

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**APLICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PARA REMEDIAÇÃO DE ÁREAS
CONTAMINADAS COM HIDROCARBONETOS.**

Sara Regina Allebrandt

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof^a. Dr^a Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, Maio de 2015.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e na empresa Bioplus Desenvolvimento Biotecnológico Ltda.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª Marilene Henning Vainstein, pelos ensinamentos, confiança e amizade. Obrigada por ter me acolhido no mundo científico, você será sempre um exemplo para mim;

À empresa Bioplus Biotecnologia Aplicada Ltda, por me acolherem em seu quadro de profissionais, acreditando, incentivando e fomentando esse projeto de pesquisa;

Em especial ao Dr. Sydney Mitidieri, um dos responsáveis pela continuidade deste trabalho que teve início no meu mestrado e que além de colaborador se tornou um grande amigo e exemplo profissional;

À colega e amiga, Msc. Amanda Pasinato Napp, sempre disposta, atenciosa e detalhista com as análises que fazíamos juntas. Você é muito importante para mim. Agradeço ainda mais pelas risadas, pelo ombro amigo, pelas conversas e carinho ao longo desses anos;

Aos professores Charley C. Staats e Livia Kmetzsch pela ajuda durante a revisão e submissão dos artigos;

A Prof^ª. Dr^ª. Fátima M. Bento, membro da minha comissão de acompanhamento e que sempre prontamente respondia minhas dúvidas, mesmo estando do outro lado do mundo;

Ao Prof. Dr. Alexandre Macedo, também membro da minha comissão de acompanhamento pelas críticas e sugestões;

Aos alunos de iniciação científica Solon Andrade da Rosa, Mariana Rau e Jackson Feltraco pelo auxílio na correção dos artigos;

À aluna Msc. Francielle Bucker do Laboratório de Biorremediação da Faculdade de Agronomia, por toda colaboração neste trabalho;

Aos colegas dos laboratórios 220 e 217, pela convivência mesmo que esporádica, já que meu trabalho foi conduzido na maior parte na empresa Bioplus;

Aos colegas da Bioplus, Mário e Rodrigo pela parceria e confecção das caixas onde realizei os experimentos de larga escala e a Rosemari pela disponibilidade e carinho de sempre;

Ao Luciano e Silvia, da secretaria do PPGBCM pela disponibilidade e auxílio no decorrer do doutorado;

Aos meus pais, que lá de cima, sei que estão vibrando e me apoiando sempre;

Ao meu marido Fabiano por incentivar e confiar nas minhas escolhas;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade de realização do ensino superior de qualidade;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas do Rio Grande do Sul (SEBRAE/RS) pela concessão da bolsa de pesquisador na empresa;

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	03
LISTA DE ABREVIATURAS.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Contaminação dos solos.....	19
1.2. Legislação ambiental.....	21
1.3. Contaminação por derivados de petróleo.....	24
1.3.1. Hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.....	24
1.3.2. Hidrocarbonetos totais de petróleo.....	26
1.3.3. Óleo diesel.....	28
1.3.4. Gasolina.....	28
1.4. Dinâmica da contaminação no meio ambiente.....	29
1.5. Técnicas de remediação.....	30
1.5.1. Biorremediação.....	33
1.6. Produção de biossurfactantes.....	36
1.7. Micro-organismos envolvidos na degradação dos hidrocarbonetos.....	37
1.8. Mecanismos de biodegradação.....	38
2. Objetivos.....	44
2.1. Objetivo geral.....	45
2.2. Objetivos específicos.....	45
3. CAPÍTULO 1	
“Evaluation of bioremediation of soil contaminated with diesel oil from a petrol station in the south of Brazil”	46

4. CAPÍTULO 2

“Development of a Microbial Consortium for large-scale treatment of hydrocarbon-contaminated soils”.....81

5. DISCUSÃO GERAL.....120

6. CONCLUSÕES.....130

7. PERSPECTIVAS.....132

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....134

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT NBR	Associação Brasileira de Normas Técnicas
NA	Atenuação Natural
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µg L⁻¹	Microgramas por litro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
API	Instituto Americano do Petróleo
BaCl₂	Cloreto de Bário
BAE	Bioaugmentação/bioestimulação
BE	Bioestimulação
BPB	Coleção de micro-organismos da empresa Bioplus
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo
CG-FID	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas
CN	Controle negativo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CO₂	Produção de Dióxido de Carbono
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>

