F.; HEIPIEPER, H. J. Anaerobically grown *Thauera aromatica*, *Desulfococcus multivorans*, *Geobacter sulfurreducens* are more sensitive towards organic solvents than aerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p.705-71, 2007.

GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, v. 12, p. 325-335, 2001.

GOGOI, B. K.; DUTTA, N. N.; GOSWAMI, P.; KRISHNA MOHAN, T. R. K. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 767-782, 2003.

GOLOVLEV, E. L. Ecological strategy of bacteria: specific nature of the problem. **Microbiology**, v. 70, p. 379-383, 2001.

HEIPIEPER, J. H.; BONT, J. A. M. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4440-4444, 1994.

ISHII, K.; FUKUI, M.; TAKII, S. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 768-777, 2000.

ISKEN, S.; BONT, J. A. M. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 6056-6058, 1996.

ISKEN, S.; BONT, J. A. M. Bacteria tolerant to organic solvents. **Extremophiles**, v. 2, p. 229-238, 1998.

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

KATO, K.; MIURA, N.; TABUCHI, H.; NIOH, I. Evaluation of maturity of poultry manure compost by phospholipid fatty acids analysis. **Biology and Fertility of Soils**, v. 41, p. 399-410, 2005.

KATO, K.; MIURA, N. Effect of matured compost as a bulking and inoculating agent on the microbial community and maturity of cattle manure compost. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3372-3380, 2008.

KLAMER, M.; BAATH, E. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 27, p. 9-20, 1998.

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.

MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. A. G.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 346-353, 2007.

MARGESIN, R.; HÄMMERLE, M.; TSCHERKO, D. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 259-269, 2007.

NAMKOONG, W.; HWANG, E. Y.; PARK, J. S.; CHOI, J. Y. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. **Environmental Pollution**, v. 119, p. 23-31, 2002.

NEUMANN, G.; VEERANAGOUDA, Y.; KAREGOUDAR, T. B.; SAHIN, O.; MÄUSEZAHN, I.; KABELITZ, N.; KAPPELMEYER, U.; HEIPIEPER, H. J. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size. **Extremophiles**, v. 9, p. 163-168, 2005.

ÖSTERREICHER-CUNHA, P.; VARGAS, E. A. JR.; GUIMARÃES, J. R. D.; LAGO, G. P.; ANTUNES, F. S., SILVA, M. I. P. Effect of ethanol on the biodegradation of gasoline in an unsaturated tropical soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 208-216, 2009.

RÖLING, W. F. M.; MILNER, M. G.; JONES, D. M.; LEE, K.; DANIEL, F.; SWANNELL, R. J. P.; HEAD, I. M. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5537-5548, 2002.

RUBERTO, L.; DIAS, R.; LO BALBO, A.; VAZQUEZ, S. C.; HERNANDEZ, E. A.; MAC CORMACK, W. P. Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated antarctic soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1101-1110, 2009.

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, p. 187-195, 2005.

SEMPLE, K. T.; DOICK, K. J.; JONES, K. C.; BURAUER, P.; CRAVEN, A.; HARMS, H. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. **Environmental Science & Technology**, 228A-231A, 2004.

SEMPLE, K. T.; DEW, N. M., DOICK, K. J., RHODES, A. H. Can microbial mineralization be used to estimate microbial availability of organic contaminants in soil? **Environmental Pollution**, v. 140, p. 164-172, 2006.

SCHUTTER, M. E.; DICK, R. P. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. **Soil Science Society of America Journal**, v. 64, p. 1659-1668, 2000.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 201-222, 1995.

SILVA, F. C.; BERTON, R. S.; CHITLINA, J. C.; BALLESTERO, S. D. 2002. **Recomendações técnicas para o uso agrícola do composto de lixo urbano no estado de São Paulo**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Embrapa, Campinas – SP, 2002, p. 17.

SILVA, F. C.; BERTON, R. S.; CHITLINA, J. C.; BALLESTERO, S. D. 2002. **Recomendações técnicas para o uso agrícola do composto de lixo urbano no estado de São Paulo**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Embrapa, Campinas – SP, 2002, p. 17.

STEGER, K.; JARVIS, A.; SVEN, S.; SUNDH, I. Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 371- 382, 2003.

STEGER, K.; EKLIND, Y.; OLSSON, J.; SUNDH, I. Microbial community growth and utilization of carbon constituents during thermophilic composting at different oxygen levels. **Microbial Ecology**, v. 50, p.163-171, 2005.

STEGER, K.; JARVIS, A.; VASARA, T.; ROMANTSCHUK, M.; SUNDH, I. Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. **Research in Microbiology**, v. 158, p. 617-624, 2007.

STRAUBE, W. L.; JONES-MEEHAN, J.; PRITCHARD, P. H.; JONES, W. R. Bench-scale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils

contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 27, p. 27-37, 1999.

STROUD J. L., PATON, G. I.; SEMPLE, K. T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1239-1253, 2007.

TEJADA, M.; GONZALEZ, J. L.; HERNANDEZ, M. T.; GARCIA, C. Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: effect on soil microbial properties. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2872-2880, 2008.

THOMPSON, I. P.; VAN DER GAST, C. J.; CIRIC, L.; SINGER, A. C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 909-915, 2005.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; 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.

WU, Y.; LUO, Y.; ZOU, D.; NI, J.; LIU, W.; TENG, Y.; LI, Z. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilinia* sp.: degradation and microbial community analysis. **Biodegradation**, v. 19, p. 247-257, 2008.

## **CAPÍTULO II**

### **EFICIÊNCIA DE INOCULANTES MICROBIANOS NA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS EM SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL OU GASOLINA**

## RESUMO

LEAL, Aline Jaime, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2009. **Eficiência de inoculantes microbianos na degradação de hidrocarbonetos em solo contaminado com óleo diesel ou gasolina.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges e Maurício Dutra Costa.

Neste estudo foi avaliada a eficácia de inoculantes microbianos na degradação de hidrocarbonetos de petróleo em solos contaminados com óleo diesel ou gasolina comercial. Além da bioaugmentação do solo, também se realizou a bioestimulação com ajuste de nutrientes (N e P) e umidade. O solo foi contaminado com 20 mL.kg<sup>-1</sup> de óleo diesel ou gasolina, seguindo-se a aplicação dos inoculantes e do composto não-enriquecido em microrganismos degradadores de hidrocarbonetos nas proporções de 10, 30 ou 50 g.kg<sup>-1</sup>. A avaliação da degradação dos contaminantes foi baseada na evolução de CO<sub>2</sub>. Nos tratamentos com óleo diesel, adotou-se também a análise de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH). No solo contaminado com gasolina, verificou-se interação entre a concentração e o tipo de inóculo adicionado ao solo. A maior evolução de CO<sub>2</sub> foi observada no solo que recebeu a maior concentração dos inoculantes da gasolina. No solo contaminado com óleo diesel, foi verificado apenas o efeito do tipo de inóculo adicionado ao solo, sendo que os tratamentos com adição dos inoculantes do óleo diesel

apresentaram maior evolução de CO<sub>2</sub> do que os que receberam composto não-enriquecido. Os microrganismos autóctones do solo foram mais eficientes na degradação de óleo diesel do que da gasolina, provavelmente por causa dos efeitos tóxicos causados pelos hidrocarbonetos mais leves da gasolina. A maior porcentagem de degradação de TPH provenientes do óleo diesel (98 e 99%) ocorreu quando foi aplicada a dose de 30 g.kg<sup>-1</sup> dos inoculantes e do composto não-enriquecido ao solo. Alterações no perfil de ácidos graxos do solo foram observadas após a aplicação dos inoculantes e do composto não-enriquecido, ocorrendo aumento dos ácidos graxos marcadores de fungos e diminuição dos marcadores de actinomicetos. Após a análise da eficiência dos inoculantes recém-preparados, esses foram armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração durante 97 dias os do óleo diesel e 103 dias os da gasolina. Verificou-se, por meio da enumeração de bactérias heterotróficas cultiváveis, que a temperatura de refrigeração foi a mais adequada para a manutenção da viabilidade dos inoculantes. Foi observada também redução dos ácidos graxos marcadores de bactérias gram-positivas e aumento dos de fungos nos inoculantes da gasolina, independentemente da temperatura de armazenamento. Outro ensaio respirométrico foi conduzido para se verificar a eficiência dos inoculantes, após armazenamento, em degradar hidrocarbonetos do óleo diesel ou da gasolina no solo. Os inoculantes apresentaram maior eficiência de degradação após armazenamento sob refrigeração. Os inoculantes do óleo diesel mantiveram as porcentagens de degradação de TPH próximas das obtidas antes do armazenamento. Já os inoculantes da gasolina apresentaram redução da eficiência de degradação. Os inoculantes microbianos foram eficientes na degradação de hidrocarbonetos no solo, mesmo após armazenamento por período prolongado.

## ABSTRACT

LEAL, Aline Jaime, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2009. **Efficiency microbial inoculant in biodegradation of hydrocarbon in soil contaminated with diesel or gasoline.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Antônio Galvão do Nascimento, Arnaldo Chaer Borges and Maurício Dutra Costa.

This study evaluated the effectiveness of microbial inoculants in the degradation of petroleum hydrocarbons in soil contaminated with diesel or gasoline. Apart from the soil bioaugmentation, it was also made the biostimulation with adjustment of nutrients (N and P) and moisture. The soil was contaminated with 20 mL.kg<sup>-1</sup> of diesel or gasoline. After that, it was made the application of inoculants and non-enriched compost in microbial decomposers of hydrocarbons in the proportions of 10, 30 or 50 g.kg<sup>-1</sup>. The evaluation of the degradation of contaminants was based on the evolution of CO<sub>2</sub>. In the treatments with diesel, it was adopted also the analysis of total petroleum hydrocarbons (TPH). In the soil contaminated with gasoline, there was an interaction between the concentration and the type of inoculum added to soil. A highest CO<sub>2</sub> evolution was observed in the soil that received the highest concentration of inoculants from gasoline. In the soil contaminated with diesel, it was observed only the effect of the type of inoculum added to the soil, and the inoculants of diesel presented a more significant CO<sub>2</sub> evolution than the non-enriched compost. The indigenous soil microorganisms were more efficient in

the degradation of diesel than the gasoline, probably because of the toxic effects caused by the lighter hydrocarbons of gasoline. A highest percentage of diesel TPH degradation (98 and 99%) occurred when it was administered the dose of 30 g.kg<sup>-1</sup> of inoculants and non-enriched compost to soil. Changes in fatty acid profile in the soil were observed after the application of inoculants and non-enriched compost, because of this, there was an increase of fatty acid marker of fungi and a reduction in markers of actinomycetes. After analyzing the efficiency of inoculants freshly prepared, these were stored at room temperature and under refrigeration for 97 days the inoculants of diesel and for 103 days the inoculants of gasoline. It was through the enumeration of cultivable heterotrophic bacteria, the refrigeration temperature was the most suitable for maintaining the viability of the inoculants. There was also a reduction of fatty acid markers of gram-positive bacteria and increase in marker of fungi of inoculants, regardless of the temperature of storage. Another respirometry test was conducted to verify the effectiveness of inoculants after storage on degradation of diesel oil or gasoline in the soil. The inoculants of both fuels had higher efficiency of degradation after storage under refrigeration. The inoculants of diesel maintained the percentages of degradation of TPH close to the ones previous to the storage. But the inoculants of gasoline showed a reduced efficiency of degradation. The microbial inoculants were effective in the degradation of hydrocarbons in soil, even after storage for prolonged period.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os derivados do petróleo, como óleo diesel e gasolina, são predominantes no setor de transportes, tendo grande importância econômica no país. Nos últimos anos, houve aumento tanto na produção quanto no consumo desses combustíveis (ANP - Agência Nacional do Petróleo, 2008). Em 2008, o Brasil produziu 127 milhões de barris de gasolina e 255 milhões de barris de óleo diesel (ANP, 2009).

Vazamentos acidentais desses derivados do petróleo de tanques de armazenamento subterrâneos são causa comum de contaminação do solo e de águas subterrâneas no país. Esses acidentes têm como principal causa o fato da maioria desses tanques ter sido implantada há mais de 15 anos e sem nenhum tipo de fiscalização no momento de sua instalação (MELO JUNIOR e COSTI, 2004). De acordo com dados da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo (CETESB, 2008), vazamentos em postos revendedores de combustíveis foram responsáveis por 78% das áreas contaminadas registradas no estado de São Paulo. Nesse tipo de acidente, a remediação do solo é muito importante, uma vez que previne a contaminação do lençol freático (MARIANO, 2006).

A biorremediação é uma biotecnologia que tem sido utilizada para remediar solos contaminados, podendo ser efetuada por diferentes grupos microbianos, que mineralizam ou transformam os contaminantes em formas menos tóxicas (VIDALI, 2001). Alguns fatores afetam a eficiência de biodegradação dos contaminantes, como os tipos predominantes de moléculas

contaminantes, as características do solo e o tempo decorrido desde a contaminação. De modo geral, os hidrocarbonetos mais facilmente degradáveis são os primeiros a serem utilizados pelos microrganismos do solo, permanecendo os mais recalcitrantes, que são transformados ou degradados por microrganismos com maior flexibilidade metabólica. O tipo de solo, além de influenciar a biodisponibilidade dos contaminantes, também afeta a estrutura, a atividade e a densidade das comunidades microbianas (SCHERR et al., 2007; LABUD et al., 2007). Solos com alto conteúdo de matéria orgânica e argila retêm mais intensamente os contaminantes, diminuindo sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, os efeitos tóxicos dos mesmos sobre os microrganismos (LABUD et al., 2007). A redução da biodisponibilidade com o tempo transcorrido desde o evento da contaminação também favorece a permanência da fração recalcitrante no solo (MÁRQUEZ-ROCHA et al., 2001; TRINDADE et al., 2005).

A biorremediação é um processo que tende a ocorrer naturalmente, mas pode ser acelerada pela otimização de fatores ambientais (bioestimulação), pela introdução de microrganismos capazes de degradar os contaminantes (bioaugmentação) e pela aplicação de surfactantes para aumentar a biodisponibilidade dos contaminantes (GOGOI et al., 2003; BAPTISTA et al., 2005; MARIANO et al., 2007; STROUD et al., 2007; CARMICHAEL e PFAENDER, 1997; STRAUBE et al., 1999; JACQUES et al., 2007). A bioestimulação é empregada quando os microrganismos autóctones possuem a capacidade de degradar os contaminantes, mas fatores ambientais limitam sua atividade. Contudo, a estratégia de bioaugmentação é vantajosa quando os microrganismos autóctones são incapazes de metabolizar os contaminantes ou quando um eventual efeito tóxico dos mesmos tenha reduzido ou eliminado as populações autóctones importantes para o processo de biodegradação (VOGEL, 1996).

A sobrevivência e atividade dos microrganismos introduzidos no solo dependem da sua adaptação aos fatores bióticos e abióticos encontrados nesse ambiente (FANTROUSSI e AGATHOS, 2005). Os fatores bióticos mais relevantes para a bioaugmentação são a predação dos microrganismos alóctones adicionados ao ambiente, bem como a competição desses com os microrganismos autóctones (VAN VEEN et al., 1997). Os fatores abióticos

compreendem a disponibilidade de nutrientes, o suprimento de oxigênio, condições de temperatura, pH e umidade, entre outros (VAN VEEN et al., 1997). Assim, para que a estratégia de bioaugmentação seja bem sucedida, os microrganismos introduzidos devem possuir vantagens adaptativas, além da capacidade de degradar os contaminantes. Considera-se, deste modo, que a seleção dos microrganismos degradadores dos contaminantes é a etapa crítica da bioaugmentação. Quando se utilizam meios de cultivo para o isolamento de estirpes potencialmente aplicáveis à bioaugmentação, somente a fração de microrganismos degradadores cultiváveis é selecionada. O uso de métodos de enriquecimento que compreendam também os microrganismos não-cultiváveis pode também ser importante, uma vez que esses podem atuar na degradação de hidrocarbonetos. Além disso, na bioaugmentação, a utilização de culturas mistas possui algumas vantagens em relação às culturas puras, que são: maior capacidade biodegradativa, maior resistência a substâncias tóxicas e maior diversidade metabólica, atributo geralmente requerido para a mineralização de compostos xenobióticos (MARIANO, 2006).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de inoculantes microbianos na degradação de hidrocarbonetos de petróleo em solos contaminados com óleo diesel ou gasolina comercial. Para isso, além da bioaugmentação do solo, também se realizou a bioestimulação com ajuste de nutrientes (N e P) e umidade. O efeito da aplicação dos inoculantes na degradação dos contaminantes e na composição da comunidade microbiana foi avaliado.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Caracterização dos inoculantes microbianos**

Os inoculantes foram produzidos conforme descrito no capítulo I. Composto não-enriquecido foi obtido pela fertilização (N e P) e incubação do composto de resíduos sólidos urbanos nas mesmas condições dos inoculantes, durante o desenvolvimento dos mesmos.

