

Análise do potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo

Analysis of microbial potential of a biopile in soil bioremediation contaminated by petroleum hydrocarbons

Ramiro Pereira Bisognin^{1*}, Diosnel Antonio Rodriguez López²,
Maria Viviane Gomes Muller², Alexandre Rieger²

RESUMO

A presente pesquisa avaliou o potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos, montada em uma base de distribuição de combustíveis na região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Desta biopilha, foram avaliadas as concentrações dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e de compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), em nove pontos, durante quatro etapas de operação e em três profundidades por ponto. De cada coleta, também foram reservadas amostras de solo para realização das análises microbiológicas. A partir dessas amostras, buscou-se identificar fungos e leveduras pela análise de suas estruturas reprodutivas em lâminas de microcultivo, e bactérias pela técnica da Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) e sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S. Ainda, avaliou-se a capacidade dos microrganismos isolados em degradar óleo diesel comercial, utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Como resultado deste estudo, observaram-se elevados percentuais de redução nas concentrações de HTP e BTEX na biopilha, como 92 e 100%, respectivamente. Das amostras de solo da biopilha, foram isoladas 101 cepas de microrganismos, das quais foram identificadas 19 cepas de fungos filamentosos, 34 de bactérias e 1 de levedura. Os resultados evidenciaram a capacidade de alguns gêneros de fungos, como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Verticillium*, e bactérias, como *Bacillus spp.* e *Streptomyces sp.*, em degradar hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel comercial.

Palavras-chave: combustíveis; solos contaminados; microrganismos; biorremediação.

ABSTRACT

This research evaluated the microbial potential of a biopile in bioremediation of soils contaminated by hydrocarbons, mounted on a fuel distribution base in the metropolitan region of Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Of this biopile were evaluated concentrations of total petroleum hydrocarbons (TPH) and benzene compounds, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) at nine points, for four stages of operation and a point in three depths. Of each collection were also reserved sampled soil to perform the microbiological testing. From the samples, we sought to identify fungi and yeasts by analyzing their reproductive structures microcultivation blades, and bacteria by the technique of Polymerase Reaction Chain (PCR) and gene sequencing encoding the 16S rRNA. Still, we evaluated the ability of microorganisms to degrade commercial diesel oil, using the redox indicator 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP). As result of this study, there was a high percentage reduction in the concentration of TPH and BTEX in biopilha as 92 and 100%, respectively. Of soil samples were isolated from biopilha 101 strains of microorganisms, of which 19 were identified strains of filamentous fungi and 34 bacterial yeast. The results showed the ability of some genera of fungi such as *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* and *Verticillium* and bacteria such as *Bacillus spp.* and *Streptomyces sp.* to degrade hydrocarbons constituents of commercial diesel oil.

Keywords: fuels; contaminated soil; microorganisms; bioremediation.

¹Professor da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS) - Três Passos (RS), Brasil.

²Professor(a) adjunto(a) da Universidade de Santa Cruz do Sul - Santa Cruz do Sul (RS), Brasil.

*Autor correspondente: ramirobisognin@yahoo.com.br

Recebido: 29/06/2015 - Aceito: 08/03/2017 - Reg. ABES: 150746

INTRODUÇÃO

A contaminação do ambiente por hidrocarbonetos de petróleo consiste em uma grande preocupação para a saúde humana e para a qualidade ambiental em todo o mundo, tendo em vista os efeitos carcinogênicos, mutagênicos, neurotóxicos e imunotóxicos dos produtos de petróleo compostos por uma mistura complexa de milhares de substâncias químicas (VARJANI & UPASANI, 2016; MARCHAND *et al.*, 2017). Para atenuar essa problemática, causada principalmente por vazamentos de combustíveis, têm sido realizadas inúmeras pesquisas de remediação de sítios contaminados por hidrocarbonetos, com destaque para as técnicas de biorremediação, por serem consideradas mais seguras, menos onerosas e menos agressivas ao meio ambiente (MARCHAL *et al.*, 2003; MARIANO *et al.*, 2008; BESKOSKI *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2015; BALDAN *et al.*, 2015; PACWA-PLOCINICZAK; PLAZA; PIOTROWSKA-SEGET, 2016).

A biorremediação é uma tecnologia empregada para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes-alvo, transformando-os em produtos menos complexos (GOMEZ & SARTAJ, 2014). A biorremediação pode ocorrer de forma intrínseca ou natural, isto é, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação, mas também pode ser bioestimulada com a adição de nutrientes, oxigênio e surfactantes, ou ainda pode ser bioampliada com a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (BENTO *et al.*, 2003; AGNELLO *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a biorremediação por biopilhas, também conhecidas como biocélulas, biomontes ou pilhas de compostagem, consiste em um amontoar de solos contaminados em pilhas, em que se estimula a atividade microbiana aeróbia, inclusive aquela já presente no solo contaminado (MARCHAL *et al.*, 2003), com o fornecimento de oxigênio, umidade, nutrientes e/ou consórcios microbianos para degradar os compostos de petróleo (BALDAN *et al.*, 2015). Tais condições tornam o sistema de biopilha confiável para reduzir a concentração de compostos derivados de petróleo de solos escavados (GOMEZ & SARTAJ, 2014), sendo largamente utilizadas na América do Norte, e em outras regiões do mundo, para reabilitação de diferentes sítios impactados por hidrocarbonetos de petróleo (BALDAN *et al.*, 2015).

Ante o exposto, este artigo objetivou avaliar a efetividade de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos, bem como isolar, selecionar e identificar diferentes grupos de microrganismos presentes no sistema estudado, a fim de verificar sua capacidade de degradação de óleo diesel comercial.

METODOLOGIA

Origem dos solos contaminados para montagem da biopilha estática

A biopilha analisada, de 600 m³, foi montada em uma distribuidora de produtos de petróleo na região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande

do Sul, com solos contaminados removidos de diferentes postos de combustíveis do Estado. As detecções de contaminação foram realizadas durante as substituições dos tanques de combustíveis, por meio da avaliação da concentração dos compostos orgânicos voláteis (COV), com um monitor portátil de gases modelo Gastech Innova SV. Para tanto, se utilizou a metodologia *Head Space*, sendo removidos para tratamento os solos com concentrações superiores a 500 ppm.