FEPAM	Fundação Estadual de Proteção Ambiental
g	Gramas
h	Horas
HCl	Ácido Clorídrico
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IE	Índice de Emulsificação
KOH	Hidróxido de Potássio
LNAPL	Compostos de Fase Líquida Leve Não Aquosa
mg	Miligramas
mg. Kg⁻¹	Miligramas por quilo
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
M	Molar
MAPA	Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MM1	Meio Mineral 1
MCNR	Mistura complexa não resolvida
MMA	Ministério do Meio Ambiente
ng	Nanograma
OD	Densidade óptica
PAH	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de hidrogênio iônico
pmol	Picomol
POP	Poluentes orgânicos persistentes
rDNA	DNA ribossômico

rpm	Rotação por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
TTC	2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio
TPF	Trifenil-formazan
TPH	Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
TPH-DRO	<i>Diesel Range Organics</i>
TPH-GRO	<i>Gasoline Range Organics</i>
TPH-ORO	<i>Oil Range Organics</i>
UCM	<i>Unresolved Complex Mixture</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
VI	Valor de Investigação
VP	Valor de Prevenção
VRQ	Valor de Referência de Qualidade

LISTA DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO

Figura 1: Classificação dos hidrocarbonetos.....	24
Figura 2: Fases distintas dos hidrocarbonetos após um vazamento no aquífero.....	30
Figura 3: Etapa inicial do processo de biodegradação	40
Figura 4: Representação da rota de degradação aeróbia do benzoato por fungos e bactérias	42

CAPÍTULO I

Figura 1: Biosurfactant production at 24 hours.....	74
Figura 2: Mineralization rates ($\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1}$) during experiments involving microcosms with B5, lasting 60 days.....	75
Figura 3: Estimated number of total heterotrophic and degrading microorganisms throughout 60 days of the experiment.	76

CAPÍTULO II

Figura 1: Cumulative CO_2 production assessed through respirometry in soil contaminated with hydrocarbons after incubation for 60 days.....	111
Figura 2: Biodegradation rates of different treatments with and without aeration.....	112
Figura 3: A. Banding profile obtained through DGGE based on V3 region amplification of the bacterial 16S rRNA gene. B. Bacterial dendrogram based on the DGGE banding profile	

generated from soil treated through bioaugmentation/biostimulation (BAE), biostimulation (BE) or natural attenuation (NA) at time 0,30 and 60 days.113

LISTA DE TABELAS

I. INTRODUÇÃO

Tabela 1: Valores orientadores para solos e águas subterrâneas.....23

Tabela 2: HPAs prioritários.....25

Tabela 3: Exemplos de técnicas de remediação da zona saturada e não saturada.....32

Tabela 4: Comparação dos custos dos tratamentos de remediação.....33

CAPÍTULO I

Tabela 1: Physico- chemical characteristics of the diesel oil contaminated soils.....33

Tabela 2: Rhamnolipid production and degradation of 34 isolates based on the TTC method.....78

Tabela 3: Molecular identification of 34 bacteria isolated from contaminated soil.....79

Tabela 4: Degradation of total petroleum hydrocarbons (TPH), pristane and phytane present in contaminated soils by different bioremediation strategies.....80

CAPÍTULO II

Tabela 1: Microorganism production in 10 and 100 L reactors.....114

Tabela 2: Physico- chemical characteristics of the diesel oil contaminated soils.....115

Tabela 3: Analysis of the degradation of the total petroleum hydrocarbons (TPH) present in soils contaminated with diesel oil.....116

Tabela 4: Analysis of the light fractions of the total petroleum hydrocarbons present in soils contaminated with diesel oil.....117

Tabela 5: Analysis of the heavy fractions of the total petroleum hydrocarbons present in soils contaminated with diesel oil.....118

Tabela 6: Determination of the Shannon- Wiener diversity index for bioremediation treatments after incubation for 60 days.....119

RESUMO

A contaminação de solos e águas subterrâneas com hidrocarbonetos de petróleo tem sido objeto de muita preocupação nas últimas décadas. E embora as indústrias petrolíferas ocupem um grande espaço na mídia com os grandes vazamentos acidentais, os postos de combustíveis em situação irregular demonstram na maioria das vezes uma contaminação silenciosa e que quando descobertos já ocasionaram um dano ambiental de grande extensão. Essas condições somadas a banalização dos procedimentos operacionais em instalações e a implementação tardia de uma legislação ambiental específica, fazem com que os pequenos e contínuos vazamentos apresentem elevados potenciais poluidores, colocando os postos de combustíveis na lista dos responsáveis pelo maior número de áreas contaminadas.