### **2.2 Caracterização do solo**

O solo foi peneirado em malha de 5 mm e analisado quanto às características físicas e químicas (Tabela 1), sendo enquadrado na classe textural de muito argiloso. Após o ajuste da umidade para 60% da CRA e da relação C:N:P para 100:10:1, o solo foi contaminado com óleo diesel ou gasolina, na proporção de 20 mL.kg<sup>-1</sup> em relação à massa seca de solo. Os contaminantes foram adicionados à superfície do solo e misturados com o auxílio de uma espátula.

Tabela 1 - Características físicas e químicas do solo utilizado para a avaliação da eficiência dos inoculantes microbianos na degradação de hidrocarbontetos

Característica	Unidade	Valor
Areia grossa	dag.kg <sup>-1</sup>	12
Areia fina	dag.kg <sup>-1</sup>	11
Silte	dag.kg <sup>-1</sup>	4
Argila	dag.kg <sup>-1</sup>	73
pH (H <sub>2</sub> O)	unidade de pH	4,8
CRA	%	48,89
C org	dag.kg <sup>-1</sup>	3,20
N total	dag.kg <sup>-1</sup>	0,06
P	mg.dm <sup>-3</sup>	0,5
K	mg.dm <sup>-3</sup>	39
Ca <sup>2+</sup>	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	0,33
Mg <sup>2+</sup>	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	0,01
Al <sup>3+</sup>	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	0,77

CRA: capacidade máxima de retenção de água; C org: carbono orgânico.

### 2.3 Efeito da concentração dos inoculantes sobre a eficiência de mineralização de hidrocarbonetos em solo contaminado com óleo diesel ou gasolina

Os inoculantes e o composto não-enriquecido foram aplicados ao solo contaminado com óleo diesel ou gasolina nas proporções de 10, 30 ou 50 g.kg<sup>-1</sup> em relação à massa seca do solo.

Na tentativa de se evitar o efeito matriz, ocasionado pela adição de mais matéria orgânica nas maiores concentrações do inoculante, quantidades proporcionais de composto esterilizado foram acrescentadas nas demais concentrações, de modo a que todos os tratamentos recebessem a mesma quantidade de composto (Tabela 2). O composto de resíduos sólidos urbanos foi esterilizado com a dose de 25 Mrad de radiação  $\gamma$  por uma fonte de <sup>60</sup>Co no Laboratório de Irradiações no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, MG.

Cada inoculante foi adicionado a 60 g de solo contaminado com óleo diesel ou gasolina. Foram realizados tratamentos-controle, um sem adição de inoculantes, para se avaliar a habilidade de degradação dos contaminantes

pela microbiota autóctone do solo. O segundo controle foi feito com a adição apenas de composto esterilizado ao solo para se verificar o efeito da adição desse condicionador de solos na degradação dos hidrocarbonetos pelas populações autóctones. Um terceiro controle foi obtido com ambos, solo e composto, esterilizados, para se determinar a perda de hidrocarbonetos por fatores abióticos. Nesses tratamentos, foram utilizados  $50 \text{ g.kg}^{-1}$  do composto esterilizado em relação à massa seca do solo. O solo foi esterilizado da mesma forma que o composto.

Tabela 2 - Doses de composto de resíduos sólidos urbanos maturado esterilizado adicionadas aos tratamentos com diferentes concentrações dos inoculantes para correção do teor de matéria orgânica

<b>Concentração do inoculante (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Complemento com composto maturado esterilizado (g.kg<sup>-1</sup>)</b>
10	40
30	20
50	0

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3, com três concentrações e três tipos de inóculos por combustível, mais os três tratamentos-controle descritos acima. Foram realizadas três repetições para cada tratamento, totalizando 36 parcelas. Cada parcela consistiu de um frasco respirométrico de 750 mL, o qual foi acoplado a um respirômetro dotado de um detector de CO<sub>2</sub> por infravermelho, com fluxo intermitente de ar (Sable System, NE, USA). A variação de temperatura durante os ensaios respirométricos foi monitorada. Na tabela 3, estão representados os tratamentos realizados durante o experimento.

Tabela 3 - Tratamentos realizados no ensaio respirométrico para determinação da concentração mais adequada de inoculante a ser adicionada ao solo contaminado com óleo diesel ou gasolina

Tratamento	Óleo diesel	Gasolina	Concentrações do inóculo
Inoculante A	AD	AG	10, 30 ou 50 g.kg <sup>-1</sup>
Inoculante B	BD	BG	10, 30 ou 50 g.kg <sup>-1</sup>
Composto não-enriquecido	C	C	10, 30 ou 50 g.kg <sup>-1</sup>
Solo	Solo	Solo	0
Composto esterilizado + solo	Ce+S	Ce+S	50 g.kg <sup>-1</sup>
Composto esterilizado + solo esterilizado	Ce+Se	Ce+Se	50 g.kg <sup>-1</sup>

#### 2.4 Efeito do armazenamento sobre a eficiência dos inoculantes microbianos na degradação de hidrocarbonetos do óleo diesel ou gasolina no solo

Os inoculantes e o composto não-enriquecido foram armazenados à temperatura ambiente e sob refrigeração (6 a 8 °C). Após 97 e 103 dias de armazenamento dos inoculantes do óleo diesel e da gasolina, respectivamente, foram realizados ensaios respirométricos, utilizando-se a concentração de 30 g.kg<sup>-1</sup> de inoculante em relação à massa seca do solo. As mesmas condições do item 2.3 foram utilizadas para análise da produção de CO<sub>2</sub>. Além dos tratamentos com adição dos inoculantes e do composto não-enriquecido, um tratamento sem a adição de inóculo no solo foi avaliado. O delineamento foi o de blocos casualizados, com esquema fatorial de 3x2, sendo três tipos de inóculos por combustível e duas temperaturas de armazenamento, mais o tratamento sem inoculação (tratamento-solo). Os tratamentos foram conduzidos com três repetições, perfazendo um total de 21 parcelas por combustível. Na tabela 4, estão representados os tratamentos realizados para ambos os combustíveis.

Tabela 4 - Tratamentos empregados na avaliação da eficiência dos inoculantes microbianos em degradar hidrocarbonetos no solo contaminado com óleo diesel ou gasolina após armazenamento em temperatura ambiente e sob refrigeração

Tratamento	Temperatura ambiente	Temperatura de refrigeração
Inoculante A	AG amb ou AD amb	AG 8 °C ou BG 8 °C
Inoculante B	BG amb ou BD amb	BG 8 °C ou BD 8 °C
Composto não-enriquecido	C amb	C 8 °C
Solo	Solo	-

AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina; AD: inoculante A do óleo diesel; BD: inoculante B do óleo diesel.

## 2.5 Análises dos inoculantes e do solo

Enumeração das populações bacterianas cultiváveis, avaliação da diversidade microbiana e análise de hidrocarbonetos totais do petróleo foram realizadas nos inoculantes e composto não-enriquecido após o armazenamento em diferentes temperaturas e no solo ao término dos ensaios respirométricos.

### 2.5.1 Enumeração de populações bacterianas cultiváveis

Para a contagem das bactérias heterotróficas, 10 g de cada amostra foram diluídos em 95 mL de pirofosfato de sódio a 0,1% (massa/volume). Após agitação a 200 rpm por 20 min, foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento de 0,1 mL em placas contendo ágar nutriente. Para inibir o crescimento de fungos, foi adicionada ciclohexamida ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ao meio. As placas foram mantidas a 30 °C até a contagem das colônias formadas na superfície do meio de cultura.

## 2.5.2 Análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)

### 2.5.2.1 Identificação de bactérias dominantes pelo sistema de identificação microbiano (MIDI)

Os extratos de FAME de colônias de morfotipos mais abundantes no solo, obtidos com o kit Instante Fame, foram analisados por cromatografia gasosa, utilizando-se o sistema Sherlock da Microbial Identification System® (MIDI, Newark, DE, EUA). A identificação foi realizada por meio da comparação do perfil dos ácidos graxos de cada isolado com os da biblioteca de referência ITSA 1.0®

### 2.5.2.2 Avaliação da diversidade microbiana pela análise de ésteres metílicos de ácidos graxos ligados por ligação éster (EL-FAME)

Primeiramente, foi desenvolvido um método para a remoção dos hidrocarbonetos dos combustíveis antes da extração dos ácidos graxos. Para isso, em cada amostra com 1 g de massa fresca, foram adicionados 3 mL de água destilada esterilizada e 1 mL de hexano. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 544 g por 15 minutos. A seguir, a camada de hexano contendo os hidrocarbonetos foi removida, seguindo-se a remoção da água. A água foi utilizada somente para a visualização das fases distintas, composto, água e hexano. Esse processo foi repetido três vezes.

Para extração dos ácidos graxos foi utilizado o método EL-FAME, como descrito por SCHUTTER e DICK (2000), com modificações. Foi realizada uma redução de 1/3 do volume dos reagentes e da amostra. Na última etapa do processo, o solvente, contendo os FAME, foi evaporado em estufa a vácuo até secagem completa e o resíduo foi ressuspenso em 0,5 mL do solvente de corrida. Em seguida, as amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás Agilent Technologies 7890. A identificação dos ácidos graxos foi feita pelo sistema Sherlock da Microbial Identification System® (MIDI, Newark, DE, EUA), utilizando-se os métodos de referência ITSA, IR2A ou RTSBA. Os ácidos

graxos marcadores dos grupos microbianos analisados estão representados na tabela 5. A partir dos dados obtidos nos cromatogramas, foi calculada a proporção relativa de cada marcador específico em relação ao total de marcadores analisados.

Tabela 5 - Ácidos graxos marcadores usados na determinação dos grupos microbianos presentes no solo após os ensaios respirométricos

Ácidos graxos marcadores	Grupo de microrganismo	Fonte
17:1w8c; 16:1w5c	Bactérias gram-negativas	Klamer e Baath (1998), Kato e Miura (2008)
i/a15:00; i16:00; i/a17:00	Bactérias gram-positivas	Klamer e Baath (1998), Kato e Miura (2008)
10Me17:00; 10Me18:0	Actinomicetos	Klamer e Baath (1998), Steger et al. (2005), Kato e Miura (2008)
18:1w9c	Fungos	Klamer e Baath (1998), Steger et al. (2007)

### 2.5.3 Análises cromatográficas

A extração de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) do solo contaminado com óleo diesel foi realizada em extrator soxhlet, segundo o método 3540C (EPA, 1996). Para isso, utilizaram-se 2 g de solo e 200 mL dos solventes hexano e acetona (1:1). O período de extração foi de 6 horas. Os extratos foram analisados em cromatógrafo a gás (QP 5000) acoplado a espectrômetro de massa (Shimadzu®, modelo 17-A), utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-1 (30m x 0,25 mm x 0,25 µm), nas seguintes condições: temperatura inicial de 40°C (2 min), rampa de aquecimento de 8°C min<sup>-1</sup> até 240°C. A temperatura do injetor foi de 260°C e do detector 280°C. O fluxo do gás hélio foi de 1 mL min<sup>-1</sup> e o modo de injeção foi *splitless*.

As análises cromatográficas foram realizadas apenas para o solo contaminado com óleo diesel, uma vez que não foi encontrado método adequado para a extração da gasolina do solo. Os métodos testados para análise de benzeno, tolueno e xileno (BTX) da gasolina não se mostraram

precisos. A porcentagem de degradação de TPH foi calculada pela diferença entre as áreas das amostras contaminadas no tempo zero e as amostras analisadas após os ensaios respirométricos.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Determinação da concentração dos inoculantes a ser adicionada ao solo contaminado com óleo diesel ou gasolina

Nos ensaios respirométricos, verificou-se interação entre a concentração e o tipo de inóculo adicionado ao solo contaminado com gasolina. Os tratamentos com a maior concentração dos inoculantes AG e BG ( $50 \text{ g.kg}^{-1}$ ) apresentaram a maior evolução de  $\text{CO}_2$ . Para o composto não-enriquecido (tratamento C) resposta inversa foi observada: quanto maior a concentração no solo, menor foi a evolução de  $\text{CO}_2$  (Figura 1 A). No solo contaminado com óleo diesel, foi verificado apenas o efeito do tipo de inóculo, sendo que os tratamentos com os inoculantes AD e BD apresentaram maior evolução de  $\text{CO}_2$  do que os tratamentos com composto não-enriquecido, independentemente da dose utilizada (Figura 2 A).

No tratamento-solo (sem inoculação) do óleo diesel, a resposta dos microrganismos autóctones foi acentuada, não diferindo dos tratamentos com adição dos inoculantes AD ou BD ou do composto não-enriquecido ao solo (Figura 2 B). No solo contaminado com gasolina, houve efeito positivo da introdução de microrganismos alóctones previamente selecionados, sendo maior a evolução de  $\text{CO}_2$  nos tratamentos com adição dos inoculantes AG e BG (Figura 2 A). O tratamento com composto e solo esterilizados (Ce+Se) apresentou considerável evolução de  $\text{CO}_2$  para ambos os combustíveis (Figura 2).