Coleta das amostras de solo e monitoramento dos contaminantes derivados de petróleo

As amostras de solo para monitoramento dos contaminantes foram coletadas no início da operação da biopilha, denominado tempo zero, e após 30, 80 e 130 dias de operação, em 9 pontos do sistema e em 3 profundidades, 50, 95 e 140 cm. A cada profundidade, as porções de solo dos 9 pontos foram homogeneizadas e enviadas a laboratório credenciado na Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler (FEPAM), Rio Grande do Sul, onde foram analisadas as concentrações de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), respectivamente, pelos métodos USEPA 8015D e USEPA 5021A/USEPA 8021B. Com exceção do tempo zero, as amostras de solo para ensaios microbiológicos foram coletadas nas mesmas condições, porém foram acondicionadas em frascos de 100 g previamente esterilizados.

Isolamento, seleção e identificação de microrganismos da biopilha

As análises microbiológicas foram realizadas separadamente para cada etapa de operação e profundidade amostrada na biopilha. De cada amostra, foram dissolvidas alíquotas de 10 g de solo em 90 mL de água peptona a 0,1% para a obtenção da suspensão inicial. A partir dessa suspensão, foram preparadas diluições sucessivas até 10⁻⁵. Foi feito plaqueamento de cada diluição em três meios de cultura, com a transferência de 100 µL das suspensões às placas de Petri, segundo a técnica de espalhamento em superfície descrita por Antunes (1995), a qual foi realizada em triplicata.

Os meios de cultura utilizados para crescimento microbiano foram: ágar nutriente (Difco) em pH 6,8 para o cultivo de bactérias, permanecendo as placas incubadas por 7 dias em estufa bacteriológica a 35°C; ágar Sabouraud (Difco) acidificado para pH 4,5 com HCl 1M, além da adição de 80 mg.L⁻¹ de cloranfenicol para o cultivo de fungos e leveduras, permanecendo as placas incubadas à temperatura controlada de 25°C por 15 dias; e ágar amido caseína (ACA; Difco), pH 7,0 para o cultivo de actinomicetos, sendo as placas incubadas por duas semanas em estufa bacteriológica a 35°C.

Identificação fúngica

A técnica de microcultivo elaborada por Riddel e descrita por Holt, Williams e Sharpe (1989) foi utilizada para a identificação das colônias filamentosas. Após período de crescimento vegetativo e esporulação, cada lamínula foi observada a fim de comparar as características microscópicas e as

estruturas reprodutivas das colônias de acordo com chaves de identificação (BARNETT & HUNTER, 1998; VIDOTTO, 2004; QUADROS *et al.*, 2009).

Identificação molecular bacteriana

A extração do DNA genômico das bactérias submetidas à identificação molecular foi realizada segundo o protocolo de Soumet *et al.* (1994) citado por Freschi, Carvalho e Oliveira (2005), com adaptações. Os microrganismos isolados foram inoculados em Caldo BHI e incubados a 37°C por 24 h. Após esse período, 1,5 mL do caldo foram centrifugados a 13.000 g por 3 min. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos em 100 µL de água MiliQ, incubados a 95°C por 10 min e centrifugados. O sobrenadante foi transferido para microtubo e armazenado a -5°C. O DNA extraído foi quantificado usando o Kit Nano Drop 2000 C.

Oligonucleotídeos iniciadores

As amostras de DNA foram submetidas à amplificação do DNAr 16S usando os oligonucleotídeos iniciadores universais, 968 R (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') e 1401 F (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'), os mesmos utilizados por Felske *et al.* (1998) citado por Cébron *et al.* (2008) para quantificar sequências de nucleotídeos em comunidades bacterianas complexas obtidas a partir de amostras de solo.

Amplificação do fragmento DNAr 16S

A amplificação do DNAr 16S foi realizada com base na metodologia descrita por Vasconcelos *et al.* (2009), com adaptações. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão de reação (1x), suplementado com 1,5 µL de MgCl₂ (1.5 mM), 2,5 µL de dNTP (0.2 mM), 1 µL de cada primer (0.4 pM), 0,2 µL de Taq polimerase (1 U) e 1 µL de DNA (100 ng.µL⁻¹). Após desnaturação inicial de 5 min a 95°C, as reações foram submetidas a 35 ciclos de amplificação, sendo 1 min de desnaturação a 95°C, seguido de 1 min de anelamento a 55°C, 1 min de extensão a 72°C, e extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (3 µL.60 mL⁻¹ de gel).

Purificação e verificação das sequências de nucleotídeos

Para purificação do DNA foi utilizado o *kit* de extração Ludwig Biotec EZ-10, conforme instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado usando o *kit* Nano Drop 2000 C e armazenado em *freezer* a -5°C. As amostras obtidas foram enviadas para sequenciamento na empresa ACT Gene Análises Moleculares Ltda., utilizando o equipamento ABI-PRISM 3100 *Genetic Analyzer*.

A verificação das sequências de nucleotídeos dos fragmentos de DNAr amplificados foi realizada através do *software* Sequence Scanner v 1.0. A partir desse *software*, foram selecionadas sequências com alta pureza de bases para comparação com os dados Genbank da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search*), como descreve Zhang *et al.* (2011). A identificação das bactérias foi realizada pela comparação

da sequência de nucleotídeos selecionada com aquelas cadastradas no banco de dados do aplicativo, considerando percentuais superiores a 99% de cobertura da consulta e 100% de similitude entre as sequências, bem como *E-value* igual a 0, o que torna a consulta mais confiável.

Avaliação do potencial de biodegradação do óleo diesel pelos microrganismos isolados

Para avaliar a capacidade de biodegradação, as cepas isoladas da biopilha foram submetidas à padronização, sendo os inóculos microbianos preparados em 5 mL de solução salina estéril a 0,85% (8,5 g.L⁻¹ NaCl). A concentração do inóculo foi padronizada comparando sua turbidez com o padrão 0,5 da escala de McFarland em espectrofotômetro de luz UV-vis (Quimis, modelo Q-798-U), sob absorvância de 580 nm. Essa turvação é semelhante à padronizada para o antibiograma, e o resultado da absorvância deve estar entre 0,08 e 0,10, o que equivale a 1,5×10⁸ UFC.mL⁻¹. A solução equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland foi preparada com 0,05 mL de BaCl₂ em 9,95 mL de H₂SO₄, ambos à concentração de 1% (USPC, 1990; NCCLS, 2002).