Desta forma, tornam-se necessárias alternativas para mitigar esses impactos ambientais, sociais e econômicos e as técnicas de biorremediação surgem como uma solução de baixo custo, eficiência e viabilidade. Estas técnicas se baseiam na utilização de micro-organismos com potencial de biodegradar compostos, sendo práticas ambientalmente corretas e sustentáveis. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação comercial utilizando micro-organismos isolados do solo contaminado com hidrocarbonetos e comparar a aplicação desta formulação aos tratamentos de atenuação natural e bioestimulação. Para isso, 34 micro-organismos foram isolados de solo contaminado removidos de postos de combustíveis. Para avaliar a capacidade de biodegradação destes isolados, os mesmos foram submetidos a um teste prévio com indicador redox TTC, onde 24 foram positivos e então identificados através do sequenciamento do 16 S rRNA. O sequenciamento identificou 12 *P. aeruginosa* (99% de similaridade), três *P. mendocina* (99% de similaridade), uma *P. pseudoalcaligenes* (99% de similaridade) uma *P. putida* (97% de similaridade), uma *P. stutzeri* (99% de similaridade), três *B. cereus* (99% de similaridade), dois *B. subtilis* (99% de similaridade) e uma *A. calcoaceticus* (99% de similaridade). Os isolados identificados como *P. aeruginosa* não foram utilizados devido a sua patogenicidade, os demais foram submetidos a produção de biossurfactantes através da avaliação do índice de emulsificação, onde ambos tiveram uma IE entre 20 e 30%. Após os testes iniciais, cinco micro-organismos foram selecionados para compor o primeiro consórcio a ser utilizado no experimento de bioaugmentação (*P. mendocina* (BPB 1.6), *B. cereus* (BPB 1.15), *A. calcoaceticus* (BPB 1.22), *B. subtilis* (BPB 1.13) e *B. cereus* (BPB

1.26). Para os experimentos foram montados os tratamentos de atenuação natural, bioaumentação/bioestimulação e bioestimulação, utilizando 300 g de um solo contaminado removido de um posto de combustível, o qual apresentou uma contaminação inicial de 134,49 mg Kg⁻¹ de solo. Ao final do experimento (60 dias), os tratamentos mostraram uma redução de 84% para o tratamento de atenuação natural, 90% para o tratamento de bioaumentação/bioestimulação e 91% para o tratamento de bioestimulação. Após estes resultados um novo experimento foi montado em grande escala, utilizando 300 Kg de solo contaminado, onde os tratamentos de atenuação natural, bioaumentação/bioestimulação e bioestimulação foram monitorados com e sem a injeção de ar. O consórcio utilizado foi produzido em escala industrial (100 L) e composto por quatro micro-organismos, *P. mendocina* (BPB 1.8), *B. cereus* (BPB 1.20), *B. cereus* (BPB 1.26), *B. sphaericus* (BPB 1.35). A degradação dos contaminantes foram analisadas nas diferentes frações: C₈-C₁₁, C₁₁-C₁₄, C₁₄-C₂₀ e C₂₀-C₄₀, por cromatografia gasosa. Os resultados mostraram que o tratamento de atenuação natural com aeração reduziu 98% dos contaminantes. Já o tratamento de bioestimulação não obteve redução, tanto com a aplicação de ar quanto sem, e o tratamento de bioaumentação/bioestimulação sem ar obteve uma redução de 85%. Para estes tratamentos também foram monitorados a produção de CO₂, o qual não obteve diferenças significativas entre os tratamentos, assim como a eletroforese em gel de gradiente desnaturante.

ABSTRACT

Contamination of soil and groundwater with petroleum hydrocarbons has been the subject of much concern in recent decades. And although oil industries occupy a large space in the media with large accidental spills, gas stations illegally staying show in most cases a silent contamination and when discovered already caused environmental damage of large extent. These conditions added the trivialization of operational procedures in facilities and the late implementation of a specific environmental legislation, make small continuous leaks and show high potential polluters, putting the gas stations in the list of the highest number of contaminated sites.