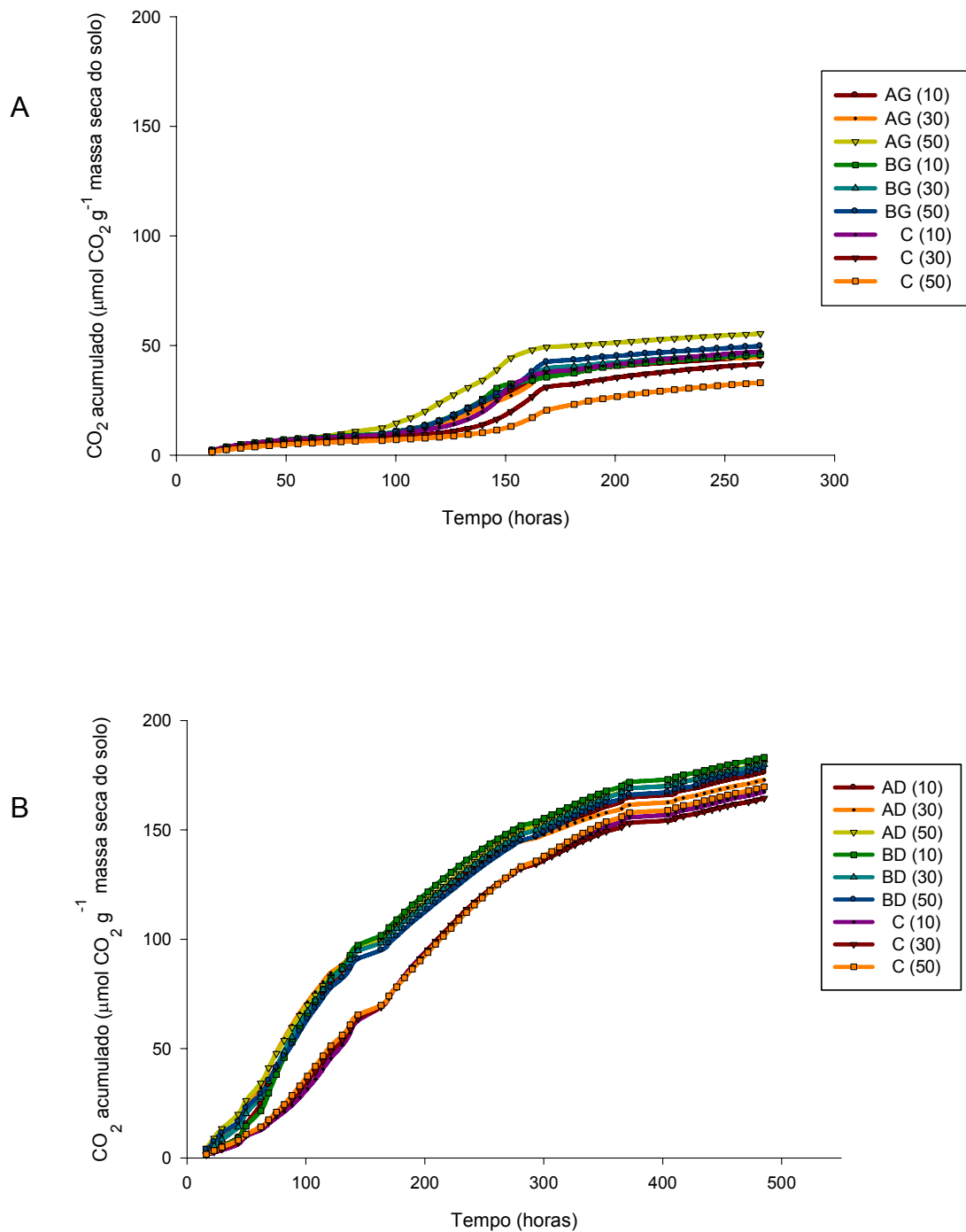


Figura 1 - Produção de  $\text{CO}_2$  acumulado durante ensaio respirométrico para determinação da concentração dos inoculantes a ser adicionada ao solo contaminado. As concentrações dos inoculantes e do composto não-enriquecido adicionadas ao solo foram de 10, 30 ou 50  $\text{g.kg}^{-1}$  com relação à massa seca do mesmo. A) Gasolina. B) Óleo diesel. AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina; C: composto não-enriquecido; AD: inoculante A do óleo diesel; BD: inoculante B do óleo diesel.

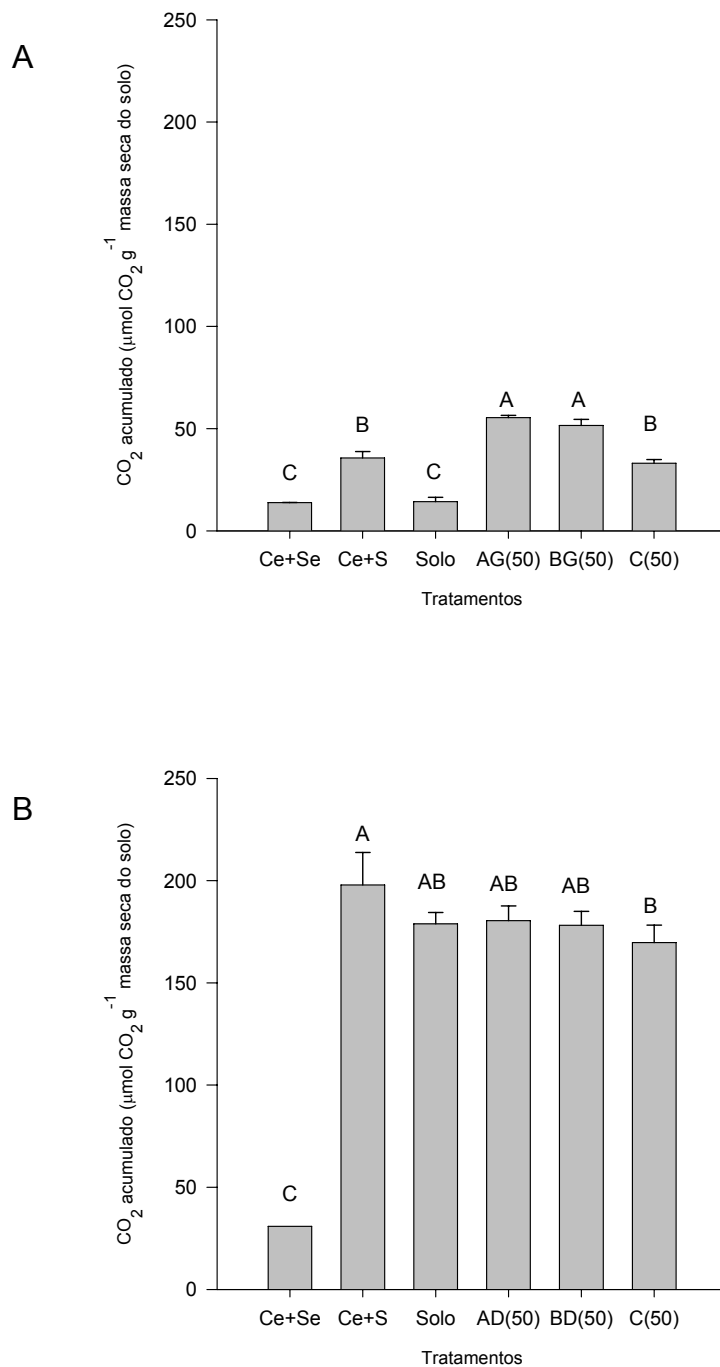


Figura 2 - Produção de CO<sub>2</sub> acumulado dos diferentes tratamentos empregados durante ensaio respirométrico para determinação da concentração de inoculante a ser adicionado ao solo. A) Gasolina, 266 h de incubação. B) Óleo diesel, 485 h de incubação. Ce: composto esterilizado; Se: solo esterilizado; S: solo; AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina; C: composto não-enriquecido; AD: inoculante A do óleo diesel; BD: inoculante B do óleo diesel. As médias dos tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem entre si a de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O tratamento com adição de composto esterilizado ao solo contaminado com gasolina (Ce+S) exibiu um valor de evolução de CO<sub>2</sub> semelhante ao do solo adicionado de composto não-enriquecido (Figura 2 A). O tratamento Ce+S foi o que apresentou a maior evolução de CO<sub>2</sub> dentre os tratamentos aplicados ao solo contaminado com óleo diesel (Figura 2 B).

Durante os ensaios respirométricos, as temperaturas mínima e máxima registradas para o solo contaminado com óleo diesel foram de 19 e 30 °C, e para o solo contaminado com gasolina, essas temperaturas foram de 22 e 30 °C.

Houve interação entre a concentração e o tipo de inóculo aplicado ao solo contaminado com óleo diesel em relação ao teor residual de TPH no solo (Tabela 6). As maiores porcentagens de degradação de TPH, independentemente do tipo de inóculo, foram obtidas nos tratamentos em que foi aplicada a dose de 30 g.kg<sup>-1</sup> dos inoculantes e do composto não-enriquecido (Tabela 6). Apenas na concentração de 50 g.kg<sup>-1</sup>, a degradação de TPH foi superior no solo com aplicação dos inoculantes AD e BD em relação ao solo que recebeu composto não-enriquecido (Tabela 6).

Tabela 6 - Porcentagem de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) em solo contaminado com óleo diesel após aplicação dos inoculantes AD, BD ou do composto não-enriquecido em diferentes concentrações, 10, 30 ou 50 g.kg<sup>-1</sup>. As médias dos tratamentos, dispostas nas linhas da tabela, seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<b>Concentração</b>	<b>Composto não-enriquecido</b>	<b>Inoculante AD</b>	<b>Inoculante BD</b>
10 g.kg <sup>-1</sup>	96,01 ± 0,17 B	96,86 ± 1,23 AB	99,00 ± 0,55 AB
30 g.kg <sup>-1</sup>	99,43 ± 0,69 A	98,32 ± 0,67 A	99,40 ± 0,10 A
50 g.kg <sup>-1</sup>	87,01 ± 0,80 C	89,66 ± 1,64 B	94,94 ± 1,09 A

O tratamento com adição do inoculante BD foi o que apresentou a maior porcentagem de degradação de TPH, quando comparado com o solo não inoculado, ou seja, o tratamento-solo (Tabela 7). Não houve diferença significativa entre os tratamentos com aplicação do inoculante AD ou do composto não-enriquecido e o tratamento-solo (Tabela 7). Esse resultado

diferiu dos obtidos pela análise respirométrica, segundo a qual a maior evolução de CO<sub>2</sub> foi obtida no tratamento Ce+S (Figura 2 B). De acordo com os dados de TPH, esse tratamento, juntamente, com o Ce+Se, foi o que apresentou a menor porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos aplicados ao solo (Tabela 7).

Tabela 7 - Porcentagem de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) nos diferentes tratamentos aplicados para a determinação da concentração adequada de inoculante a ser adicionado ao solo contaminado com óleo diesel. As médias dos tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tratamento	Remoção de TPH (%)
Inoculante B (50 g.kg <sup>-1</sup> )	94,94 ± 1,09 A
Inoculante A (50 g.kg <sup>-1</sup> )	89,65 ± 1,64 AB
Controle (50 g.kg <sup>-1</sup> )	87,00 ± 0,80 AB
Solo	80,65 ± 3,35 B
Ce + S	46,85 ± 3,21 C
Ce + Se	38,88 ± 0,00 C

Os tratamentos com adição dos inoculantes AG e BG ao solo contaminado com gasolina apresentaram maior contagem de bactérias heterotróficas do que o solo que recebeu o composto não-enriquecido (Figura 3 A). Os tratamentos com o inoculante BG apresentaram aumento das populações bacterianas em função da dose utilizada (Figura 3 A). No tratamento-solo, não foi possível realizar a contagem de bactérias, dada à predominância de fungos.

No solo contaminado com óleo diesel, um padrão diferente foi observado, uma vez que o tratamento C e o Ce+S apresentaram maior contagem de bactérias do que os tratamentos que receberam os inoculantes (Figura 3 B).

Os tratamentos com adição de composto e solo esterilizados, Ce+S e Ce+Se, tiveram contagem considerável de bactérias (Figura 3). As colônias formadas nesses tratamentos foram identificadas como pertencentes ao filo

Actinobacteria por características morfológicas e tintoriais através da coloração de Gram (dados não-mostrados).

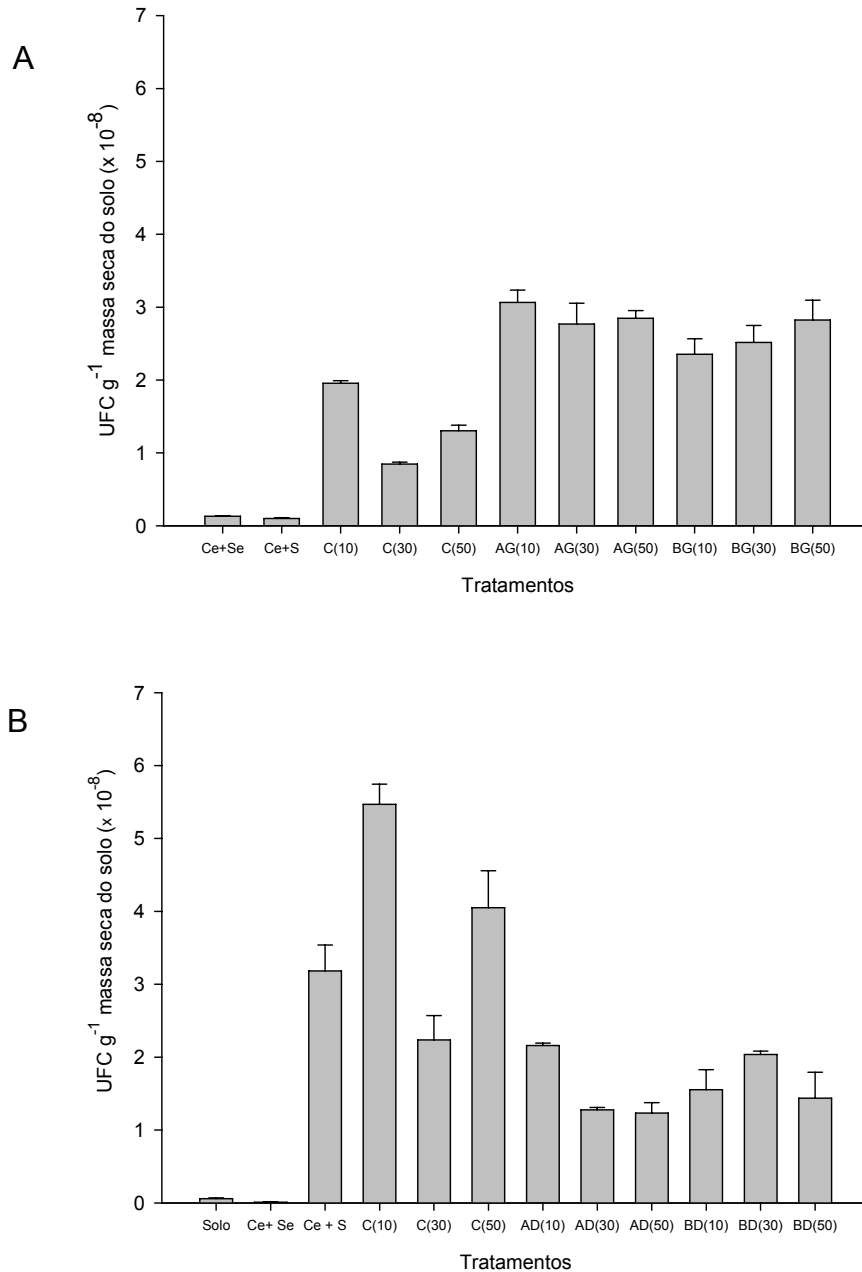


Figura 3 - Contagem de bactérias heterotróficas após aplicação dos inoculantes e do composto não-enriquecido ao solo contaminado com gasolina (A) ou óleo diesel (B) em diferentes concentrações, 10, 30 ou 50 g.kg<sup>-1</sup>. Ce: composto esterilizado; Se: solo esterilizado; S: solo; C: composto não-enriquecido; AD: inoculante A do óleo diesel; BD: inoculante B do óleo diesel; AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina.

Essas bactérias, por produzirem esporos, tendem a ser mais resistentes à radiação gama (KALAKOUTSKIIP e AGRE, 1976), havendo assim necessidade de doses mais elevadas de radiação para serem eliminadas. Conclui-se, portanto, que a dose de radiação gama utilizada neste estudo não foi suficiente para esterilizar o solo e o composto de resíduos sólidos urbanos.

Durante a contagem de bactérias heterotróficas do solo contaminado com gasolina ou óleo diesel, verificou-se que algumas colônias eram predominantes e apresentavam características morfológicas similares às encontradas nos inoculantes antes de sua aplicação ao solo. Quatro isolados bacterianos dominantes foram identificados pelo sistema de identificação microbiano – MIDI (Tabela 8). Todos os isolados são pertencentes ao gênero *Bacillus*, comumente encontrado tanto em composto de resíduos sólidos urbanos como em solos.

Tabela 8 - Bactérias heterotróficas cultiváveis dominantes em solo contaminado com gasolina ou óleo diesel após a aplicação dos inoculantes microbianos

Espécie	Índice de similaridade
<i>Bacillus licheniformis</i> GC subgrupo A	0,756
<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>	0,522
<i>Bacillus subtilis</i> GC subgrupo B ou	0,511
<i>Bacillus licheniformis</i> GC subgrupo A	0,493
<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>	0,476

No tratamento-solo da gasolina, verificou-se o predomínio de ácidos graxos marcadores de bactérias gram-positivas, em relação aos de fungos e actinomicetos e os marcadores de gram-negativas não foram detectados (Figura 4). Os marcadores para bactérias gram-negativas foram encontrados no solo inoculado com composto não-enriquecido (C) ou com os inoculantes AG (10 g.kg<sup>-1</sup>) e BG (50 g.kg<sup>-1</sup>), ainda que em baixa proporção relativa quando comparados com os marcadores dos demais grupos (Figura 4). No solo inoculado, o marcador de fungos apresentou a maior proporção relativa, sendo provavelmente reflexo da sua predominância no composto originalmente

empregado neste estudo. O maior efeito da inoculação sobre o perfil de ácidos graxos do solo foi a redução dos marcadores para actinomicetos e o aumento dos de fungos (Figura 4).