A avaliação do potencial de biodegradação de hidrocarbonetos foi realizada em duplicata, com base na metodologia descrita por Hanson, Desai e Desai (1993), que consiste na utilização do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) em meio mineral Bushnell-Haas (BH) contendo (g.L⁻¹): MgSO₄.7H₂O: 0,2; CaCl₂.2H₂O: 0,02; KH₂PO₄: 1,0; K₂HPO₄: 1,0; NH₄NO₃: 1,0; FeCl₃: 0,05; com um derivado de petróleo em microplaca, onde a degradação do poluente é entendida quando ocorre a mudança de cor do indicador de azul para incolor, no meio de cultivo. No entanto, a metodologia original foi adaptada, em vez de se utilizar multipoços e cultivo estático, os experimentos foram realizados em tubos de ensaio incubados em mesa agitadora. A fonte de carbono utilizada foi óleo diesel comercial. Combustíveis como a gasolina poderiam mascarar a interpretação dos resultados em função da volatilização de seus compostos.

Os experimentos foram realizados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultivo BH, 125 µL do indicador redox DCPIP (0,12 mg.mL⁻¹), 53 µL de óleo diesel e 150 µL de suspensão microbiana padronizada em 1,5×10⁸ UFC.mL⁻¹. Foram preparados dois tubos como controles abióticos e bióticos, ou seja, um controle negativo contendo 150 µL de água estéril, em substituição a suspensão microbiana e outro positivo, com o consórcio de microrganismos, porém sem óleo diesel. O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 15 min, sem a fonte de carbono, sendo o óleo diesel acrescentado ao meio de cultivo após filtragem em membrana de 0,45 µm. Os tubos de ensaio com rosca foram tampados e mantidos a 30°C em mesa agitadora a 200 rpm, sendo observados a cada 12 horas, não transpassando o tempo total avaliado de 96 horas. A positividade do teste foi observada por meio da alteração da coloração do meio, de azul para incolor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo e compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos na biopilha

A avaliação da redução dos HTP pela biopilha foi realizada com base no somatório das frações *Gasoline Range Organic* (GRO), *Diesel Range Organic* (DRO) e *Oil Range Organic* (ORO). Os resultados apresentados na Figura 1 correspondem à média dos nove pontos de amostragem da biopilha, com valores máximos e mínimos, e para cada ponto foram homogeneizadas porções de solo das profundidades de 50 a 140 cm.

De acordo com a curva de redução da concentração de HTP, percebe-se a existência de três etapas de degradação durante o tratamento. Uma delas é observada nos primeiros 30 dias de operação com a redução da concentração média de HTP de 9.833 mg.kg⁻¹ para 2.907,83 mg.kg⁻¹, ou seja, pouco mais de 70%. Nesta etapa, foi evidenciada a maior taxa de degradação, equivalente a 230,84 mg.kg⁻¹.já a segunda etapa de degradação foi observada entre 30 e 80 dias de operação, e a redução da concentração média de HTP foi de 2.907,83 mg.kg⁻¹ para 468,73 mg.kg⁻¹, ou seja, redução de 83,88%, à taxa de degradação de 2.439,10 mg.kg⁻¹ em 50 dias (48,78 mg.kg⁻¹.dia⁻¹). As reduções significativas verificadas nas duas primeiras etapas podem ser atribuídas, principalmente, a dois fatores: a decomposição de compostos de cadeia molecular mais simples e, conseqüentemente, mais facilmente biodegradáveis, e também ao maior potencial de volatilização desses compostos (WANG *et al.*, 2016).

Ao final da operação da biopilha, foi observada uma queda nas taxas de biodegradação, inclusive com a elevação da concentração média de HTP de 329,69 mg.kg⁻¹ em relação à amostragem anterior. Apesar desse aumento, os valores finais se enquadram nos intervalos de desvio padrão correspondentes às concentrações dos diferentes pontos de análise. Essa pequena elevação na concentração de HTP após o 80º dia de tratamento pode estar associada à heterogeneidade dos solos contaminados, bem como do próprio processo de degradação, haja vista a presença de grandes cadeias moleculares na composição

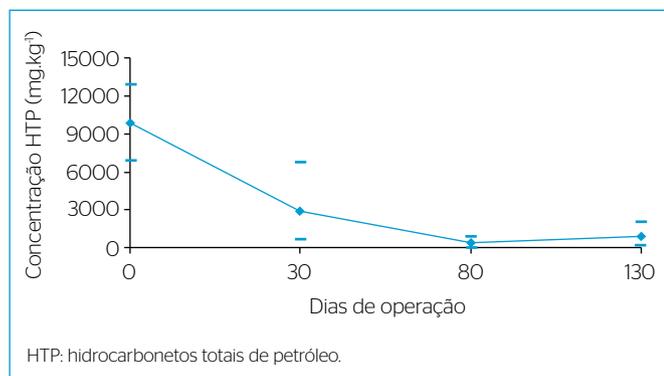


Figura 1 - Redução média da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo pela biopilha composta por solos contaminados com combustíveis de postos de revenda do Rio Grande do Sul.

dos HTP que ao serem quebradas podem originar novos compostos (VARJANI & UPASINI, 2016).

Após 130 dias de operação da biopilha, a concentração média de HTP nos solos foi de 798,42 mg.kg⁻¹, bem abaixo do valor de alerta (limite de 2.525 mg.kg⁻¹) estipulado na Lista Holandesa para solos com teor de 25% de argila e 10% de matéria orgânica, como os solos desta pesquisa. A redução da concentração média de HTP, em relação à concentração inicial, foi de aproximadamente 92%, minimizando os riscos à saúde humana e ao meio ambiente, como bem informa a Lista Holandesa desenvolvida pelo Ministério de Planejamento Territorial e Meio Ambiente da Holanda (CETESB, 2004). Ressalta-se que esse parâmetro não é contemplado pela Resolução CONAMA nº 420/2009 e por isso adotou-se a Lista Holandesa de 1999.

As maiores taxas de biodegradabilidade e eficiência evidenciadas nos primeiros 80 dias de tratamento provavelmente estão relacionadas à degradação e volatilização do HTP-GRO (C₅-C₁₀), seguidas do HTP-DRO (C₁₁-C₂₈). Tal fato é explicado por Wang *et al.* (2016) e Marchal *et al.* (2003) ao descreverem que os compostos com cadeias moleculares mais simples são preferencialmente biodegradados e apresentam maior volatilização. Logo, as cadeias moleculares mais complexas do óleo diesel e, principalmente, de óleos lubrificantes, representativas do HTP-ORO (>C₂₀-C₃₆), são menos voláteis e biodegradáveis.

Outras razões poderiam explicar a queda na taxa de biodegradação evidenciada entre 80 e 130 dias de operação. Uma delas pode estar associada à baixa capacidade que os microrganismos apresentam de atuarem diretamente sobre poluentes adsorvidos no solo, como o caso dos hidrocarbonetos de elevado peso molecular, que muitas vezes se ligam fortemente a substâncias húmicas e a minerais argilosos (LÖSER *et al.*, 1999). A formação de subprodutos complexos originados pela ação de grupos específicos de microrganismos sobre os hidrocarbonetos também pode contribuir com a inibição da atividade de outros microrganismos presentes no solo contaminado.