Thus become necessary alternatives to mitigate these environmental, social and economic impacts and bioremediation techniques emerge as a low-cost solution, efficiency and viability. These techniques based on the use of microorganisms with potential to biodegrade compounds, being environmentally friendly and sustainable practices. Therefore, the objective of this study was to develop a commercial formulation using isolated from soil microorganisms contaminated with hydrocarbons and compare the application of this formulation to natural attenuation and biostimulation treatments. For this, 34 microorganisms were isolated from contaminated soil removed from gas stations. To evaluate the biodegradability of these isolates, they were subjected to a pretest with TTC redox indicator, where positive and 24 were then identified through the sequencing of the 16 S rRNA. The sequencing identified 12 *P. aeruginosa* (99% similarity), three *P. mendocina* (99% similarity), one *P. pseudoalcaligenes* (99% similarity), one *P. putida* (97% similarity), one *P. stutzeri* (99% similarity) three *B. cereus* (99% similarity), two *B. subtilis* (99% similarity) and one *A. calcoaceticus* (99% similarity). The isolates identified as *P. aeruginosa* were not used because of their pathogenicity, others were submitted to biosurfactant production by assessing the emulsification index, which both had a IE between 20 and 30%. After initial testing, five micro-organisms were selected to compose the first consortium to be used in bioaugmentation experiment (*P. mendocina* (BPB 1.6), *B. cereus* (BPB 1.15), *A. calcoaceticus* (BPB 1:2) *B. subtilis* (BPB 1.13) and *B. cereus* (BPB 1.26). For the experiments were mounted the natural attenuation treatments, bioaugmentation / biostimulation and biostimulation, used 300 g of contaminated soil

removed from a gas station, which presented an initial contamination of $134.49 \text{ mg kg}^{-1}$ soil. At the end of the experiment (60 days), the treatments showed a 84% reduction for the treatment of natural attenuation, 90% for the biostimulation treatment, bioaugmentation/ and 91% for the biostimulation treatment. After these results a new experiment was conducted on a large scale, using 300 kg of contaminated soil, where treatments of natural attenuation, bioaugmentation / biostimulation and biostimulation were monitored with and without the injection of air. The consortium used was produced on an industrial scale (100 L) and consists of four micro-organisms, *P. mendocina* (BPB 1.8), *B. cereus* (BPB 1.20), *B. cereus* (BPB 1.26), *B. sphaericus* (BPB 1.35). The degradation of contaminants in different fractions was analyzed: C_8-C_{11} , $C_{11}-C_{14}$, $C_{14}-C_{20}$ and $C_{20}-C_{40}$, by gas chromatography. The results showed that treatment of natural attenuation with aeration reduced 98% of contaminants. Already the biostimulation treatment did not obtain reductions both with air and with no application, and treatment of bioaugmentation / biestimulação with no air obtained a reduction of 85%. For these treatment were also monitored the production of CO_2 , which did not have significant differences between treatments, as well as electrophoresis in denaturing gradient gel.

1- INTRODUÇÃO

1.1. Contaminação dos solos

A contaminação dos solos e águas subterrâneas por hidrocarbonetos decorrentes de grandes e pequenos vazamentos levam a alterações significativas do ambiente e são acompanhadas pelo crescimento do uso dos recursos naturais e pela preocupação com a integridade e a recuperação dos ambientes degradados (Cerqueira *et al.*, 2011). Estas contaminações não se limitam apenas a exploração do petróleo, mas sim às etapas de extração, refino, transporte, armazenamento e distribuição do mesmo e de seus derivados (Das e Chandran, 2011).

Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2013), o número de postos revendedores de combustíveis no Brasil é 38.893, sendo 7.944 na região Sul. Na região Sudeste, na qual está inserido o estado de São Paulo esse número chega a 15.779 postos de revenda.

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo (CETESB, 2015a) mantém uma lista atualizada da evolução das áreas contaminadas no estado, as quais passaram de 3.675 em 2010 para 4.771 em 2013, sendo que 75% da contaminação destas áreas é responsabilidade dos postos de combustíveis.

Como observado no levantamento da CETESB (2015a), os postos de combustíveis ainda permanecem na lista dos responsáveis pelo maior número de áreas contaminadas naquele estado, mesmo as indústrias petrolíferas ocupando um espaço de destaque devido aos grandes vazamentos acidentais. A banalização dos procedimentos operacionais em instalações associada a implementação tardia de uma legislação ambiental específica, fazem com que os pequenos e contínuos vazamentos muitas vezes despercebidos apresentem elevados potenciais poluidores (Coutinho e Gomes, 2006). A dimensão da

contaminação vai depender do tamanho do vazamento e do tipo de solo onde o posto está instalado. Estes vazamentos podem trazer graves riscos à saúde pública, principalmente em áreas urbanas, já que estes contaminantes são considerados substâncias perigosas por serem depressores do sistema nervoso central e por causarem leucemia em exposições prolongadas (Banks e Schultz, 2005; Teng *et al.*, 2013).