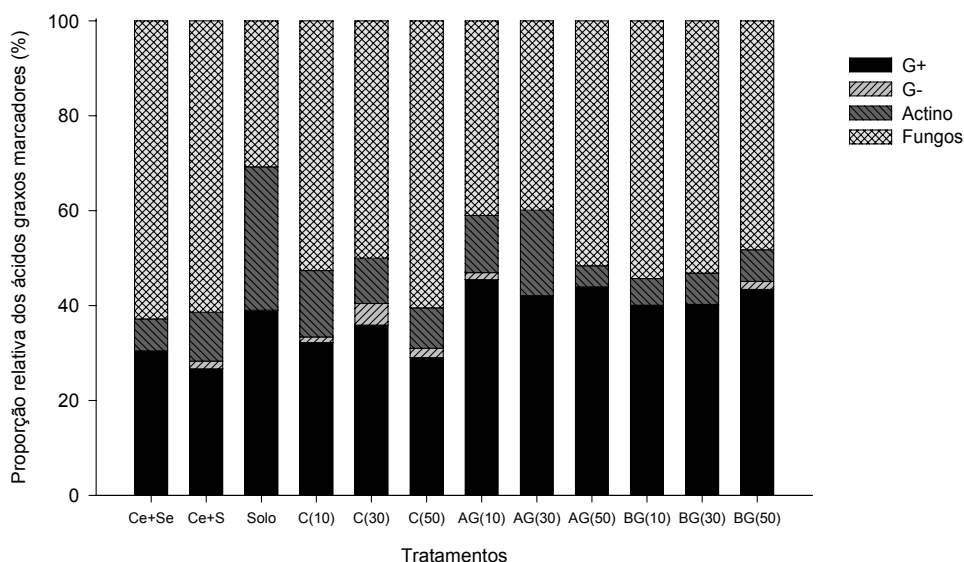


Figura 4 - Proporção relativa dos ácidos graxos marcadores para os grupos microbianos do solo contaminado com gasolina após aplicação dos inoculantes e do composto não-enriquecido em diferentes concentrações, 10, 30 ou 50 g.kg<sup>-1</sup>. G+: bactérias gram-positivas; G-: bactérias gram-negativas; actino: actinomicetos; Ce: composto esterilizado; Se: solo esterilizado; C: composto não-enriquecido; AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina.

Quanto ao perfil de ácidos graxos totais do solo, a disposição dos tratamentos, pela análise de componente principal (PCA), foi influenciada pelo tipo de inóculo adicionado ao solo (Figura 5). No grupo I, foram agrupadas as amostras do tratamento-solo, que apresentou um perfil de ácidos graxos distinto dos demais tratamentos, nos quais houve a inoculação do solo. No grupo II, agruparam-se os tratamentos com adição, ao solo, do composto esterilizado (Ce+Se e Ce+S). Os tratamentos com aplicação do composto não-enriquecido ao solo ficaram reunidos no grupo III e no grupo IV, foram agrupados os tratamentos com adição dos inoculantes AG e BG ao solo.

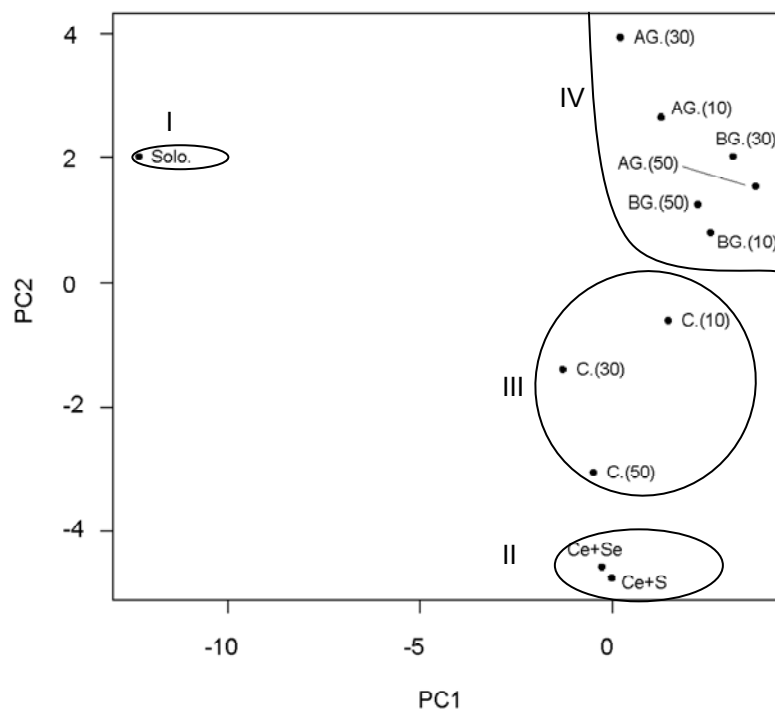


Figura 5 - Análise de componentes principais dos perfis de ácidos de solo contaminado com gasolina em resposta à aplicação de inoculantes e de composto não-enriquecido. Ce: solo inoculado com composto esterilizado; Se: solo esterilizado; S: solo; C: solo inoculado com composto não-enriquecido; AG: solo inoculado com inoculante tipo A; BG: solo inoculado com inoculante tipo B. Grupo I – amostras de solo sem adição de inóculo; Grupo II – amostras de solo com adição do composto esterilizado; Grupo III – amostras de solo com adição do composto não-enriquecido; Grupo IV – solo com adição dos inoculantes AG e BG.

A adição do composto esterilizado, dos inoculantes AG e BG e do composto não-enriquecido resultou em aumento do número de ácidos graxos encontrados no solo (Tabela 9). A maioria desses ácidos graxos foi proveniente do composto original, com exceção do 16:0 anteiso, 17:0 ciclo, 17:0 2OH e 20:1w9c.

Tabela 9 - Ácidos graxos encontrados no solo após a aplicação do composto esterilizado, composto não-enriquecido, inoculantes AG ou BG que não estavam presentes no solo não inoculado. Os ácidos graxos grifados não estão presentes no composto originalmente utilizado neste estudo.

Composto esterilizado	Composto não-enriquecido	Inoculante AG	Inoculante BG
16:0 2OH	14:0	15:0 iso 3OH	15:0 iso 3OH
16:1 iso H	<b>16:0 anteiso</b>	16:0 2OH	16:0 2OH
16:1w5c	16:0 2OH	16:1w5c	16:1w5c
17:0	16:1w5c	17:0	17:0
<b>17:0 ciclo</b>	<b>17:0 ciclo</b>	<b>17:0 ciclo</b>	<b>17:0 ciclo</b>
17:1w8c	17:0	<b>17:0 2OH</b>	<b>17:0 2OH</b>
18:1w5c	17:1w8c	18:1w5c	18:1w5c
19:0 iso	18:1w5c	19:0 iso	19:0 iso
20:1w7c	19:0 iso	20:1w7c	20:1w7c
<b>20:1w9c</b>	20:1w7c	20:4w6,9,12,15c	<b>20:1w9c</b>
20:4w6,9,12,15c	<b>20:1w9c</b>		20:4w6,9,12,15c
	20:4w6,9,12,15c		

### 3.2 Efeito da temperatura de armazenamento sobre as populações bacterianas cultiváveis e sobre o perfil de ácidos graxos dos inoculantes

A temperatura de refrigeração foi mais adequada para a manutenção da viabilidade das populações bacterianas cultiváveis presentes nos inoculantes do óleo diesel e da gasolina (Figura 6). Os inoculantes apresentaram maior contagem de bactérias do que o composto não-enriquecido, principalmente os inoculantes A. Esse resultado é similar ao obtido antes do armazenamento (Figura 6). Nos inoculantes da gasolina, ocorreu maior redução das populações bacterianas cultiváveis após o armazenamento, enquanto que nos inoculantes do óleo diesel, armazenados sob refrigeração, a contagem de bactérias se manteve próxima da obtida anteriormente ao armazenamento (Figura 6).

Após o armazenamento, houve redução na proporção relativa dos ácidos graxos marcadores de bactérias gram-positivas e aumento dos marcadores de fungos e de actinomicetos nos inoculantes AG e BG e no composto não-enriquecido (Figura 7). A proporção relativa dos marcadores para bactérias gram-negativas se manteve constante no inoculante AG e diminuiu no inoculante BG e no composto não-enriquecido (Figura 7). Pouca variação das proporções relativas dos ácidos graxos marcadores dos grupos

microbianos foi observada entre as diferentes temperaturas de armazenamento.

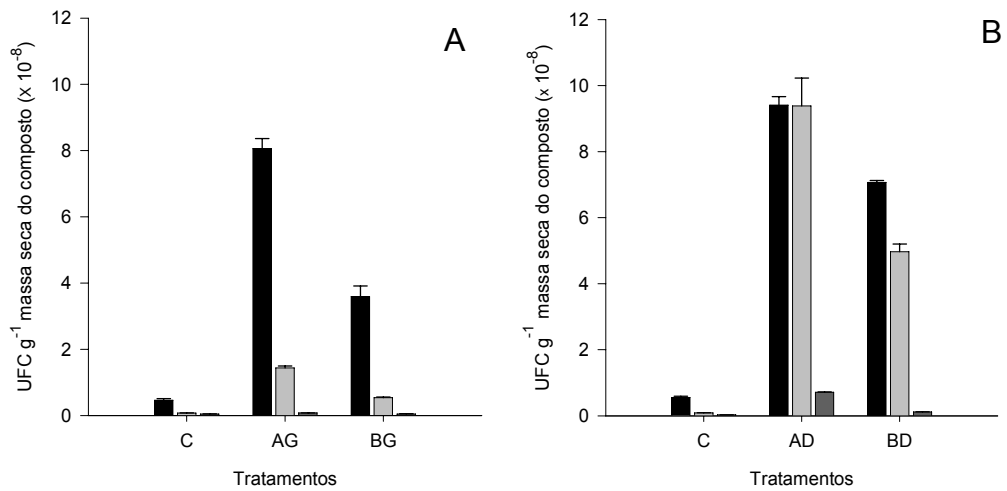


Figura 6 - Contagem de bactérias heterotróficas dos inoculantes após armazenamento em diferentes temperaturas. A barra preta corresponde à contagem de bactérias heterotróficas antes do armazenamento dos inoculantes; a barra cinza mais clara corresponde à contagem de bactérias heterotróficas após o armazenamento sob refrigeração (6 - 8 °C) e a barra cinza escura corresponde à contagem de bactérias heterotróficas após armazenamento em temperatura ambiente. A) Gasolina. B) Óleo diesel. C: composto não-enriquecido; AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina; AD: inoculante A do óleo diesel; BD: inoculante B do óleo diesel.

Os perfis de ácidos graxos totais dos inoculantes e do composto não-enriquecido apresentaram alterações após o armazenamento em ambas as temperaturas (Figura 8). Os perfis de ácidos graxos das amostras após o armazenamento em temperatura ambiente e sob refrigeração foram mais similares entre si do que com as amostras antes do armazenamento (Figura 8). Ocorreu também mudança nos perfis de ácidos graxos de uma mesma amostra armazenada em temperaturas diferentes (Figura 8).

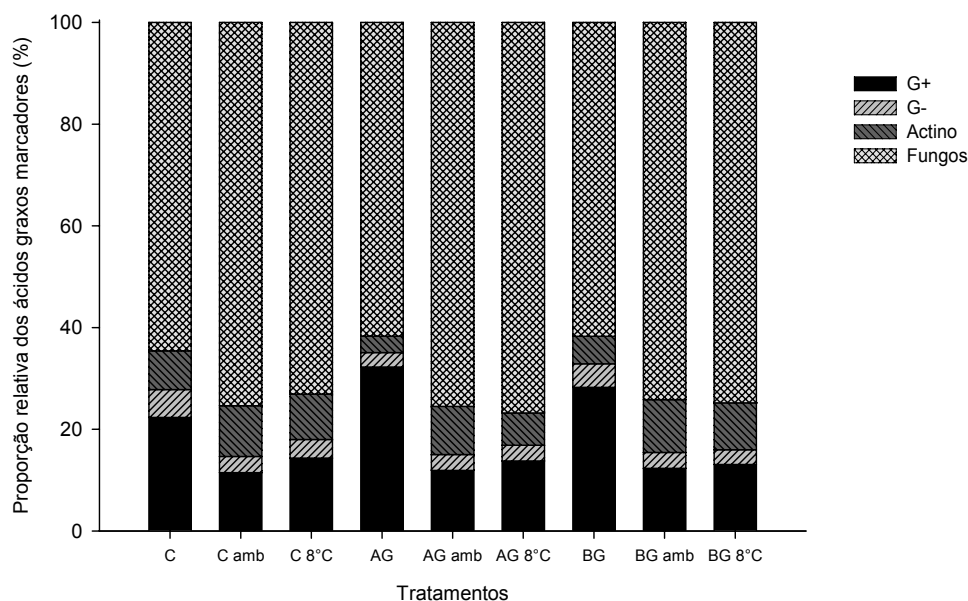


Figura 7 - Proporção relativa dos ácidos graxos marcadores para os grupos microbianos dos inoculantes da gasolina e do composto não-enriquecido antes e após o armazenamento, durante 103 dias, em temperatura ambiente (amb) e sob refrigeração (8 °C). G+: bactérias gram-positivas; G-: bactérias gram-negativas; actino: actinomicetos; C: composto não-enriquecido; AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina. Os tratamentos C, AG e BG referem-se ao perfil de ácidos graxos do composto não-enriquecido e dos inoculantes A e B antes do armazenamento.

Alterações na composição e na abundância dos ácidos graxos dos inoculantes AG e BG e do composto não-enriquecido foram observadas após o armazenamento. O número de ácidos graxos totais reduziu, sendo esse decréscimo mais acentuado para o composto não-enriquecido armazenado sob refrigeração (de 41 para 29) e em temperatura ambiente (de 41 para 30). Os inoculantes, mesmo antes do armazenamento, apresentaram menor número de ácidos graxos totais do que o composto não-enriquecido, 35 para ambos os inoculantes. Isso ocorreu principalmente devido à redução do número de ácidos graxos de cadeia entre 10 e 16 carbonos, sendo um possível efeito da adição de gasolina ao composto. Os inoculantes armazenados sob refrigeração apresentaram maior número de ácidos graxos totais do que os mantidos em temperatura ambiente.

Os principais efeitos do armazenamento para todos os inóculos, independentemente da temperatura utilizada, foram: a diminuição do número e

da quantidade de ácidos graxos de cadeia entre 10 e 16 carbonos e o aumento da abundância de ácidos graxos de cadeia entre 17 e 20 carbonos.