Beskoski *et al.* (2011), trabalhando com uma biopilha dinâmica de aproximadamente 600 m³ de material, também observaram que a degradação de HTP foi mais rápida durante os primeiros 50 dias de operação, passando, em seguida, a ocorrer de forma mais lenta. Segundo os autores, embora a degradação não tenha sido claramente linear durante todo o processo, as concentrações de HTP apresentaram redução de 3.100 mg.kg⁻¹ durante os primeiros 50 dias, 800 mg.kg⁻¹ entre 50 e 100 dias, e 1.000 mg.kg⁻¹ entre 100 e 150 dias. Esses autores observaram um aumento na população microbiana durante os primeiros 50 dias ao mesmo tempo em que a concentração de hidrocarbonetos diminuiu. Comportamento muito similar a esse relato foi observado na presente pesquisa, mesmo com aplicação de biopilha estática.

Os resultados de degradação média dos compostos BTEX pela biopilha, nos mesmos pontos de amostragem das análises de HTP, estão apresentados na Figura 2.

Conforme a Figura 2, as concentrações dos compostos BTEX, durante a montagem do sistema, se encontravam bem abaixo dos Valores de Intervenção (VI) para tolueno, etilbenzeno e xilenos, segundo a Resolução

CONAMA nº 420/2009, tendo como referência áreas residenciais, uma vez que os solos foram removidos de postos localizados em áreas urbanas. Em função de sua maior toxicidade e solubilidade comparada aos demais compostos citados, o benzeno apresenta concentração mais restritiva. Com relação aos Valores de Prevenção (VP) dessa mesma Resolução, as concentrações obtidas no solo bruto foram superiores para o benzeno e para os isômeros do xileno. No entanto, logo após 30 dias de operação da biopilha, as concentrações dos compostos BTEX, indicadores principalmente de vazamentos de gasolina, se encontravam abaixo de $0,005 \text{ mg.kg}^{-1}$.

A redução apresentada na Figura 2 representa, respectivamente, eficiência de degradação de 96; 87,50; 97,33 e 98,59% para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros do xileno nos primeiros 30 dias de operação. Após 80 dias de tratamento, os compostos BTEX não foram mais detectados, representando, ao final do período de tratamento, uma eficiência de 100%. A eliminação desses compostos é extremamente importante em função de sua alta solubilidade em água.

Seleção, isolamento e identificação de microrganismos da biopilha

A partir das amostras de solo da biopilha, foram selecionadas e isoladas 101 colônias com diferentes características macroscópicas entre si, de maior representatividade e predominância. Segundo Orphan *et al.* (2000), somente 1% dos microrganismos presentes no ambiente são cultiváveis, isto é, podem ser recuperados em condições de laboratório. Portanto, esses isolados representam uma pequena parcela da microbiota presente nos solos em tratamento.

As características macro e microscópicas e as estruturas reprodutivas de cada cultura filamentosa, isoladas em ágar Sabouraud, foram comparadas com as descritas por Barnett e Hunter (1998), Vidotto (2004) e Quadros *et al.* (2009). Com essa técnica foi possível identificar o gênero de 19 fungos filamentosos, apresentados na Tabela 1, e de uma levedura identificada como *Candida sp.*, conforme profundidade e período de amostragem.

Como apresentado na Tabela 1, entre os fungos filamentosos isolados, verificou-se a predominância de quatro colônias do gênero *Trichoderma*, seguidas de três diferentes colônias de *Aspergillus*, *Microsporium* e *Penicillium*, assim como duas colônias de *Cladosporium* e *Cephalosporium*,

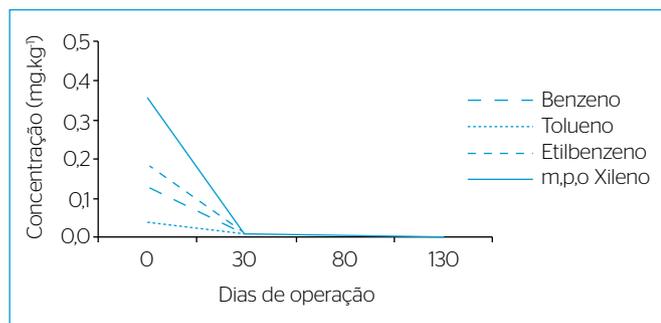


Figura 2 - Redução da concentração de compostos benzeno, tolueno, e xilenos (BTEX) pela biopilha composta por solos contaminados com combustíveis de postos de revenda do Rio Grande do Sul.

e uma de *Diplosporium* e outra de *Verticillium*. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam os relatos de outros autores como Gadd (2001) e Chaillan *et al.* (2004) quando descrevem que os fungos filamentosos apresentam maior capacidade de degradação de compostos mais recalcitrantes, uma vez que grande parte deles foi isolada de amostras coletadas nas zonas mais profundas e ao final do processo de tratamento. Tal fato pode ser facilmente constatado na Tabela 1, pela maior ocorrência e diversidade de gêneros de fungos logo após a degradação daqueles compostos de baixo peso molecular, como é o caso dos compostos BTEX e HTP da série GRO, que compõem a gasolina e que são, segundo Gadd (2001), preferencialmente degradados por bactérias.

Apesar de o gênero *Diplosporium* não ser citado por Vidotto (2004), o autor relata que os demais gêneros identificados neste estudo podem ser facilmente encontrados no ambiente, principalmente no ar e no solo, e muitos deles apresentam potencial patogênico, podendo causar inúmeras doenças nos seres humanos.

Quanto à identificação molecular das bactérias, das 80 cepas isoladas em ágar nutriente e amido caseína, 60 tiveram seu DNA extraído e o DNAr 16S amplificado, tendo sido possível amplificar o DNAr 16S de 49, os quais, após a etapa de purificação, foram submetidos à sequenciamento automatizado. Como resultado do sequenciamento e comparação com os dados Genbank da ferramenta BLAST, foram identificadas 35 cepas. Segundo Souza e Lifschitz (2007), essa ferramenta procura identificar a completa semelhança entre a sequência de consulta e as sequências do banco de dados, estendendo o subconjunto de bases em ambas as direções a fim de ampliar a região de similaridade.

Tabela 1 - Colônias de fungos filamentosos isolados e identificados nos solos da biopilha em diferentes profundidades e período de operação do sistema.