No estado do Rio Grande do Sul, segundo a Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM, 2015), muitos postos de abastecimento ainda apresentam irregularidades em pisos, áreas de bombas, áreas de lavagens e caixa separadora de óleo, além do armazenamento inadequado de estopas sujas. Porém, a mais grave de todas as irregularidades se refere as condições estruturais dos tanques, os quais podem apresentar problemas como corrosão, instalação inadequada e a passagem do produto para o solo (Almeida *et al.*, 2007).

Estes eventos podem resultar em contaminações superficiais quando ocorrem junto às bombas e bocais de enchimentos dos reservatórios de armazenamento, ou em contaminações mais profundas quando ocorre pelos vazamentos em tanques e tubulações subterrâneas, os quais são percebidos após o afloramento do produto em galerias de esgoto, redes de drenagem de águas pluviais, no subsolo de edifícios, em túneis, escavações e poços de abastecimento d'água, razão pela qual as ações emergenciais necessárias durante o atendimento a essas situações requerem a participação de diversos órgãos públicos, além do envolvimento do agente poluidor e suas respectivas subcontratadas.

Além das condições inadequadas dos postos de combustíveis existe também a questão que envolve o transporte. No estado do Rio Grande do Sul, segundo a FEPAM (2014), foram registrados entre os anos de 2000 a 2014, 157 acidentes relacionados ao transporte de cargas perigosas com produtos químicos de diversas origens; destes, 43%

estavam relacionados ao derramamento de combustíveis, seja de origem fóssil ou renovável. Esses acidentes ocorreram em ferrovias e rodovias, as quais representam 90%, sendo o solo o ambiente mais impactado.

Qualquer descuido relacionado aos itens citados pode trazer graves problemas de contaminação, os quais serão agravados dependendo das características do solo, ocasionando uma contaminação superficial, ou atingindo o lençol freático, que por consequência pode vir a atingir poços utilizados para o abastecimento da população (CETESB, 2015a).

A fim de minimizar alguns destes problemas, medidas de segurança se tornaram obrigatórias. A Associação Brasileira de Normas Técnicas, ABNT NBR (2013), através da NBR 13785:2003 substituída pela NBR 16161:2013, trata por exemplo, do “Armazenamento de líquidos inflamáveis e combustíveis, tanque metálico subterrâneo, especificação de fabricação e modulação”, estabelece a fabricação de tanques com tecnologia de ponta, com parede dupla, sendo uma de aço carbono e outra laminada em fibra, o que além de proteger contra corrosão possibilita a instalação do sensor para detecção de possíveis vazamentos e válvulas anti transbordamento. Tubulações subterrâneas flexíveis e não metálicas; pista de abastecimento coberta e em concreto armado e sistema de drenagem e de tratamento de efluentes estão dentre as normativas da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2015a) para instalação segura de postos de combustíveis.

1.2. Legislação ambiental

A contaminação ambiental por derivados de petróleo é uma preocupação mundial,

não apenas pelo fato da amplitude do impacto gerado no meio ambiente, mas também pelos danos à saúde humana por apresentarem efeitos carcinogênicos (Santos, 2009). Os postos de combustíveis são apontados como uma das principais fontes que acarretam danos ao meio ambiente, devido a fatores como a quantidade de postos revendedores, os volumes estocados em tanques subterrâneos, com muitos anos de uso, e a falta de apropriada fiscalização (Santos, 2009; Tiburtius, *et al.*, 2004). Esse quadro ainda é agravado pelo fato de que na maioria das vezes os vazamentos somente são observados após já terem gerado efeitos danosos ao solo.

De acordo com a CETESB (2015a), responsável pelo licenciamento ambiental no estado de São Paulo, após a promulgação da Resolução CONAMA n° 273, de novembro de 2000, a qual considera que: “toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis, configuram como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais”, houve um aumento no número de áreas contaminadas, isso devido a ação rotineira de fiscalização.