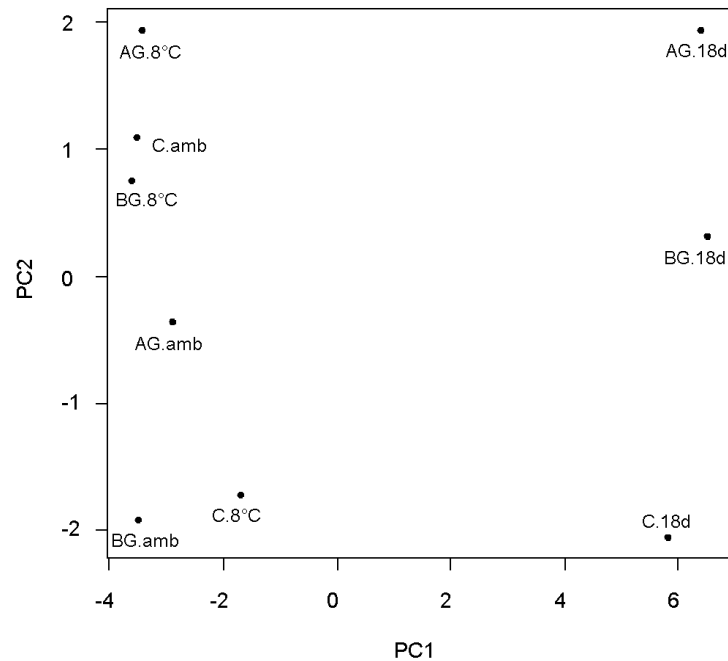


Figura 8 - Análise de componentes principais (PCA) dos perfis de ácidos graxos dos inoculantes da gasolina antes (18d) e após o armazenamento em temperatura ambiente (amb) e sob refrigeração (8 °C). C: composto não-enriquecido; AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina. O 18d indica o final do desenvolvimento dos inoculantes, que ocorreu no décimo oitavo dia de incubação do composto.

### 3.3 Efeito do armazenamento sobre a eficiência dos inoculantes na degradação dos hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel ou da gasolina

Os resultados de emissão de CO<sub>2</sub> de solos contaminados com gasolina ou óleo diesel demonstraram a existência de interação entre o tipo de inóculo adicionado ao solo e a temperatura em que esse foi armazenado. Com o desdobramento dessa interação, verificou-se que, no solo contaminado com gasolina ocorreu maior evolução de CO<sub>2</sub> quando os inóculos foram

armazenados sob refrigeração. Porém, o efeito da adição dos inoculantes AG e BG sobre a degradação de gasolina, ou seja, maior evolução de CO<sub>2</sub> que o solo com adição do composto não-enriquecido, ocorreu somente quando os inoculantes foram armazenados em temperatura ambiente (Tabela 10).

Tabela 10 - Produção de CO<sub>2</sub> acumulado ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1}$  de massa seca do solo) de solo contaminado com gasolina ou óleo diesel após aplicação dos inoculantes e do composto não-enriquecido armazenados em diferentes temperaturas. As médias dos tratamentos, dispostas nas linhas da tabela, seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina; AD: inoculante A do óleo diesel; BD: inoculante B do óleo diesel; C: composto não-enriquecido.

Temperatura/Tratamento*	Solo	AG	BG	C
Ambiente (amb)	36,95 C	61,21 A	59,48 A	53,02 B
Refrigeração (6-8 °C)		72,9 AB	65,87 B	66,52 AB
Temperatura/Tratamento*	Solo	AD	BD	C
Ambiente (amb)	163,25 C	189,43 AB	198,18 AB	181,45 B
Refrigeração (6-8 °C)		200,01 A	202,07 A	181,12 B

\* Foi aplicada a concentração de 30 g.kg<sup>-1</sup> dos inoculantes e do composto não-enriquecido ao solo contaminado com 20 mL.kg<sup>-1</sup> de gasolina ou óleo diesel. Os inoculantes do óleo diesel foram armazenados durante 97 dias; os inoculantes da gasolina foram armazenados durante 103 dias. O ensaio respirométrico teve duração de 549 h para o solo contaminado com óleo diesel e 685 h para o solo contaminado com gasolina. A variação da temperatura foi de 21 a 32 °C.

Não houve diferença significativa entre a evolução de CO<sub>2</sub> do solo com a adição dos inoculantes AG e BG e do composto não-enriquecido armazenados sob refrigeração (Tabela 10). Porém, o solo inoculado apresentou evolução de CO<sub>2</sub> maior que o tratamento-solo, independentemente do tipo de inóculo e da temperatura de armazenamento (Tabela 10).

No solo contaminado com óleo diesel, o oposto foi verificado, o efeito da adição dos inoculantes AD e BD ocorreu somente quando esses foram armazenados sob refrigeração (Tabela 10). Apenas o tratamento com aplicação do inoculante AD apresentou diferenças na evolução de CO<sub>2</sub> em resposta à temperatura de armazenamento, havendo maior degradação do

óleo diesel, quando esse inoculante foi armazenado sob refrigeração antes de ser aplicado ao solo.

De acordo com a análise de TPH residuais no solo contaminado com óleo diesel, houve interação entre o tipo de inóculo adicionado ao solo e a temperatura em que o mesmo foi armazenado. O solo com aplicação do inoculante AD foi o tratamento que apresentou maior degradação de TPH em ambas as temperaturas de armazenamento. Contudo, quando o armazenamento foi em temperatura ambiente, o teor de TPH residual no solo com o inoculante AD não diferiu do encontrado no solo com composto não-enriquecido e no tratamento-solo (Tabela 11). Os microrganismos autóctones do solo mostraram-se aptos a degradar os hidrocarbonetos do óleo diesel, atingindo uma porcentagem de degradação de TPH de 84,84% (Tabela 11).

Tabela 11 - Porcentagem de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) em solo contaminado com óleo diesel após aplicação dos inoculantes ou do composto não-enriquecido armazenados em diferentes temperaturas. As médias dos tratamentos, dispostas nas linhas da tabela, seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina; AD: inoculante A do óleo diesel; BD: inoculante B do óleo diesel; C: composto não-enriquecido.

Temperatura/ Tratamento	Solo	AD	BD	C
<b>Ambiente</b>	84,84 ± 2,14 B	96,55 ± 0,66 AB	66,66 ± 4,21 C	91,66 ± 2,13 AB
<b>Refrigeração (6-8°C)</b>		98,14 ± 0,61 A	84,29 ± 2,42 B	78,32 ± 2,98 B

Os tratamentos com adição dos inoculantes AG e BG apresentaram maior contagem de bactérias cultiváveis no solo contaminado com gasolina independentemente da temperatura de armazenamento. O tratamento-solo apresentou a menor concentração de bactérias cultiváveis (Figura 9). No tratamento-solo da gasolina, houve menor contagem de bactérias heterotróficas em relação ao tratamento-solo do óleo diesel, o que pode indicar efeito tóxico do primeiro combustível sobre as populações bacterianas cultiváveis (Figura 9).

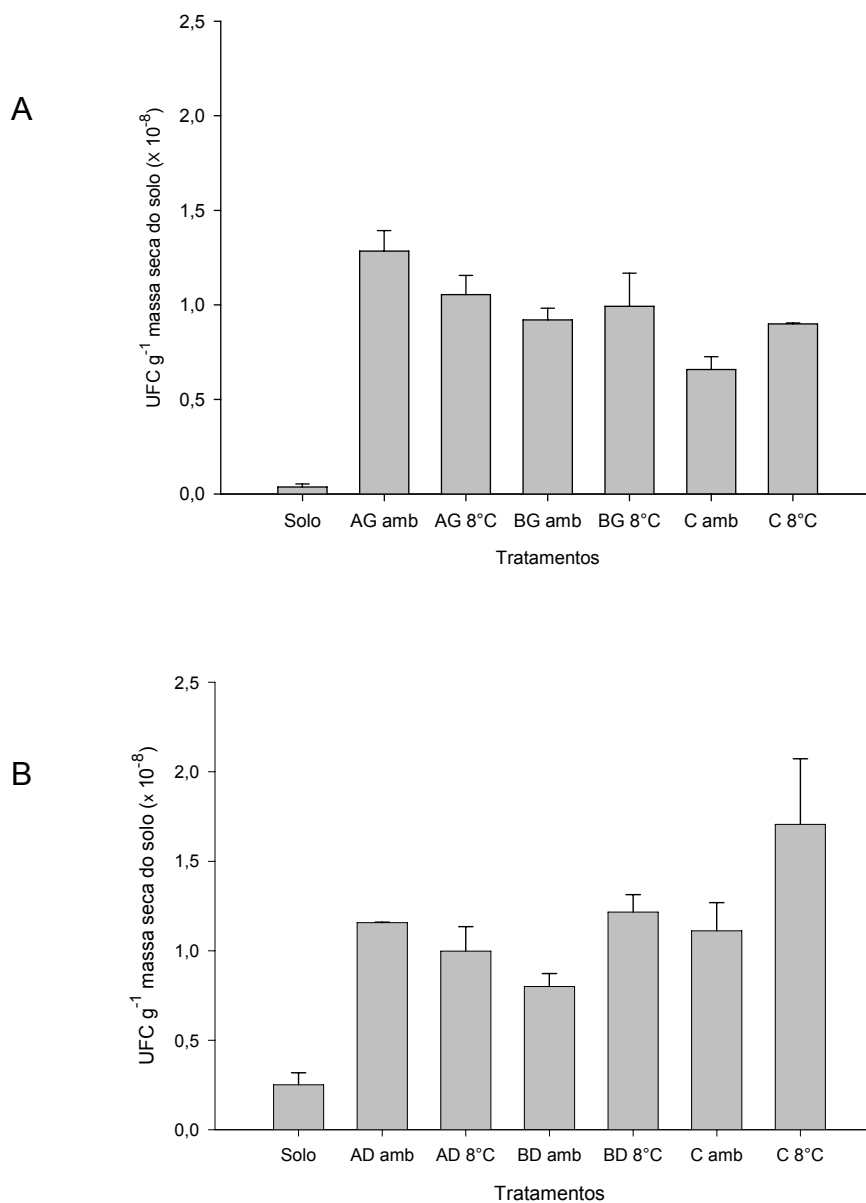


Figura 9 - Contagem de bactérias heterotróficas do solo contaminado com gasolina (A) ou óleo diesel (B) após aplicação dos inoculantes e do composto não-enriquecido armazenados em temperatura ambiente (amb) ou sob refrigeração (8 °C). AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina; AD: inoculante A do óleo diesel; BD: inoculante B do óleo diesel; C: composto não-enriquecido.

Nos tratamentos com óleo diesel, a maior contagem de bactérias cultiváveis foi observada no solo que recebeu o composto não-enriquecido armazenado sob refrigeração, seguido dos tratamentos com os inoculantes AD, BD ou com o composto não-enriquecido armazenado em temperatura ambiente, que exibiram resultados similares (Figura 9 B).

No tratamento-solo, houve predominância dos ácidos graxos marcadores de bactérias gram-positivas (Figura 10) e os marcadores de gram-negativas utilizados neste estudo não foram encontrados. Nos demais tratamentos, foram detectados os ácidos graxos marcadores de bactérias gram-negativas, houve aumento da proporção relativa do marcador de fungos e diminuição dos marcadores das gram-positivas. A proporção relativa dos ácidos graxos marcadores de actinomicetos foi maior nos tratamentos com aplicação dos inoculantes AG e BG e do composto não-enriquecido que foram armazenados sob refrigeração, concomitantemente com a diminuição do marcador de fungos.

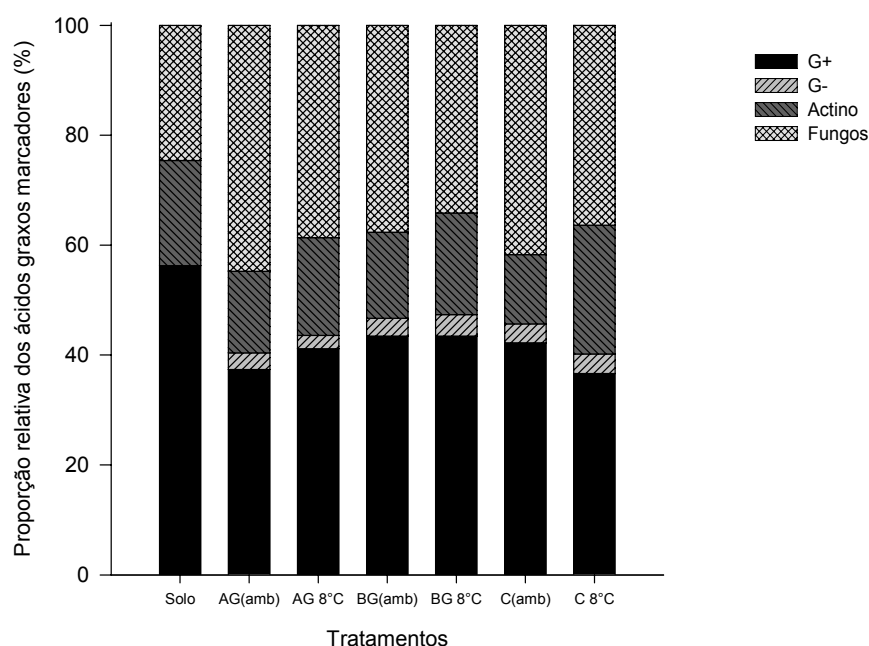


Figura 10 - Proporção relativa dos ácidos graxos marcadores para os grupos microbianos do solo contaminado com gasolina após aplicação dos inoculantes e do composto não-enriquecido armazenados em temperatura ambiente (amb) e sob refrigeração (8 °C). G+: bactérias gram-positivas; G-: bactérias gram-negativas; actino: actinomicetos; AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina; C: composto não-enriquecido.

O tratamento-solo apresentou perfil de ácidos graxos distinto dos demais tratamentos, nos quais o solo foi inoculado, evidenciando o efeito da inoculação do solo sobre o perfil de ácidos graxos do mesmo (Figura 11). As

alterações ocorridas no perfil de ácidos graxos do solo parecem ter sido influenciadas pela temperatura de armazenamento dos inoculantes e do composto não-enriquecido (Figura 11).

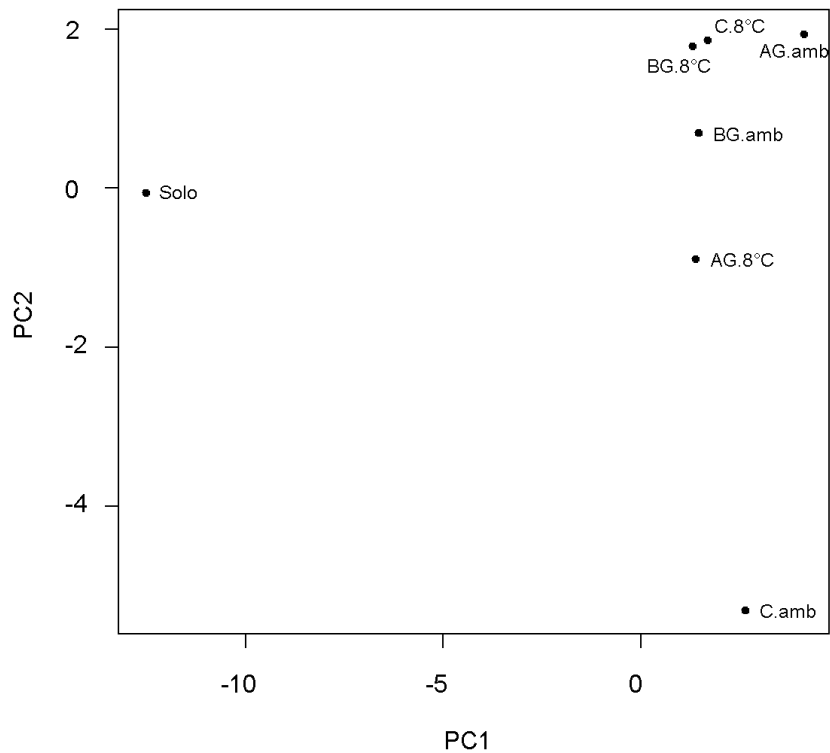


Figura 11 - Análise de componentes principais (PCA) dos perfis de ácidos graxos do solo após aplicação dos inoculantes e do composto não-enriquecido armazenados em temperatura ambiente (amb) e sob refrigeração (8° C). AG: inoculante A da gasolina; BG: inoculante B da gasolina; C: composto não-enriquecido.