Gênero de fungos filamentosos identificados	Profundidade (cm) em que as colônias foram isoladas	Número de colônias isoladas em função do período de operação da biopilha (dias)		
		30	80	130
<i>Aspergillus sp.</i>	50	1	-	-
	140	-	-	2
<i>Cephalosporium sp.</i>	95	-	-	2
<i>Cladosporium sp.</i>	50	-	1	-
	140	-	-	1
<i>Diplosporium sp.</i>	95	-	-	1
<i>Microsporium sp.</i>	95	-	2	-
	140	-	1	-
<i>Penicillium sp.</i>	50	-	1	-
	95	-	-	1
<i>Trichoderma sp.</i>	140	-	-	1
	50	-	2	-
<i>Verticillium sp.</i>	140	-	-	2
	50	-	1	-

A relação das colônias de bactérias isoladas e identificadas está apresentada na Tabela 2, assim como sua distribuição em profundidade na biopilha e no período de amostragem em que foram isoladas.

Conforme a Tabela 2, as 35 cepas identificadas são pertencentes a dois gêneros, *Bacillus* e *Streptomyces*, sendo evidente a predominância do gênero *Bacillus* com diferentes espécies, como: *B. subtilis*; *B. pumilus*; *B. cereus*; *B. licheniformis*; *B. amyloliquefaciens* e *B. simplex*. Contudo, não foi possível identificar claramente as espécies das demais cepas de *Bacillus* em função da compatibilidade das sequências entre mais de uma espécie. Tal fato pode ser explicado pelo provável rompimento das fitas do DNAr durante as etapas de extração e/ou manuseio para amplificação e purificação. Isso pode acarretar uma redução na pureza das bases e, conseqüentemente, no fragmento de DNAr aproveitável. Assim, com uma sequência de nucleotídeos menor, há maior probabilidade de o fragmento selecionado ser compatível com a sequência de outras espécies cadastradas no banco de dados da ferramenta BLAST. Dessa forma, as espécies que apresentaram altos percentuais de compatibilidade de bases entre si foram: *B. cereus* e *B. thuringiensis*; *B. cereus* e *B. anthracis*; *B. vallismortis* e *B. subtilis*; *B. subtilis* e *B. licheniformis*; *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*; *B. flexus* e *B. megaterium* e; *B. pumilus* e *B. safensis*.

Como apresentado na Tabela 2, a maior concentração e diversidade de colônias de bactérias foram isoladas no 30º dia de operação

da biopilha, período em que se evidenciou maior redução na concentração de HTP e compostos BTEX, característicos de cadeias menos complexas. Esses resultados condizem com o disposto por Gadd (2001) e Chaillan *et al.* (2004), em que as bactérias possuem maior atividade sobre os hidrocarbonetos de menor peso molecular. Entre 80 e 130 dias de operação, quando a matéria orgânica já não era mais abundante, observou-se uma redução significativa na diversidade de bactérias.

A Tabela 2 ainda permite ressaltar algumas observações em relação à distribuição das culturas, uma vez que as colônias de *B. licheniformis* foram obtidas nas maiores profundidades e nas etapas finais do tratamento, o que pode indicar que a espécie degrada preferencialmente compostos mais complexos, característicos dos cenários em que foram isoladas, além de que, segundo El-Sheshtawy *et al.* (2016), são produtoras de biosurfactantes, o que facilita a degradação de frações mais complexas de petróleo. As espécies *B. pumilus* e *B. simplex* apresentaram comportamento inverso a *B. licheniformis*, pois foram isoladas sempre na menor profundidade de coleta e nas etapas iniciais do tratamento, enquanto a *B. subtilis* foi encontrada em todas as profundidades da biopilha e etapas do tratamento. Isso pode indicar alta resistência da espécie *B. subtilis* a hidrocarbonetos.

A predominância de *Bacillus* spp. sugere sua grande adaptação a ambientes contaminados em função do seu excelente potencial de biodegradação

Tabela 2 - Colônias de bactérias isoladas e identificadas nos solos da biopilha em diferentes profundidades e período de operação do sistema.

Gênero	Espécie	Profundidade (cm) em que foram isoladas	Número de colônias isoladas conforme período de operação da biopilha (dias)		
			30	80	130
<i>Bacillus</i>	<i>sp.</i>	50	4	1	-
		95	1	-	-
		140	-	-	1
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i> ou <i>thuringiensis</i>	50	1	1	-
		95	-	1	-
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i> ou <i>anthracis</i>	50	1	-	-
<i>Streptomyces</i>	<i>sp.</i>	50	-	1	-
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	50	2	1	-
		95	-	-	1
		140	-	1	-
<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	50	3	-	-
<i>Bacillus</i>	<i>vallismortis</i> ou <i>subtilis</i>	140	1	-	-
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	50	1	-	1
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i> ou <i>licheniformis</i>	95	-	-	1
<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>	95	-	-	2
		140	-	1	1
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i> ou <i>amyloliquefaciens</i>	95	1	-	1
<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	50	1	-	-
<i>Bacillus</i>	<i>flexus</i> ou <i>megaterium</i>	50	1	-	-
<i>Bacillus</i>	<i>simplex</i>	50	1	-	-
<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i> ou <i>safensis</i>	50	2	-	-

de hidrocarbonetos, destacado por Toledo *et al.* (2006), principalmente após a ocorrência de outras linhagens que iniciam a biodegradação dos compostos. Vasconcelos *et al.* (2009) descrevem outra suposta explicação para a predominância do gênero *Bacillus* nos meios de cultivo. Os autores evidenciaram que essas culturas apresentam halos de crescimento sobre o consórcio microbiano aeróbio, principalmente a espécie *B. pumilus*, com halos de cerca de 1 cm, seguida da *B. megaterium* com halos pouco menores, que muitas vezes impedem ou dificultam o crescimento de outras espécies.

A colônia de actinomicetos identificada como *Streptomyces* sp. foi encontrada na menor profundidade avaliada, no 80º dia de operação do sistema, período em que foi constatado crescimento no número de colônias de fungos, atribuído em razão das características do substrato disponível. Segundo Suutari *et al.* (2002), esse gênero de actinomicetos é característico de solos e apresenta excelente potencial competidor, visto sua habilidade em produzir compostos que controlam o crescimento de outras bactérias e fungos. Essa propriedade do gênero *Streptomyces*, somada à presença de compostos mais refratários, pode ter contribuído para a redução do número de bactérias evidenciado justamente nessa etapa. Chaillan *et al.* (2004) observaram que os actinomicetos, assim como os fungos, foram capazes de degradar alcanos mais complexos de elevado peso molecular na etapa final do processo, o que explicaria a ocorrência *Streptomyces* sp. na etapa intermediária do processo, quando se iniciava uma etapa de maior restrição de substrato.