No município de Porto Alegre, desde 1996, por ação do Decreto Municipal n° 11.423, é exigida licença ambiental para instalação e operação de quaisquer estabelecimentos que pratiquem o armazenamento de combustíveis em tanques subterrâneos, vindo a ganhar mais subsídio com a Portaria n° 16 de maio de 2010 da FEPAM, que dispõe sobre a destinação adequada de resíduos classe I com características de inflamabilidade no solo, determina o encaminhamento desses resíduos, dentre eles o solo contaminado com combustíveis, a unidades licenciadas de tratamento e não mais a sistemas de destinação final de resíduos denominados “aterro de resíduos classe I”.

Além destas legislações, a Resolução CONAMA n° 420 de 28 de dezembro de 2009, primeira regulamentação Federal sobre gerenciamento de áreas contaminadas, é a

base de referencia para a remediação, e assim como o Manual de Gerenciamento de áreas contaminadas da CETESB (2015b), define alguns conceitos importantes para intervenção e monitoramento das áreas contaminadas: *Valores Orientadores*: são concentrações de substâncias químicas que fornecem orientação sobre a qualidade e as alterações do solo e da água subterrânea; *Valores de Referência de Qualidade-VRQ*: é a concentração de determinada substância que define a qualidade natural do solo, sendo determinado com base em interpretação estatística de análises físico-químicas de amostras de diversos tipos de solos; *Valores de Prevenção-VP*: é a concentração de valor limite de determinada substância no solo, tal que ele seja capaz de sustentar as suas funções principais; *Valor de Investigação-VI*: é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerando um cenário de exposição padronizado

A Resolução CONAMA nº 420, além desses conceitos ainda estabelece parâmetros de prevenção e investigação para solos e águas subterrâneas de áreas contaminadas, os quais seguem os mesmos utilizados pela Lista Holandesa e pela CETESB, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de prevenção e investigação para solos e de investigação para águas subterrâneas.

Substâncias	Solo (mg. Kg ⁻¹)				Água subterrânea
	Prevenção	Investigação			Investigação (µg L ⁻¹)
		Agrícola	Residencial	Industrial	
Benzeno	0,03	0,06	0,08	0,15	5
Tolueno	0,14	30	30	75	700
Xilenos	0,13	25	30	70	500
Etilbenzeno	6,2	35	40	95	300

Fonte: adaptado da Resolução CONAMA nº 420

1.3. Contaminação por derivados de petróleo

1.3.1. Hidrocarbonetos Alifáticos e Aromáticos

Os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos podem ser agrupados em classes principais, baseadas na composição molecular: aromáticos, alcanos, alcenos e cicloalcanos (API, 2001), Figura 1.

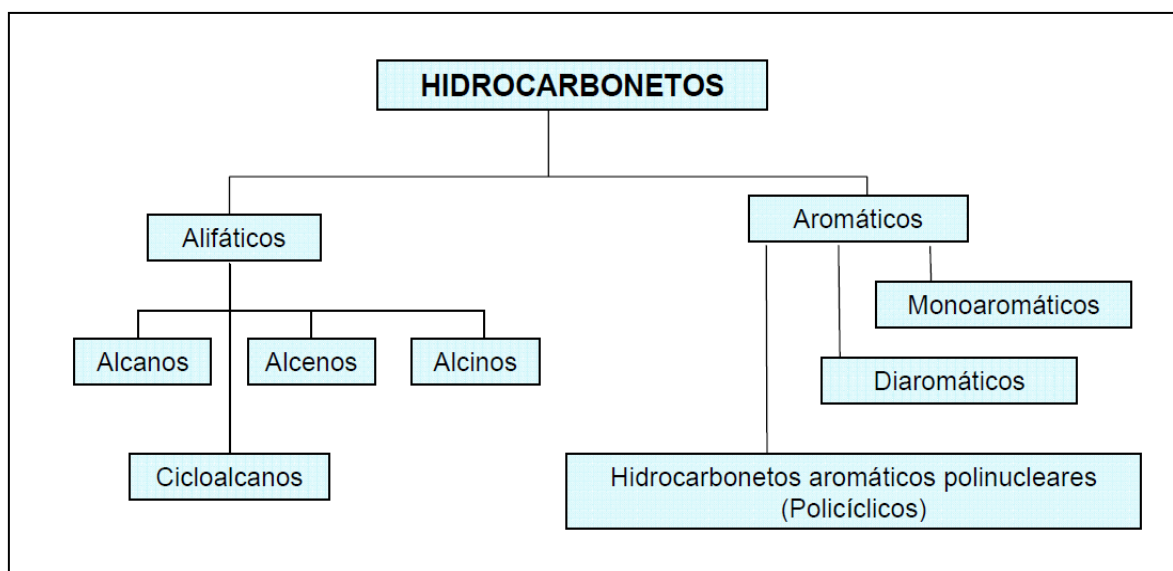


Figura 1: Classificação dos hidrocarbonetos. Fonte: adaptado de API, 2001.