O efeito da inoculação do solo foi observado também pela presença de alguns ácidos graxos que não estavam presentes no solo antes da adição dos inoculantes ou do composto não-enriquecido (Tabela 12). Esses ácidos graxos foram encontrados também no composto original, com exceção do 18:1w7c 11-metil e do 20:1w9c.

Tabela 12 - Ácidos graxos encontrados no solo após a aplicação do composto não-enriquecido, inoculantes AG ou BG armazenados em diferentes temperaturas que não estavam presentes no solo não inoculado. Os ácidos graxos grifados não são provenientes do composto originalmente utilizado neste estudo.

Composto não-enriquecido (ambiente e 8 °C)	Inoculante A (ambiente e 8 °C)	Inoculante B (ambiente e 8 °C)
15:0 iso	14:0 iso	14:0 iso
16:1w5c	15:0 iso	14:0
16:0 2OH	16:0 2OH	15:0 iso
17:1w8c	17:1w8c	16:1 iso H
17:0	17:0	16:1w5c
18:1w5c	18:1w5c	16:0 2OH
<b>18:1w7c 11- metil</b>	19:0 iso	17:0
19:0 iso	20:1w7c	17:1w8c
20:1w7c	<b>20:1w9c</b>	18:0 iso
20:4w6,9,12,15c	20:4w6,9,12,15c	18:1w5c
		19:0 iso
		20:1w7c
		<b>20:1w9c</b>
		20:4w6,9,12,15c

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Efeito da concentração dos inoculantes na degradação de hidrocarbonetos de petróleo em solos contaminados com óleo diesel ou gasolina

A dose dos inoculantes aplicados ao solo contaminado com gasolina afetou a atividade respiratória do solo. Por outro lado, o efeito da dose sobre a concentração de células bacterianas cultiváveis não foi significativo (Figura 3 A). O aumento da dose dos inoculantes AG e BG resultou em aumento da atividade respiratória do solo (Figura 1 A). Esse resultado indica que as populações bacterianas presentes nos solos que receberam as maiores doses de inoculantes foram mais eficientes na degradação dos hidrocarbonetos. O processo de enriquecimento de populações microbianas degradadoras de hidrocarbonetos, durante a etapa de produção dos inoculantes da gasolina, foi eficiente. Esse fato é comprovado pela maior contagem de bactérias cultiváveis nos solos que receberam os inoculantes AG e BG, comparativamente ao solo tratado com o composto não-enriquecido.

Nos solos contaminados com óleo diesel, verificou-se efeito apenas do tipo de inóculo sobre a atividade respiratória. Em contrapartida, houve interação entre a concentração e o tipo de inóculo aplicado ao solo sobre o teor residual de TPH. Esses resultados divergentes, entre o ensaio respirométrico e a análise de TPH, podem ser explicados pela utilização de outras fontes de carbono orgânico presentes tanto no solo quanto no composto (KUZYAKOV,

2006), o que resulta em emissão de CO<sub>2</sub> não originário dos hidrocarbonetos (DILLY, 2001).

O tratamento que recebeu a aplicação de composto esterilizado foi o que apresentou a maior evolução de CO<sub>2</sub> dentre os tratamentos contaminados com óleo diesel (Figura 2 B), além de ter apresentado alta contagem de bactérias heterotróficas (Figura 3 B) e a menor porcentagem de degradação de TPH (Tabela 7). Esses dados indicam que as populações bacterianas desse tratamento utilizaram outros substratos, preferencialmente aos hidrocarbonetos do óleo diesel, para o seu crescimento. Esse fato pode estar associado à aplicação de raios gama ao composto, o que possivelmente aumentou a disponibilidade de nutrientes (C, N e P) em razão da morte de microrganismos (VAN VEEN et al., 1997).

Em estudos anteriores, foi reportado que a aplicação de um consórcio microbiano resultou na remoção de 57,8% de TPH de óleo diesel após 55 dias (MARIANO et al., 2007) e que a bioaugmentação do solo com lodo ativado resultou na remoção de 66% de TPH de óleo diesel após 45 dias (GALLEGO et al., 2001). Comparando esses resultados com os obtidos neste estudo, observa-se que os inoculantes e o composto não-enriquecido foram eficientes em promover a degradação de hidrocarbonetos derivados do óleo diesel, ou seja, remoção de 99% em aproximadamente 20 dias (Tabela 6). As populações autóctones do solo mostraram-se capazes de degradar os hidrocarbonetos do óleo diesel, atingindo 80% de degradação de TPH nesse mesmo período.

No solo contaminado com gasolina, a adição dos inoculantes ao solo resultou em aumento expressivo da evolução de CO<sub>2</sub>, resultado atribuído à introdução de microrganismos eficientes em degradar os hidrocarbonetos desse combustível ou mais resistentes aos efeitos tóxicos dos mesmos. Um efeito indireto dos inoculantes pode ser atribuído ao aumento do conteúdo de matéria orgânica do solo, o que resultaria em maior retenção de hidrocarbonetos e, assim, menor efeito tóxico da gasolina sobre os microrganismos. Esse fato já foi observado em estudo anterior (TEJADA et al., 2008), no qual foi aplicado composto de algodão moído ao solo contaminado com gasolina.

O efeito da adição de matéria orgânica sobre a degradação da gasolina e do óleo diesel no solo, bem como a remoção de hidrocarbonetos desses

combustíveis por fenômenos não relacionados à atividade microbiana, não puderam ser avaliados, uma vez que a esterilização do composto e do solo não foi eficiente.

As mudanças ocorridas no perfil de ácidos graxos do solo inoculado indicam que os microrganismos presentes nos inoculantes da gasolina e no composto não-enriquecido conseguiram se estabelecer no solo contaminado. Os efeitos da inoculação do solo foram o aparecimento do ácido graxo marcador de bactérias gram-negativas (16:1 $\omega$ 5c) em alguns tratamentos, a redução dos marcadores de actinomicetos e o aumento do marcador de fungos. O aumento da proporção relativa do marcador de fungos foi atribuído à predominância do mesmo no composto originalmente utilizado neste estudo.

No solo inoculado, foi encontrado o ácido graxo 17:0 ciclo, que não estava presente no composto original. Esse tipo de ácido graxo, ciclopropano, é indicador de estresse ambiental (MROZIK et al., 2008) e confere tolerância para as células microbianas a condições adversas (DENICH et al., 2003). A formação de ciclopropanos pode ocorrer por “nova síntese” ou por modificações pós-síntese de ácidos graxos insaturados com a configuração *cis* (GROGAN e CRONAN et al., 1986; DENICH et al., 2003). A formação de ciclopropanos por modificações pós-síntese constitui uma rápida resposta aos contaminantes, não sendo necessário o crescimento ativo das células.

#### **4.2 Efeito da temperatura de armazenamento sobre as populações bacterianas cultiváveis e sobre o perfil de ácidos graxos dos inoculantes**

A temperatura de refrigeração (6 - 8 °C) foi a mais adequada para o armazenamento dos inoculantes de ambos os combustíveis, pois os inoculantes armazenados nessa condição apresentaram maior contagem de bactérias cultiváveis do que os armazenados em temperatura ambiente. No estudo realizado por BACKMAN et al. (2004), a sobrevivência e a atividade de *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 também foram maiores em baixas temperaturas (5 °C) do solo. Os autores acreditam que o isolado ficou em estágio de dormência durante a incubação no solo e que a adição de nutrientes foi responsável pela rápida ressuscitação do mesmo.

O principal efeito do armazenamento sobre o perfil de ácidos graxos dos inoculantes foi o aumento da abundância de ácidos graxos de cadeia entre 17 e 20 carbonos, cujo resultado fisiológico é a diminuição da fluidez da membrana plasmática (BENEY e GERVAIS, 2001; DENICH et al., 2003). Essa modificação da membrana também foi observada nos inoculantes em relação ao composto não-enriquecido antes do armazenamento, sendo provavelmente uma adaptação das células microbianas aos hidrocarbonetos da gasolina, que têm a capacidade de interagir com a membrana, aumentando a sua fluidez (SIKKEMA et al., 1994).

#### **4.3 Efeito da temperatura de armazenamento sobre a eficiência dos inoculantes na degradação dos hidrocarbonetos de petróleo do óleo diesel ou da gasolina no solo**

A temperatura de armazenamento dos inoculantes influenciou a eficiência dos mesmos na degradação de hidrocarbonetos no solo. Os inoculantes de ambos os combustíveis apresentaram maior efeito sobre a degradação dos hidrocarbonetos no solo após armazenamento sob refrigeração. O inoculante AD, mesmo após armazenamento por período prolongado sob refrigeração, manteve alta eficiência de degradação dos hidrocarbonetos do óleo diesel no solo, 98,14%, praticamente igual à obtida antes do armazenamento, 98,32%. Esses resultados estão de acordo com os dados da contagem de bactérias cultiváveis dos inoculantes após o armazenamento.

Os tratamentos com adição dos inoculantes da gasolina após o armazenamento exibiram degradação mais lenta desse combustível do que os mesmos tratamentos com adição dos inoculantes recém-preparados. Esse fato pode estar relacionado com a redução das populações bacterianas cultiváveis dos inoculantes da gasolina durante o armazenamento.

As alterações na proporção relativa dos ácidos graxos marcadores de grupos microbianos do solo tratado com os inoculantes após o armazenamento foram o aparecimento dos marcadores de bactérias gram-negativas, a diminuição dos marcadores de gram-positivas e aumento do marcador de

fungos. A diminuição dos marcadores de gram-positivas e aumento do marcador de fungos também foram observados nos inoculantes após o armazenamento.

## 5 CONCLUSÕES

A eficiência dos inoculantes microbianos na degradação de hidrocarbonetos da gasolina é influenciada pela concentração dos mesmos no solo.

A bioaugmentação é mais eficiente para o solo contaminado com gasolina do que para o contaminado com óleo diesel.

Os microrganismos autóctones do solo são mais eficientes na degradação de hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel do que os da gasolina.

O efeito da inoculação sobre o perfil de ácidos graxos do solo contaminado com gasolina é independente da concentração de inóculo utilizada, mas é influenciada pelo tipo de inóculo.

A temperatura de refrigeração é a mais adequada para o armazenamento dos inoculantes.

A temperatura de armazenamento dos inoculantes influencia a eficiência dos mesmos na degradação de hidrocarbonetos constituintes da gasolina ou do óleo diesel no solo.

A aplicação dos inoculantes ao solo contaminado com gasolina, antes e após o armazenamento, resulta no aparecimento dos ácidos graxos marcadores das bactérias gram-negativas e aumento da proporção relativa do marcador de fungos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL (EPA), **Método 3540C**, disponível: [www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf](http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf), acessada em 30 de junho de 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO (ANP), disponível: [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br), acessada em 15 de janeiro de 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO (ANP), disponível: [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br), acessada em 30 de abril de 2009.

BACKMAN, A.; MARAHA, N.; JANSSON, J. K. Impact of temperature on the physiological status of a potential bioremediation inoculant, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2952-2958, 2004.

BAPTISTA, S. J.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. D. C. Production of CO<sub>2</sub> in crude oil bioremediation in clay soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 249-255, 2005.

BENEY, L.; GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 34-42, 2001.

CARMICHAEL, L. M.; PFAENDER, F. K. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. **Biodegradation**, v. 8, p. 1-13, 1997.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB), disponível:[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/relacao\\_area\\_s.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_area_s.asp), acessada em 02 de maio de 2009.

DENICH, T. J.; BEAUDETTE, L. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 149-182, 2003.

DILLY, O. Microbial respiratory quotient during basal metabolism and after glucose amendment in soils and litter. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 117-127, 2001.

FANTROUSSI, S. E.; AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 268–275, 2005.

GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, v. 12, p. 325–335, 2001

GOGOI, B. K.; DUTTA, N. N.; GOSWAMI, P.; MOHAN, T. R. K. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 767-782, 2003.

GROGAN, D. W.; CRONAN, J. E. Characterization of *Escherichia coli* mutants completely defective in synthesis of cyclopropane fatty acids. **Journal of Bacteriology**, v. 166, p. 872-877, 1986.

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

KALAKOUTSKIIP, L. V.; AGRE, N. S. Comparative aspects of development and differentiation in Actinomycetes. **Bacteriological Reviews**, v. 40, p. 469-524, 1976.

KATO, K.; MIURA, N. Effect of matured compost as a bulking and inoculating agent on the microbial community and maturity of cattle manure compost. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3372–3380, 2008.

KLAMER, M.; BAATH, E. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 27, p. 9-20, 1998.

KUZYAKOV, Y. 2006. Sources of CO<sub>2</sub> efflux from soil and review of partitioning methods. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 425-448, 2006.

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.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 2006.** 162 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. A. G.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 346-353, 2007.

MÁRQUEZ- ROCHA, F. J.; HERNANDÉZ-RODRÍGUEZ, V.; LAMELA, M. T. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 128, p. 313-320, 2001.

MELO JUNIOR, H. R.; COSTI, A. C. Z. **Avaliação da contaminação das Águas subterrâneas por hidrocarbonetos na vila Tupi, Porto Velho (RO).** XIII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, Cuiabá, 2004. Disponível: [www.cprm.gov.br/publique/media/avali\\_contami.pdf](http://www.cprm.gov.br/publique/media/avali_contami.pdf), acessada em 12 de fevereiro de 2008.

MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; LABUZEK, S. FAMES profiles of phenol-degrading *Pseudomonas stutzeri* introduced into soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 319-324, 2008.

SCHERR, K.; AICHBERGER, H.; BRAUN, R.; LOIBNER, A. P. Influence of soil fractions on microbial degradation behavior of mineral hydrocarbons. **European Journal of Soil Biology**, v. 43, p. 341-350, 2007.

SCHUTTER, M. E.; DICK, R. P. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. **Soil Science Society of America Journal**, v. 64, p.1659-1668, 2000.

SIKKEMA, J.; BONT J. A. M.; POOLMANN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 8022-8028, 1994.

STEGER, K.; EKLIND, Y.; OLSSON, J.; SUNDH, I. Microbial community growth and utilization of carbon constituents during thermophilic composting at different oxygen levels. **Microbial Ecology**, v. 50, p.163-171, 2005.

STEGER, K.; JARVIS, A.; VASARA, T.; ROMANTSCHUK, M.; SUNDH, I. Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. **Research in Microbiology**, v. 158, p. 617-624, 2007.

STRAUBE, W.L.; JONES-MEEHAN, J.; PRITCHARD, P.H.; JONES, W.R. Bench-scale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 27, p. 27-37, 1999.

STROUD J. L., PATON, G. I.; SEMPLE, K. T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1239-1253, 2007.

TEJADA, M.; GONZALEZ, J. L.; HERNANDEZ, M. T.; GARCIA, C. Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: effect on soil microbial properties. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2872-2880, 2008.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; 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.

VAN VEEN, J. A.; VAN OVERBEEK, L. S., VAN ELSAS, J. D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 121-135, 1997.

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

VOGEL, T. M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 311-316, 1996.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

Composto de resíduos sólidos urbanos é um bom substrato para o desenvolvimento de inoculantes microbianos para biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos.

Microrganismos autóctones do composto de resíduos sólidos urbanos e do solo são mais eficientes na degradação de hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel do que da gasolina.

A bioaugmentação do solo contaminado com gasolina apresentou melhores resultado do que a do solo contaminado com óleo diesel.

A aplicação dos inoculantes da gasolina e do composto não-enriquecido altera o perfil de ácidos graxos do solo e a proporção relativa dos ácidos graxos marcadores de grupos microbianos.