Avaliação do potencial de biodegradação do óleo diesel pelos microrganismos isolados

O teste de biodegradação do óleo diesel foi realizado a fim de avaliar a capacidade das cepas em biodegradar a principal fonte de contaminação dos solos tratados neste trabalho. Para tanto, foi utilizado o indicador redox DCPIP em meio BH. De acordo com Hanson, Desai e Desai (1993), esse teste está fundamentado pelo princípio de que, durante a oxidação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos, os elétrons são transferidos até receptores como oxigênio, nitrato e sulfato. No momento que se tem a incorporação de um receptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato pela observação da mudança de cor do corante de azul (oxidado) para incolor (reduzido). Portanto, como os inóculos são adicionados em concentrações iguais, a habilidade relativa das diferentes culturas pode ser avaliada dependendo do tempo despendido para a mudança de cor do indicador redox, no meio de cultivo (HANSON; DESAI; DESAI, 1993). Varjani e Upasani (2016) utilizaram o indicador redox DCPIP para avaliar o potencial da linhagem *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 na biodegradação de petróleo bruto, tendo obtido resultados positivos com o método.

Os resultados dos testes de biodegradação do óleo diesel comercial por fungos e bactérias estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 3 e 4, em que a letra inicial se refere ao meio de cultivo, seguido do número do isolado e sua identificação, quando possível.

O teste de biodegradação do óleo diesel por fungos demonstrou que 38% das colônias avaliadas descoloriram totalmente as soluções contendo o indicador redox. Logo, entende-se que esses fungos foram capazes de biodegradar o óleo diesel comercial sem que houvesse a interação e a dependência de substratos resultantes do metabolismo de outras espécies. Entretanto, outra parcela correspondente a 38% dos isolados apresentou descoloração parcial média, e 19% praticamente não promoveram alteração na cor das soluções. Essa avaliação permitiu constatar maior eficiência das colônias fúngicas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Verticillium*. No entanto, isso não significa que os demais gêneros identificados neste estudo, e até mesmo outras espécies pertencentes a esses gêneros, não exerçam atividades metabólicas diante do contaminante, já que todos os tubos contendo fungos apresentaram crescimento celular durante o teste. Logo, esses microrganismos também apresentaram capacidade de degradar compostos presentes no óleo diesel, uma vez que a fonte de carbono presente nas soluções estava restrita ao contaminante.

Estudando o potencial de biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) de petróleo por 95 bactérias e 160 fungos com o DCPIP, p-iodonitrotetrazólio (INT) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), Marchand *et al.* (2017) comprovaram, por CG-EM, a capacidade de degradação superior a 10, 13, 8 e 17%, respectivamente, dos compostos antraceno, fenantreno, fluoreno e pireno por *Rhodococcus* sp., *Trichoderma tomentosum* e *Fusarium oxysporum* em 49 dias. Tal resultado reforça a capacidade de degradação de HPA pelos gêneros de fungos identificados neste estudo.

Outro estudo realizado por Silva, Grossman e Durrant (2009) também verificou a capacidade que diferentes espécies dos gêneros *Aspergillus* e

Tabela 3 – Teste de biodegradabilidade do óleo diesel comercial, com o indicador redox DCPIP, por fungos isolados da biopilha. A alteração total da cor do indicador refere-se à capacidade de biodegradação do combustível como única fonte de carbono.

Fungos isolados em ágar Sabouraud	Alteração da cor do indicador redox DCPIP
S1 (<i>Aspergillus</i> sp.); S4 e S17 (<i>Trichoderma</i> sp.); S6 e S14 (<i>Penicillium</i> sp.); S12 (<i>Cladosporium</i> sp.); S16 (<i>Verticillium</i> sp.) e S20 (<i>Cephalosporium</i> sp.)	Total
S15 (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	Parcial bom
S2; S8 e S11 (<i>Microsporium</i> sp.); S3 (<i>Penicillium</i> sp.); S7 (<i>Diplosporium</i> sp.); S9 (<i>Cephalosporium</i> sp.); S10 (<i>Aspergillus</i> sp.) e S13 (<i>Trichoderma</i> sp.)	Parcial
S5 (<i>Trichoderma</i> sp.); S18 (<i>Cladosporium</i> sp.); S19 (<i>Candida</i> sp.) e S21	Parcial ruim

DCPIP: 2,6-diclorofenol indofenol.

Verticillium apresentam em degradar HPA. No entanto, esses pesquisadores ainda observaram que o gênero *Verticillium* possui maior atividade nos compostos mais complexos, de alto peso molecular, ao passo que algumas espécies do gênero *Aspergillus* se apresentam aptas a degradar tanto compostos simples como complexos, mesmo em baixas concentrações de oxigênio.

Nesse mesmo sentido, Vasco et al. (2011) avaliaram a diversidade de fungos filamentosos em solos previamente submetidos à biorremediação com consórcios de bactérias, em três campos de exploração de petróleo, e verificaram que 60% dos gêneros identificados apresentavam relatos na literatura como degradadores de hidrocarbonetos, como exemplo *Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp. e *Penicillium* sp. Segundo os autores, apenas três espécies de fungos filamentosos foram encontrados nos três campos analisados, *Penicillium chermesinum*, *Penicillium indicum* e *Aspergillus terreus*.

De acordo com a Tabela 4, das 80 colônias de microrganismos isoladas em ágar nutriente e amido caseína, 31 (38,75%) apresentaram alteração total da cor do indicador diluído no meio de cultivo, ou seja, foram capazes de biodegradar o óleo diesel comercial sem a dependência de outras espécies. Outras sete cepas avaliadas apresentaram bons resultados, porém não foram capazes de degradar totalmente o contaminante. Além disso, 31 colônias isoladas apresentaram capacidade de alterar parcialmente a cor do indicador e mais 11 praticamente não alteraram a cor das soluções,

Tabela 4 – Teste de biodegradabilidade do óleo diesel comercial, com o indicador redox DCPIP, por bactérias isoladas da biopilha. A alteração total da cor do indicador refere-se à capacidade de biodegradação do combustível como única fonte de carbono.