Os compostos aromáticos possuem anéis benzênicos em suas estruturas e compreendem os hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis, como, benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xilenos (BTEX) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), como os nafteno-aromáticos (Killops e Killops, 2005; Zhu *et al.*, 2001). Estão presentes em praticamente todos os tipos de petróleo, embora em pequenas quantidades na maioria deles (Arambarri *et al.*, 2004). Como constituídos somente por átomos de carbono e hidrogênio, apresentam baixíssima solubilidade em água e forte tendência a sorção das

partículas orgânicas e minerais do solo e dos sedimentos, o que dificulta sua biodegradação. Apresentam maior toxicidade e estão associados a efeitos crônicos e carcinogênicos em homens e animais (Khan *et al.*, 2004; Vollhardt e Schore, 2004; Balachandran *et al.*, 2012).

Os hidrocarbonetos com dois ou mais anéis aromáticos são denominados de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), também classificados como Poluentes Orgânicos Persistentes (POP) e segundo a *United States Environmental Protection Agency* US EPA (2004), apenas 16 HPAs são considerados prioritários em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: HPAs considerados prioritários.

HPAs	IARC	EPA	ABNT
Fluoreno	3	P	NM
Fenantreno	3	P	NM
Antraceno	3	P	NM
Metilfenantrenos + Metilantracenos	3	P	NM
Pireno	3	P	NM
Fluoranteno	3	P	CP
Benzo [a] antraceno	2A	P	CP
Criseno	3	P	CP
Benzo [b] fluoranteno	2B	P	CP
Benzo [k] fluoranteno	2B	P	NM
Benzo [e] pireno	3	P	NM
Benzo [a] pireno	2A	P	CP
Indenol [1,2,3-c,d] pireno	2B	PP	CP
Dibenzo [a,h]antraceno	2A	P	CP
Benzo [g,h,i] perileno	3	P	NM
Coroneno	3	P	NM

IARC – *International Agency for Research on Cancer* : 2 A: Provável carcinogênico para humanos; 2 B: Provável carcinogênico para humanos, limitadas evidências; 3: Não é carcinogênico para humanos.

EPA – *Environmental Protection Agency*: P: Prioritário.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas: NM: Não Mencionado; CP: Confere Periculosidade.

Os alcanos (parafinas ou alifáticos saturados) são hidrocarbonetos de cadeias normais e ramificadas compreendem a maior fração da maioria dos petróleos. São incolores, relativamente inodoros e pouco reativos. A toxicidade geralmente é baixa e são facilmente biodegradados (Balba *et al.*, 1998). Possuem cadeia de 1 a 40 carbonos, e são normalmente os constituintes mais abundantes em óleos crus. Fazem parte deste grupo de hidrocarbonetos os isoprenóides, formados por unidades repetidas de C₅ (isopreno), e as suas formas mais comumente encontradas são C₁₉ (pristano) e C₂₀ (fitano). Os alcenos (olefinas) são hidrocarbonetos de cadeia aberta, similar aos alcanos diferindo apenas pela presença de ligação dupla entre os átomos de carbono. Geralmente estão ausentes ou aparecem em pequenas quantidades no petróleo, mas são abundantes em produtos de refino como a gasolina. Já os cicloalcanos (naftas) são hidrocarbonetos de cadeias fechadas (cíclicas) e saturadas. Compreendem a segunda maior fração da maioria dos petróleos. (Balba *et al.*, 1998; Killops e Killops, 2005).

1.3.2. Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

Os hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) são compostos orgânicos constituídos por hidrogênio e carbono (Russell, 1994), os quais compõem uma mistura complexa formadora do petróleo cru (API, 2001; Zhu *et al.*, 2001), além de centenas de compostos químicos originados do refino do mesmo (Patnaik, 1996).

Eles estão divididos em grupos, de acordo com o tamanho de suas cadeias de carbono. O TPH-GRO (*Gasoline Range Organics*) que compreende os compostos com cadeias de carbono entre C₅-C₁₀, como exemplo, a gasolina, o TPH-DRO (*Diesel Range Organics*), que compreende os compostos com cadeias de carbono na faixa do óleo diesel

C₁₁-C₂₈ e o TPH-ORO (*Oil Range Organics*), que compreende os compostos com cadeias de carbono na faixa do óleo lubrificante, C₂₀-C₃₆. (API, 2001; *Phase Separation Science Inc.*, 2008).