## **APÊNDICE**

**APÊNDICE A - Análise estatística dos dados de CO<sub>2</sub> acumulado do composto de resíduos sólidos urbanos após aplicação de diferentes concentrações de gasolina**

Quadro da ANOVA

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Concentração	3	9881,29	3293,76	3,97
Umidade	1	119348,50	119348,50	144,05
Concentração x umidade	3	12061,46	4020,48	4,85*
Resíduo	16	13255,61	828,47	

Coeficiente de variação= 29,03

**Desdobramento da interação umidade x concentração de gasolina – as médias do CO<sub>2</sub> acumulado produzido pelo composto de resíduos sólidos urbanos seguidos pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey**

Concentração de gasolina	Sem ajuste umidade	Com ajuste da umidade
0	30,81 B	122,05 A
10 mL.kg <sup>-1</sup>	31,17 B	135,36 A
20 mL.kg <sup>-1</sup>	25,62 B	194,97 A
50 mL.kg <sup>-1</sup>	26,93 B	226,29 A

**Desdobramento da interação tratamento x concentração de gasolina - análise de regressão das médias de CO<sub>2</sub> acumulado dos tratamentos com ajuste da umidade**

Quadro da ANOVA

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Regressão	1	7792,34	7792,34	118,70*
Independente da regressão	2	131,29	65,64	

Parâmetros da regressão:

Modelo linear

<b>Nome probab.</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Valor de T</b>	<b>Coefficiente beta</b>
Constante	0,2089E+01			
Tratamento	0,4887E+00	0,2759E-01	17,71	0,99

$Y = 0,99x + 2,08$ ;  $R_2$  ajustado = 0,97;  $p = 0,0083$ .

**APÊNDICE B - Análise estatística dos dados de CO<sub>2</sub> acumulado do composto de resíduos sólidos urbanos após aplicação de diferentes concentrações de óleo diesel**

**Quadro da ANOVA**

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F
Concentração	3	93883,23	31294,41	168,89
Umidade	1	315672,10	315672,10	1703,61
Concentração x umidade	3	95103,46	31701,15	171,08*
Resíduo	12	2223,54	185,29	

Coeficiente de variação = 9,373

**Desdobramento da interação umidade x concentração de óleo diesel - as médias do CO<sub>2</sub> acumulado produzido pelo composto de resíduos sólidos urbanos seguidos pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey**

Concentração de óleo diesel	Sem ajuste umidade	Com ajuste da umidade
0	30,81 B	122,05 A
10 mL.kg <sup>-1</sup>	28,85 B	214,01 A
20 mL.kg <sup>-1</sup>	25,66 B	295,79 A
50 mL.kg <sup>-1</sup>	29,80 B	509,07 A

**Desdobramento da interação concentração de óleo diesel x umidade - análise de regressão das médias de CO<sub>2</sub> acumulado dos tratamentos com ajuste da umidade**

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Regressão Independente da regressão	1	0,20	0,20	201,48*
	2	0,1987E-02	0,9939E-03	

Parâmetros da regressão:

Modelo Exponencial

<b>Nome probab.</b>	<b>Coeficiente</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Valor de T</b>	<b>Coeficiente Beta</b>
Constante	0,1898E+01			
Tratamento	0,2001E+00	0,1409E-01	14,19	0,99

$Y = 1,88 \cdot 0,99^x$ ;  $R_2$  ajustado = 0,98;  $p = 0,0049$ .

**APÊNDICE C - Média das porcentagens de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) extraídos dos inoculantes AG e BG e do composto não-enriquecido durante o desenvolvimento dos inoculantes da gasolina.**

Ácido graxo	Composto	C	AG	BG	C 6d	AG 6d	BG 6d	C 12d	AG 12d	BG 12d	C 18d	AG 18d	BG 18d
<b>10:00</b>	0,14	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00
<b>10:0 2OH</b>	0,03	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>11:00</b>	0,10	0,02	0,22	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,05
<b>12:00</b>	1,47	1,41	1,56	1,56	0,47	0,47	0,75	0,00	0,00	0,00	1,31	1,46	1,34
<b>13:0 iso</b>	0,08	0,08	0,13	0,13	0,03	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,09	0,29	0,16
<b>13:00</b>	0,00	0,12	0,17	0,17	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,11
<b>13:0 anteiso</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,13	0,06	0,10	0,08	0,11	0,00	0,00
<b>13:1 at 12-13</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
<b>12:0 2OH</b>	0,00	0,00	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>13:00</b>	0,12	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
<b>14:0 iso</b>	0,30	0,32	0,26	0,26	0,19	0,19	0,21	0,00	0,02	0,06	0,29	0,24	0,25
<b>14:0 anteiso</b>	0,05	0,06	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>14:1 w5c</b>	0,05	0,00	0,15	0,15	0,20	0,12	0,21	0,00	0,00	0,00	0,13	0,07	0,05
<b>14:00</b>	1,88	1,91	1,78	1,78	1,40	1,31	1,52	0,25	0,30	0,43	1,88	1,76	1,76
<b>15:1 iso F</b>	0,23	0,29	0,26	0,26	0,18	0,21	0,20	0,00	0,00	0,02	0,21	0,05	0,15
<b>15:0 iso</b>	1,91	1,98	1,81	1,81	1,66	1,49	1,64	0,57	0,56	0,50	2,07	1,81	1,92
<b>15:0 anteiso</b>	1,10	1,17	1,13	1,13	1,11	1,54	1,41	0,50	1,08	1,03	1,36	4,59	3,02
<b>15:1 w5c</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,89	0,26	1,05	0,75	0,68	0,67	0,21	0,05	0,24
<b>15:1 w6c</b>	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>16:1 w7c alcohol</b>	0,01	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
<b>16:1 iso H</b>	0,20	0,20	0,20	0,20	0,14	0,15	0,14	0,09	0,09	0,09	0,18	0,18	0,15
<b>16:0 N alcohol</b>	0,00	0,00	0,07	0,07	0,10	0,16	0,12	0,07	0,09	0,09	0,07	0,05	0,00
<b>16:0 iso</b>	1,76	1,83	1,67	1,67	1,51	1,45	1,43	0,97	1,04	1,09	1,67	1,91	1,76
<b>16:1 w5c</b>	1,14	1,10	1,00	1,00	1,63	1,09	1,74	1,24	1,28	1,17	1,23	0,79	0,99

Continua...

Tabela 1, Cont.

Ácido graxo	Composto	C	AG	BG	C 6d	AG 6d	BG 6d	C 12d	AG 12d	BG 12d	C 18d	AG 18d	BG 18d
<b>16:1 w9c</b>	0,00	0,00	0,09	0,09	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,07	0,02
<b>16:00</b>	17,80	18,12	18,53	18,53	16,37	17,07	15,81	12,19	12,14	12,98	17,78	17,78	18,69
<b>15:0 iso 3OH</b>	0,27	0,00	0,00	0,00	1,08	0,34	1,27	0,91	1,12	0,96	0,36	0,16	0,31
<b>17:1 anteiso w9c</b>	0,99	0,64	0,58	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>17:0 iso</b>	1,47	1,28	1,24	1,24	1,71	2,06	2,25	1,74	1,31	2,36	1,64	1,30	1,56
<b>17:0 anteiso</b>	1,26	1,13	1,11	1,11	1,75	1,99	2,26	1,82	2,71	2,75	1,51	3,93	2,66
<b>17:1 w8c</b>	0,76	0,64	0,63	0,63	0,97	1,03	1,07	0,90	1,68	1,33	0,77	0,39	0,63
<b>17:00</b>	0,88	0,93	0,95	0,95	0,92	0,99	0,92	0,92	0,85	0,97	0,89	0,49	0,62
<b>16:1 2OH</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>16:0 2OH</b>	0,32	0,31	0,36	0,36	0,31	0,24	0,29	0,23	0,45	0,32	0,20	0,15	0,09
<b>17:0 10-methyl</b>	0,49	0,73	0,68	0,68	0,47	0,38	0,53	0,46	0,45	0,41	0,35	0,13	0,16
<b>18:0 iso</b>	0,60	0,70	0,77	0,77	0,65	0,50	0,65	0,61	0,72	0,59	0,48	0,35	0,29
<b>18:1 w9c</b>	21,43	23,04	22,54	22,54	22,66	23,76	21,79	25,87	24,86	24,25	23,38	25,35	24,68
<b>18:1 w5c</b>	2,81	2,65	2,78	2,78	3,57	3,67	3,67	3,55	3,38	3,49	1,72	2,47	2,41
<b>18:00</b>	9,06	9,60	9,69	9,69	9,30	9,59	8,99	11,67	10,97	10,66	6,51	10,04	10,14
<b>18:1 2OH</b>	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:1 w7c 11-methyl</b>	0,00	0,00	0,13	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:3 w6c (6,9,12)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:0 10-methyl, TBSA</b>	2,58	2,63	2,71	2,71	3,32	2,35	3,56	4,11	3,67	3,70	2,41	1,21	1,80
<b>19:0 iso</b>	0,95	1,18	1,32	1,32	0,94	0,78	1,14	1,27	1,33	1,26	0,67	0,33	0,36
<b>19:0 anteiso</b>	0,64	0,43	0,52	0,52	0,44	0,54	0,00	0,00	0,91	0,42	0,34	0,12	0,15
<b>19:00</b>	0,41	0,22	0,25	0,25	0,41	0,27	0,38	0,56	0,47	0,54	0,27	0,05	0,07
<b>18:1 2OH</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
<b>20:4 w6,9,12,15c</b>	0,66	0,91	0,94	0,94	0,62	0,55	0,56	0,79	0,71	0,66	0,58	0,40	0,38

Continua...

**Tabela 1, Cont.**

<b>Ácido graxo</b>	<b>Composto</b>	<b>C</b>	<b>AG</b>	<b>BG</b>	<b>C 6d</b>	<b>AG 6d</b>	<b>BG 6d</b>	<b>C 12d</b>	<b>AG 12d</b>	<b>BG 12d</b>	<b>C 18d</b>	<b>AG 18d</b>	<b>BG 18d</b>
<b>20:1 w9c</b>	0,00	0,00	0,60	0,60	0,00	0,37	0,00	0,45	0,00	0,42	0,35	0,23	0,25
<b>20:1 w7c</b>	2,02	2,00	2,13	2,13	1,72	1,90	1,88	2,62	2,72	2,88	1,89	1,63	1,65
<b>20:00</b>	1,11	1,03	1,10	1,10	1,05	1,10	1,00	1,42	1,35	1,34	1,00	0,95	0,95
<b>20:2 w6,9c</b>	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

**APÊNDICE D - Média das porcentagens dos ésteres metílicos de ácidos graxo extraídos dos inoculantes AG e BG e do composto não-enriquecido após armazenamento em temperatura ambiente (amb) e sob refrigeração (8 °C). Os tratamentos AG 18d, BG 18d e C 18d correspondem ao inoculante AG e BG e o composto não-enriquecido antes do armazenamento.**

Ácido graxo	AG 18d	AG amb	AG 8°C	BG 18d	BG amb	BG 8°C	C 18d	C amb	C 8°C
10:00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00
11:00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00
12:00	1,46	0,10	0,16	1,34	0,14	0,17	1,31	0,14	0,15
13:0 iso	0,29	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00
13:0 anteiso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00
13:1 at 12-13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
13:00	0,04	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
14:0 iso	0,24	0,00	0,03	0,25	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00
14:1 w5c	0,07	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
14:00	1,76	0,45	0,50	1,76	0,50	0,53	1,88	0,55	0,57
15:1 iso F	0,05	0,08	0,04	0,15	0,00	0,06	0,21	0,03	0,07
15:0 iso	1,81	0,58	0,64	1,92	0,64	0,73	2,07	0,69	0,84
15:0 anteiso	4,59	0,48	0,92	3,02	0,47	0,83	1,36	0,44	0,55
15:1 w5c	0,05	0,00	0,12	0,24	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00
16:1 iso H	0,18	0,00	0,03	0,15	0,00	0,18	0,18	0,00	0,14
16:1 w7c alcohol	0,00	0,13	0,05	0,00	0,24	0,29	0,03	0,23	0,32
16:0 N alcohol	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00
16:0 iso	1,91	1,04	1,11	1,76	1,13	1,27	1,67	1,21	1,39
16:1 w9c	0,07	0,06	0,07	0,02	0,00	0,08	0,10	0,00	0,00
16:1 w5c	0,79	0,48	0,53	0,99	0,49	0,55	1,23	0,65	0,67
16:00	17,78	12,12	11,86	18,69	11,36	12,19	17,78	12,79	12,61
15:0 2OH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
15:0 iso 3OH	0,16	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,36	0,00	0,00

Continua...

Tabela 1, Cont.

Ácido graxo	AG 18d	AG amb	AG 8°C	BG 18d	BG amb	BG 8°C	C 18d	C amb	C 8°C
<b>17:1 anteiso w9c</b>	0,00	0,23	0,65	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00	0,53
<b>17:0 iso</b>	1,30	1,13	1,08	1,56	1,09	1,02	1,64	1,21	1,24
<b>17:0 anteiso</b>	3,93	1,13	1,50	2,66	1,02	1,22	1,51	0,95	1,04
<b>17:1 w8c</b>	0,39	0,64	0,61	0,63	0,61	0,57	0,77	0,61	0,61
<b>17:00</b>	0,49	1,11	0,85	0,62	0,95	0,94	0,89	0,92	0,98
<b>16:0 2OH</b>	0,15	0,22	0,21	0,09	0,19	0,34	0,20	0,14	0,18
<b>17:0 10-methyl</b>	0,13	0,25	0,20	0,16	0,21	0,25	0,35	0,22	0,26
<b>18:0 iso</b>	0,35	0,49	0,56	0,29	0,58	0,49	0,48	0,49	0,46
<b>18:1 w9c</b>	25,35	27,64	29,76	24,68	26,14	28,88	23,38	29,59	25,82
<b>18:1 w5c</b>	2,47	3,58	3,79	2,41	3,86	3,98	2,63	3,35	3,32
<b>18:00</b>	10,04	13,83	13,62	10,14	15,21	14,69	9,79	14,49	13,86
<b>18:1 w7c 11-methyl</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	0,00
<b>18:0 10-methyl, TBSA</b>	1,21	3,23	2,09	1,80	3,45	3,32	2,41	3,70	2,90
<b>19:0 iso</b>	0,33	1,11	0,89	0,36	1,20	1,10	0,67	1,07	1,13
<b>19:0 anteiso</b>	0,12	0,50	0,45	0,15	0,76	0,24	0,34	0,66	0,53
<b>19:00</b>	0,05	0,38	0,34	0,07	0,52	0,44	0,27	0,44	0,44
<b>18:1 2OH</b>	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,04	0,09	0,00
<b>20:4 w6,9,12,15c</b>	0,40	0,72	0,75	0,38	0,84	0,82	0,58	0,85	0,87
<b>20:1 w9c</b>	0,23	1,52	1,45	0,25	1,43	1,25	0,35	1,32	1,36
<b>20:1 w7c</b>	1,63	3,17	3,03	1,65	2,95	3,01	1,89	2,87	2,79
<b>20:00</b>	0,95	1,80	1,80	0,95	1,93	1,97	1,00	1,82	1,89

**APÊNDICE E - Análise estatística dos dados de CO<sub>2</sub> acumulado do solo contaminado com gasolina após aplicação de diferentes concentrações dos inoculantes AG e BG e do composto não-enriquecido**

**Quadro da ANOVA**

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F
Total	26	907,44		
Total de redução	8	625,71	78,21	5,00
Concentração	2	64,59	32,29	2,06
Tratamento	2	266,19	133,09	8,50
Concentração x tratamento	4	294,92	73,73	4,71*
Resíduo	18	281,73	15,65	

Coeficiente de variação= 8,7

Teste de médias os valores de CO<sub>2</sub> acumulado do solo contaminado com gasolina após aplicação de diferentes inóculos

Inóculo	Médias*
Inoculante AG	48,25 A
Inoculante BG	47,04 A
Composto não-enriquecido	41,07 B

\* As médias de CO<sub>2</sub> acumulado ( $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ g}^{-1}$  de massa seca do solo) seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Desdobramento da interação concentração do inóculo x tratamento - regressão para os tratamentos com aplicação dos inoculantes AG e BG ao solo contaminado com gasolina**

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F
Regressão Independente da regressão	1	0,3250E-02	0,3250E-02	28,14*
	1	0,1155E-03	0,1155E-03	