Bactérias isoladas em ágar nutriente e amido caseína	Alteração da cor do indicador redox DCPIP
N1; N2, N14 e C83 (<i>B. subtilis</i>); N3, N4 e N8 (<i>B. pumilus</i>); N10 (<i>Bacillus</i> sp.); N11; N13; C19 e N45 (<i>B. cereus</i>); C22, N72, N67 (<i>B. cereus outhuringiensis</i>); C25; C26 (<i>Bacillus</i> sp.); C27; C30 (<i>B. cereus</i> ou <i>anthracis</i>); C31 e N41 (<i>Bacillus</i> sp.); N44 (<i>B.vallismortis</i> ou <i>subtilis</i>); N51(<i>B. subtilis</i> ou <i>licheniformis</i>); N63, N71, N74 e C87 (<i>B.licheniformis</i>); N79; C48 (<i>Bacillus</i> sp.); C66 (<i>Streptomyces</i> sp.) e C89 (<i>B.subtilis</i> ou <i>amyloliquefaciens</i>)	Total
C17; C35; N40; C57 e N69 (<i>B. subtilis</i>); C53 e C55	Parcial bom
N5 (<i>B. simplex</i>); N6 e N7 (<i>B. pumilus</i> ou <i>safensis</i>); N9; N15; C18 (<i>B. amyloliquefaciens</i>); C20 (<i>B. flexus</i> ou <i>megaterium</i>); C21 e C81 (<i>Bacillus</i> sp.); C24; C28; C29; C32; C34; C36; N38; N39 (<i>B. subtilis</i> ou <i>amyloliquefaciens</i>); N42; N43; N64; N68; N70; N75; N76; N78; N80; C47; C49; C56; C61 e C82*	Parcial
N12; C16; C23; N46; N65; N73; C52; C59; C60; C62 e C84	Parcial ruim

DCPIP: 2,6-diclorofenol indofenol; *Levedura crescida em ágar amido caseína.

além de apresentarem baixo crescimento celular. As bactérias identificadas em nível de espécie com os melhores resultados no teste de biodegradação foram: *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus* e *B. licheniformis*.

Estudo similar, realizado por Mariano et al. (2008), também destaca a capacidade de biodegradação do óleo diesel comercial por um consórcio de microrganismos que incluía *B. cereus*, utilizando o teste de biodegradabilidade realizado com o indicador redox DCPIP em tubos de ensaio. Abostate, Moustafa e Mohamed (2011) descrevem excelentes resultados na biodegradação de resíduos provenientes da produção de óleos lubrificantes pela ação de cinco espécies do gênero *Bacillus*. Duas dessas cepas avaliadas promoveram reduções superiores a 99% nas concentrações de HPA.

Ao caracterizar e avaliar o potencial biotecnológico de bactérias degradadoras de petróleo em solos contaminados com óleo, na China, Zhang et al. (2010) isolaram 38 bactérias crescidas em meio BH modificado, contendo 2% de óleo diesel. Destas, 22 cepas foram capazes de utilizar o combustível como única fonte de carbono e energia, sendo 19 do gênero *Bacillus*, o que constitui a maioria, assim como os resultados obtidos nesta pesquisa. Os autores ainda avaliaram o consórcio de seis espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* e uma pertencente ao gênero *Enterobacter* na degradação do óleo diesel, e perceberam uma redução de aproximadamente 87,5% na concentração de HTP em 10 dias, enquanto a degradação individual pelas cepas variou de 10 a 64%.

Vasconcelos et al. (2009), ao avaliarem a capacidade de degradação de hidrocarbonetos por microrganismos isolados do solo e da água da Bacia de Campos, relatam a recuperação e a identificação de 28 isolados bacterianos por sequenciamento dos genes RNAr 16S capazes de metabolizar hidrocarbonetos. Entre os grupos identificados, foram encontradas diferentes espécies do gênero *Bacillus*, inclusive *B. pumilus*.

Portanto, os resultados descritos por Abostate, Moustafa e Mohamed (2011), Zhang et al. (2010) e Vasconcelos et al. (2009), assim como os obtidos neste estudo, comprovam a predominância e o potencial de biodegradação do gênero *Bacillus* perante os hidrocarbonetos derivados de petróleo. Esse potencial de biodegradação do gênero também é descrito por Pacwa-Płociniczak, Plaza e Piotrowska-Seget (2016) e Marchand et al. (2017).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam a eficácia do sistema de biopilhas na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos, uma vez que as concentrações de HTP e dos compostos BTEX foram reduzidas significativamente ao final do tratamento, apresentando, respectivamente, eficiências de 92 e 100% para os parâmetros analisados.

Quanto à identificação dos microrganismos isolados dos solos da biopilha, entre os fungos filamentosos, foi verificada a predominância dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Microsporium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Cephalosporium*, *Diplosporium* e *Verticillium* e, entre as bactérias, foi verificada a predominância do gênero *Bacillus*, com diferentes espécies como:

B. subtilis; *B. pumilus*; *B. cereus*; *B. licheniformis*; *B. amyloliquefaciens* e *B. simplex*. Por meio do teste de biodegradabilidade, foi constatada maior eficiência das colônias fúngicas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Verticillium*. Já em relação às bactérias, os melhores resultados desse teste foram obtidos com as colônias de *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. licheniformis* e *Streptomyces* sp.

Por fim, o conhecimento do comportamento dos microrganismos e a identificação da sua capacidade de biodegradar hidrocarbonetos complexos podem colaborar significativamente com o aperfeiçoamento das técnicas de biorremediação, por meio da redução do período de operação desses sistemas e do aumento de suas eficiências pela inoculação e bioampliação de microrganismos já conhecidos como ótimos biodegradadores de hidrocarbonetos.