### Parâmetros da regressão:

Modelo Exponencial

Nome probab.	Coefficiente	Desvio padrão	Valor de T	Coefficiente Beta
Constante	0,1623E+01			
Tratamento	0,2015E-02	0,3799E-03	5,30	0,98

$$Y = 1,62 \cdot 0,98^x$$

$$R_2 \text{ ajustado} = 0,93$$

**Desdobramento da interação concentração do inóculo x tratamento - regressão para o tratamento com aplicação do composto não-enriquecido ao solo**

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Regressão	1	60,76	60,76	1279,47*
Independente da regressão	1	0,4749E-01	0,4749E-01	

### Parâmetros da regressão:

Modelo Logarítmico 10

Nome probab.	Coefficiente	Desvio padrão	Valor de T	Coefficiente beta
Constante	0,6255E+02			
Log conc.	-0,1543E+02	0,4314E+00	-35,76	-0,99

$$Y = 62,55 - 0,99 \log x; R_2 \text{ ajustado} = 0,99$$

**APÊNDICE F - Análise estatística dos dados de CO<sub>2</sub> acumulado do solo contaminado com óleo diesel após aplicação de diferentes concentrações dos inoculantes AD e BD e do composto não-enriquecido**

Quadro da ANOVA

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Total	26	1949,63		
Total de redução	8	994,53	124,31	2,34
Concentração	2	73,81	36,90	0,70
Tratamento	2	826,13	413,06	7,78
Concentração x tratamento	4	94,58	23,64	0,45 n.s.
Resíduo	18	955,09	53,06	

Coeficiente de variação = 4,1686

Teste de médias dos valores de CO<sub>2</sub> acumulado do solo contaminado com óleo diesel após aplicação de diferentes inóculos

Inóculo	Médias*
Inoculante BD	180,39 A
Inoculante AD	176,60 A
Composto não-enriquecido	167,23 B

\* As médias de CO<sub>2</sub> acumulado ( $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ g}^{-1}$  de massa seca do solo) seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**APÊNDICE G - Análise estatística dos dados de porcentagem de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) do solo contaminado com óleo diesel após aplicação dos inoculantes AD e BD e do composto não-enriquecido em diferentes concentrações**

Quadro da ANOVA

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	2	43,67	21,83	26,64
Concentração	2	242,46	121,23	147,92
Concentração x tratamento	4	32,69	8,17	9,97*
Resíduo	9	7,37	0,81	

Coeficiente de variação= 0,947

Teste de médias dos valores de porcentagem de degradação de hidrocarbonetos totais do petróleo em solo contaminado com óleo diesel após aplicação de diferentes inóculos

Inóculo	Médias*
Inoculante BD	97,78 A
Inoculante AD	94,94 B
Composto não-enriquecido	94,15 B

\* As médias de porcentagem de degradação de TPH seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Desdobramento da interação concentração x tipo de inóculo:**

A regressão das médias de porcentagem de degradação de TPH dos tratamentos com os inoculantes AD e BD e com composto não-enriquecido não foi significativa, embora haja interação entre os tratamentos e as concentrações dos inoculantes.

**Desdobramento da interação concentração x tratamento:**

Está contido no capítulo II da dissertação (Tabela 6).

**APÊNDICE H - Análise estatística dos dados de CO<sub>2</sub> acumulado do solo contaminado com gasolina após aplicação de composto esterilizado, inoculantes AG e BG e do composto não-enriquecido**

Quadro da ANOVA

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F
Tratamento	5	4333,74	866,74	71,57*
Resíduo	12	145,31	12,10	

Coeficiente de variação= 10,24

O teste de médias dos valores de CO<sub>2</sub> dos tratamentos empregados no solo contaminado com gasolina está contido na figura 2 do capítulo II.

**APÊNDICE I - Análise estatística dos dados de CO<sub>2</sub> acumulado do solo contaminado com óleo diesel após aplicação de composto esterilizado, inoculantes AD e BD e do composto não-enriquecido**

Quadro da ANOVA

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	5	22415,54	4483,10	49,34*
Resíduo	10	908,59	90,85	

Coeficiente de variação= 5,554

O teste de médias dos valores de CO<sub>2</sub> dos tratamentos empregados no solo contaminado com óleo diesel está contido na figura 2 do capítulo II.

**APÊNDICE J - Análise estatística dos dados de porcentagem de degradação de hidrocarbonetos totais do petróleo no solo contaminado com óleo diesel após aplicação de composto esterilizado, inoculantes AD e BD e do composto não-enriquecido**

Quadro da ANOVA

<b>Fontes de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>F</b>
Tratamento	5	4452,98	890,59	170,26*
Resíduo	5	26,15	5,23	

Coeficiente de variação= 3,005

O teste de médias dos valores de porcentagem de degradação de TPH seguidas no solo contaminado com óleo diesel está representado na tabela 7 do capítulo II.

**APÊNDICE K - Média das porcentagens dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) extraídos do solo após a aplicação dos inoculantes e do composto não-enriquecido em diferentes concentrações, 10, 30 ou 50 g.kg<sup>-1</sup>. AG (inoculante A da gasolina), BG (inoculante B da gasolina), Ce (composto esterilizado), Se (solo esterilizado), C (composto não-enriquecido), solo (solo contaminado com gasolina sem adição de inóculo).**

Ácido graxo	Solo	Ce+Se	Ce+S	C (10)	C (30)	C (50)	AG (10)	AG (30)	AG (50)	BG (10)	BG (30)	BG (50)
<b>12:00</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>14:0 iso</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>14:00</b>	0,00	0,00	0,40	0,00	0,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>15:0 isso</b>	0,72	1,33	1,20	0,97	1,75	0,92	1,29	0,86	1,09	0,99	0,98	1,08
<b>15:0 anteiso</b>	0,40	1,30	1,19	2,36	2,83	1,45	4,37	3,08	3,99	3,03	3,59	3,72
<b>15:1 w5c</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,53	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>16:1 iso H</b>	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>16:0 iso</b>	3,92	3,08	2,55	2,70	2,96	2,08	3,21	2,39	2,67	2,80	2,44	2,61
<b>16:0 anteiso</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>16:00</b>	8,76	11,74	11,52	10,46	12,62	10,88	10,25	8,68	9,29	9,37	8,87	10,29
<b>16:1 w5c</b>	0,00	0,20	0,56	0,14	0,30	0,63	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22
<b>15:0 iso 3OH</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,88	0,00	0,00	0,38	0,00
<b>17:0 iso</b>	3,23	1,99	1,83	1,81	1,89	1,74	1,95	1,74	1,65	1,96	1,79	1,68
<b>17:1 anteiso w9c</b>	0,55	1,60	1,22	0,86	0,84	0,56	0,98	0,83	0,00	0,67	1,18	0,42
<b>17:0 anteiso</b>	0,93	2,24	2,23	6,14	4,08	3,09	8,27	8,17	8,70	7,82	8,76	7,72
<b>17:1 w8c</b>	0,00	0,00	0,24	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>17:0 cyclo</b>	0,00	0,27	0,46	0,00	0,18	0,20	0,23	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00
<b>17:00</b>	0,00	0,78	0,84	0,60	0,71	0,22	0,68	0,43	0,18	0,45	0,32	0,43
<b>16:0 2OH</b>	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,17	0,00	0,86	0,00	0,00	0,44	0,36
<b>17:0 10-methyl</b>	0,66	0,30	0,56	0,52	0,66	0,21	0,68	0,00	0,00	0,21	0,00	0,26
<b>18:3 w6c (6,9,12)</b>	1,31	1,38	1,07	1,08	1,00	1,32	0,71	1,10	1,21	1,15	1,24	1,11
<b>18:0 iso</b>	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>18:1 w9c</b>	11,58	20,22	20,73	19,60	16,29	19,15	17,24	15,41	21,26	20,57	19,76	18,67
<b>18:1 w5c</b>	0,00	4,59	3,71	2,67	2,81	3,77	3,16	3,52	4,27	3,24	4,45	4,33

Continua...

**Tabela 1, Cont.**

<b>Ácido graxo</b>	<b>Solo</b>	<b>Ce+Se</b>	<b>Ce+S</b>	<b>C (10)</b>	<b>C (30)</b>	<b>C (50)</b>	<b>AG (10)</b>	<b>AG (30)</b>	<b>AG (50)</b>	<b>BG (10)</b>	<b>BG (30)</b>	<b>BG (50)</b>
<b>18:00</b>	16,41	11,06	11,63	10,29	10,05	11,37	11,50	10,22	11,41	11,96	12,07	11,17
<b>17:0 2OH</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,61	0,00
<b>18:0 10-methyl, TBSA</b>	3,14	3,25	3,48	3,35	1,41	2,70	3,07	6,23	1,82	2,59	1,43	2,75
<b>19:0 iso</b>	0,00	0,45	1,06	0,83	0,52	0,00	0,39	1,27	0,00	0,45	0,75	0,40
<b>19:0 cyclo w8c</b>	8,87	3,13	2,83	3,08	3,73	2,78	3,58	3,63	3,52	3,87	3,33	3,17
<b>18:0 2OH</b>	3,95	1,92	1,26	2,13	2,13	2,28	1,55	2,56	3,48	0,59	2,15	1,97
<b>20:4 w6,9,12,15c</b>	0,00	0,61	0,75	0,60	0,34	0,62	0,50	0,64	0,34	0,67	0,66	0,30
<b>20:0 isso</b>	5,38	4,12	3,31	3,32	2,86	3,71	3,12	3,33	3,63	3,82	3,28	3,44
<b>20:1 w9c</b>	0,00	0,00	0,49	0,00	0,18	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,45
<b>20:1 w7c</b>	0,00	2,50	2,22	1,90	1,63	1,96	1,64	1,94	2,11	3,20	2,19	2,10
<b>20:00</b>	5,66	3,03	2,40	2,39	2,31	2,49	2,31	2,48	3,03	2,97	2,32	2,45

**APÊNDICE L - Análise estatística dos dados de CO<sub>2</sub> acumulado do solo contaminado com gasolina após aplicação dos inoculantes AG e BG e do composto não-enriquecido armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração**

Quadro da ANOVA

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	3	9073,03	3024,34	417,55
Temperatura	1	10,21	10,21	1,41
Trat. x Temp.	3	2507,26	835,75	115,38*
Resíduo	15	108,64	7,24	

Coeficiente de variação= 5,240

**Desdobramento da interação tratamento *versus* temperatura:**

Está contido no capítulo II (Tabela 10).

**Desdobramento da interação temperatura *versus* tratamento:**

Tratamento/Temperatura	Ambiente	Refrigeração (6-8°C)
<b>Inoculante AG</b>	61,21 B	72,9 A
<b>Inoculante BG</b>	59,48 B	65,87 A
<b>Composto não-enriquecido</b>	53,02 B	66,52 A

**APÊNDICE M - Análise estatística dos dados de CO<sub>2</sub> acumulado do solo contaminado com óleo diesel após aplicação dos inoculantes AD e BD e do composto não-enriquecido armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração**

Quadro da ANOVA

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	3	55996,44	18665,48	651,07
Temperatura	1	8337,76	8337,76	290,83
Trat. x Temp.	3	31826,29	10608,76	370,04*
Resíduo	16	458,69	28,66	

Coeficiente de variação= 3,256

**Desdobramento da interação tratamento *versus* temperatura:**

Está contido no capítulo II (Tabela 10).

**Desdobramento da interação temperatura *versus* tratamento:**

Tratamento/Temperatura	Ambiente	Refrigeração (6-8°C)
<b>Inoculante AD</b>	189,43 B	200,01 A
<b>Inoculante BD</b>	198,18 A	202,07 A
<b>Composto não-enriquecido</b>	181,45 A	181,12 A

**APÊNDICE N - Análise estatística dos dados de porcentagem de degradação de hidrocarbonetos totais do petróleo no solo contaminado com óleo diesel após aplicação dos inoculantes AD e BD e do composto não-enriquecido armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração**

Quadro da ANOVA

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Tratamento	3	6643,13	2214,38	416,73
Temperatura	1	1558,60	1558,60	293,32
Trat. x Temp.	3	6130,60	2043,53	384,58*
Resíduo	8	42,50	5,31	

Coeficiente de variação= 3,071

**Desdobramento da interação tratamento *versus* temperatura:**

Está contido no capítulo II (Tabela 11).

**Desdobramento da interação temperatura *versus* tratamento:**

Tratamento/Temperatura	Ambiente	Refrigeração (6-8°C)
Inoculante AD	96,55 A	98,14 A
Inoculante BD	66,66 B	84,29 A
Composto não-enriquecido	91,66 A	78,32 B

**APÊNDICE O - Média das porcentagens de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) extraídos do solo após aplicação dos inoculantes e do composto não-enriquecido armazenados em temperatura ambiente (amb) ou sob refrigeração (8 °C). AG (inoculante A da gasolina), BG (inoculante B da gasolina), C (composto não-enriquecido), solo (solo contaminado com gasolina sem adição de inóculo).**

Ácido graxo	Solo	AG amb	AG 8°C	BG amb	BG 8°C	C amb	C 8°C
<b>13:0 anteiso</b>	2,12	0,00	0,00	1,81	0,00	0,00	0,21
<b>14:0 iso</b>	0,00	0,00	0,38	0,56	0,00	0,00	0,00
<b>14:00</b>	0,00	0,00	0,00	0,22	0,38	0,00	0,00
<b>15:0 iso</b>	0,00	1,46	1,94	2,20	2,28	1,75	1,44
<b>15:0 anteiso</b>	3,67	3,10	3,57	3,83	3,59	2,50	2,34
<b>16:1 iso H</b>	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00
<b>16:0 iso</b>	11,08	4,30	5,89	6,00	5,85	5,64	4,89
<b>16:1 w5c</b>	0,00	0,00	0,00	0,21	0,39	0,00	0,32
<b>16:00</b>	10,33	9,19	9,13	10,41	10,27	10,81	10,09
<b>17:1 anteiso w9c</b>	3,94	2,45	5,27	4,80	3,85	5,84	5,61
<b>17:0 iso</b>	5,26	2,59	3,24	3,21	3,21	3,94	3,17
<b>17:0 anteiso</b>	8,45	6,99	7,31	6,63	7,22	5,53	5,58
<b>17:1 w8c</b>	0,00	1,00	0,97	1,66	1,39	1,58	1,71
<b>17:00</b>	0,00	1,27	1,35	1,55	1,41	1,48	1,46
<b>16:0 2OH</b>	0,00	0,34	0,47	0,32	1,30	1,05	0,91
<b>17:0 10-methyl</b>	3,35	2,00	1,86	2,21	2,24	2,39	2,46
<b>18:3 w6c (6,9,12)</b>	8,34	1,33	1,70	1,25	1,83	1,81	1,89
<b>18:0 iso</b>	0,00	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00
<b>18:1 w9c</b>	12,45	22,10	17,80	19,28	17,40	19,14	17,30
<b>18:1 w5c</b>	0,00	4,04	3,81	3,33	4,67	4,88	4,45
<b>18:00</b>	9,43	14,33	13,85	11,31	13,54	14,14	13,58
<b>18:1 w7c 11-methyl</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,26	0,00
<b>18:0 10-methyl, TBSA</b>	6,33	6,67	4,44	5,81	7,19	1,13	8,08
<b>19:0 iso</b>	0,00	1,95	1,36	1,65	1,58	1,55	2,17
<b>20:4 w6,9,12,15c</b>	0,00	2,08	3,91	1,90	1,92	1,34	1,79
<b>20:0 iso</b>	7,82	5,18	4,88	3,85	3,65	5,03	4,40
<b>20:1 w9c</b>	0,00	0,51	0,47	0,44	0,00	0,00	0,00
<b>20:1 w7c</b>	0,00	3,16	2,53	2,11	1,89	2,68	2,91
<b>20:00</b>	7,43	3,95	3,87	2,50	2,97	3,54	3,23