REFERÊNCIAS

- ABOSTATE, M.; MOUSTAFA, Y.; MOHAMED, N. (2011) Biodegradation of slop wax by Bacillus species isolated from chronic crude oil contaminated soils. *Fuel Processing Technology*, v. 92, p. 2348-2352. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2011.08.013>
- AGNELLO, A.C.; BAGARD, M.; VAN HULLEBUSCH, E.D.; ESPOSITO, G.; HUGUENOT, D. (2016) Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.061>
- ANTUNES, G.S. (1995) *Manual de diagnóstico bacteriológico*. 2. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS. 278 p.
- BALDAN, E.; BASAGLIA, M.; FONTANA, F.; SHAPLEIGH, J.P.; CASELLA, S. (2015) Development, assessment and evaluation of a biopile for hydrocarbons soil remediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 98, p. 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.002>
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. (1998) *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4. ed. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society. 218 p.
- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W.T. (2003) Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 65-68. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822003000500022>
- BESKOSKI, V.P.; GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, G.; MILIĆ, J.; ILIĆ, M.; MILETIĆ, S.; SOLEVIĆ, T.; VRVIĆ, M.M. (2011) Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) - A field experiment. *Chemosphere*, v. 83, p. 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.020>
- CÉBRON, A.; NORINI, M.P.; BEGUIRISTAIN, T.; LEYVAL, C. (2008) Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, v. 73, p. 148-159. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.009>
- CHAILLAN, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y.H.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J. (2004) Identification and biodegradation potential of tropical hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology*, v. 155, n. 7, p. 587-595. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.006>
- COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). *6530 Lista Holandesa de Valores de qualidade do solo e da água subterrânea - Valores STI*. Projeto CETESB - GTZ. 1999. Disponível em: <<http://www.laboratoriogreenlab.com.br/images/legislacoes/Lista%20holandesa%206530.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2014.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). *Resolução CONAMA nº 420/2009, de 28 de dezembro de 2009*. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Publicação no Diário Oficial da União nº 249, de 30 de dezembro de 2009, p. 81-84.
- EL-SHESHTAWY, H.S.; AIAD, I.; OSMAN, M.E.; ABO-ELNASR, A.A.; KOBISY, A.S. (2016) Production of biosurfactants by Bacillus licheniformis and Candida albicans for application in microbial enhanced oil recovery. *Egyptian Journal of Petroleum*, v. 25, p. 293-298. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.07.018>
- FRESCHI, C.; CARVALHO, L.; OLIVEIRA, C. (2005) Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of Salmonella typhimurium in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 363-367. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000400011>
- GADD, G.M. (2001) *Fungi in Bioremediation*. Cambridge: Cambridge University Press. 497 p.
- GOMEZ, F.; SARTAJ, M. (2014) Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 89, p. 103-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.010>
- HANSON, K.G.; DESAI, J.D.; DESAI, A.J. (1993) A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*, v. 7, n. 10, p. 745-748. <https://doi.org/10.1007/BF00152624>
- HOLT, J.G.; WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E. (1989) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. v. 4. p. 2300-2648.
- LÖSER, C.; SEIDEL, H.; HOFFMANN, P.; ZEHNSDORF, A. (1999) Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 51, p. 105-111. <https://doi.org/10.1007/s002530051370>

- MARCHAL, R.; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J.P. (2003) Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & Gas Science Technology*, v. 58, n. 4, p. 441-448. <https://doi.org/10.2516/ogst.2003027>
- MARCHAND, C.; STARNAUD, M.; HOGLAND, W.; BELL, T.H.; HIJRI, M. (2017) Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 116, p. 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.030>
- MARIANO, A.P.; BONOTTO, D.M.; ANGELIS, D.F. de; PIRÔLLO, M.P.S.; CONTIERO, J. (2008) Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 133-142. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000100028>
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). (2002) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne: NCCLS. 133 p.
- ORPHAN, V.J.; TAYLOR, L.T.; HAFENBRADL, D.; DELONG, E.F. (2000) Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 700-711. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.700-711.2000>
- PACWA-PEOCINICZAK, M.; PLAZA, G.Z.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. (2016) Monitoring the changes in a bacterial community in petroleum-polluted soil bioaugmented with hydrocarbon-degrading strains. *Applied Soil Ecology*, v. 105, p. 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.005>
- QUADROS, M.E.; LISBOA, H. de M.; OLIVEIRA, V.L. de; SHIRMER, W.N. (2009) Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: estudo de caso e análise crítica dos padrões atuais. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 14, n. 3, p. 431-438. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522009000300017>
- RODRIGUES, E.M.; KALKS, K.H.M.; FERNANDES, P.L.; TÓTOLA, M.R. (2015) Bioremediation strategies of hydrocarbons and microbial diversity in the Trindade Island shoreline - Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 101, n. 2, p. 517-525. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.10.063>
- SILVA, I.S.; GROSSMAN, M.; DURRANT, L. (2009) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2-7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 63, p. 224-229. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.09.008>
- SOUZA, D.; LIFSCHITZ, S. (2007) *Avaliação do E-value para execução do BLAST sobre base de dados fragmentadas*. Trabalho de conclusão de curso (Monografia em Ciências da Computação) - Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro.
- SUUTARI, M.; RÖNKA, E.; LIGNELL, U.; RINTALA, H.; NEVALAINEN, A. (2002) Characterization of *Streptomyces spp.* isolated from water-damaged buildings. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 39, p. 77-84. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00908.x>
- TOLEDO, F.L.; CALVO, C.; RODELAS, B.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. (2006) Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 29, p. 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.09.003>
- UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION (USPC). (1990) *The United States pharmacopeia: the national formulary*. 22. ed. Easton: USPC. 2067 p.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. *Nonhalogenated Organics Using GC/FID*, Method 8015D. Revision 4, June 2003. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8015d_r4.pdf>. Acesso em: 09 set. 2014.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. *Volatile Organic Compounds in Various Sample Matrices Using Equilibrium Headspace Analysis*, Method 5021A. Revision 2, July 2014. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/5021a.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2014.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. *Aromatic and Halogenated Volatiles by Gas Chromatography Using Photoionization and/or Electrolytic Conductivity Detectors*, Method 8021B. Revision 3, July 2014. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8021b.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2014.
- VARJANI, S.J.; UPASANI, V.N. (2016) Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology*, v. 222, p. 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.006>
- VASCO, M.F.; CEPERO, M.C.; RESTEPRO, S.; VIVES-FLOREZ, M.J. (2011) Recovery of mitosporic fungi actively growing in soils after bacterial bioremediation of oily sludge and their potential for removing recalcitrant hydrocarbons. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, p. 649-655. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.12.014>
- VASCONCELLOS, S.P.; CRESPI, E.; CRUZ, G.F. da; SENATORE, D.B.; SIMIONI, K.C.M.; SANTOS NETO, E.V.; MARSAIOLI, A.J.; OLIVEIRA, V.M. (2009) Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry*, v. 40, p. 574-588. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.02.006>
- VIDOTTO, V. (2004) *Manual de micologia médica*. Ribeirão Preto: Ed. Tecmedd. 204 p.
- WANG, S.Y.; KUO, Y.C.; HONG, A.; CHANG, Y.; KAO, C.M. (2016) Bioremediation of diesel and lubricant oil-contaminated soils using enhanced landfarming system. *Chemosphere*, v. 164, p. 558-567. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.128>
- ZHANG, Z.; GAI, L.; HOU, Z.; YANG, C.; MA, C.; WANG, Z.; SUN, B.; HE, X.; TANG, H.; XU, P. (2010) Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 8452-8456. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.060>
- ZHANG, Z.; HOU, Z.; YANG, C.; MA, C.; TAO, F.; XU, P. (2011) Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4111-4116. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.064>