Conforme descrito por Xie *et al.* (1999), o TPH é um dos mais importantes e aceitos parâmetros de avaliação de uma contaminação proveniente de vazamento de petróleo e derivados. No entanto as análises não identificam alguns componentes das amostras, elas são detectadas em cromatogramas com uma elevação na linha de base. Alguns autores a chamam de “mistura complexa não resolvida (MCNR)”, também conhecida como UCM (*Unresolved Complex Mixture*), (Marchal *et al.*, 2003; Brengnard *et al.*, 1996 ; Mariano *et al.*, 2008).

Conforme observado por alguns autores a maior parte das MCNR são compostas por hidrocarbonetos alifáticos formados a partir da co-eluição de isômeros múltiplos do decahidronaftaleno ou compostos similares ainda não identificados formados pela degradação dos hidrocarbonetos, (Tran *et al.*, 2010).

As razões pristano (C₁₇) e fitano (C₁₈) também são utilizadas para determinar se os hidrocarbonetos de petróleo presentes no ambiente são recentes, podendo ser utilizadas para caracterizar o grau de degradação e intemperismo do petróleo no ambiente, isso porque os alcanos de cadeias normais são facilmente biodegradados por micro-organismos; portanto baixos valores (< 2) sugerem presença de óleo degradado (Oliveira *et al.*, 2007, Colombo *et al.*, 1989).

1.3.3. Óleo diesel

O óleo diesel constitui uma mistura complexa, proveniente do processo de refinamento do petróleo cru, via destilação fracionada. É composto principalmente por alcanos de cadeia linear, mas também estão presentes em sua constituição hidrocarbonetos de cadeia ramificada e compostos aromáticos, na faixa de C₉-C₂₈ (Knothe, 2010). Embora predominantemente formado por átomos de carbono e hidrogênio, o óleo diesel possui, em baixas concentrações, átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre. Compostos polares, formados a partir desses elementos, conferem boas características lubrificantes ao combustível, mas aumentam seu potencial tóxico para o meio ambiente (ANP, 2012).

O óleo diesel apresenta analogia semelhante, com relação aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, sendo considerados como principais componentes os compostos: antraceno, benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(K)fluoranteno, indeno(1,2,3)pireno, criseno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno e naftaleno. Alcenos (olefinas) (Vieira *et al.*, 2009).

1.3.4. Gasolina

A gasolina é um líquido composto por uma mistura de hidrocarbonetos de petróleo, comumente representada em avaliações ambientais pelos hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, denominados BTEX, os quais representam de 18 a 25% em massa (ANP, 2013), e são caracterizados pela faixa de carbono de C₆ a C₈.

Também apresentam em sua composição outros compostos tóxicos como etanol anidro e metil terta-butil-eter (MTBE) os quais são adicionados para aumentar a

octanagem do motor, diminuir a emissão de monóxidos de carbono e os níveis de ozônio na atmosfera. Segundo a Portaria nº 7, de 11 de janeiro de 2010, do Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), esses compostos devem atingir uma adição máxima de 25 % antes da distribuição da gasolina aos postos de abastecimento.

1.4. Dinâmica da contaminação no meio ambiente

A mobilidade dos contaminantes tanto na água como no solo é influenciada pelas propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos, onde as mais importantes são: solubilidade, pressão de vapor, densidade, viscosidade e o coeficiente de partição octanol-água. Este coeficiente é definido como a razão da concentração de um composto orgânico dissolvido entre o octanol e a água, em equilíbrio, o qual descreve a tendência de participação de um composto entre a fase orgânica e a fase aquosa. Assim, quanto maior for esta razão, maior será a hidrofobicidade do composto, (Mancini, 2002; Guiguer 2006).

Uma vez que a contaminação atinja o solo, seus constituintes são separados em fase dissolvida, líquida e gasosa (menor porção). A fase dissolvida atinge o lençol freático, uma fração da fase líquida é armazenada nos espaços porosos do solo, e outra parte, a gasosa por ser passível de evaporação, originando a contaminação atmosférica. Ocorre, assim, a contaminação de águas subterrâneas, do solo e da atmosfera (Nadim *et al.*, 1999; Mariano, 2006). As distintas fases podem ser observadas na Figura 2.

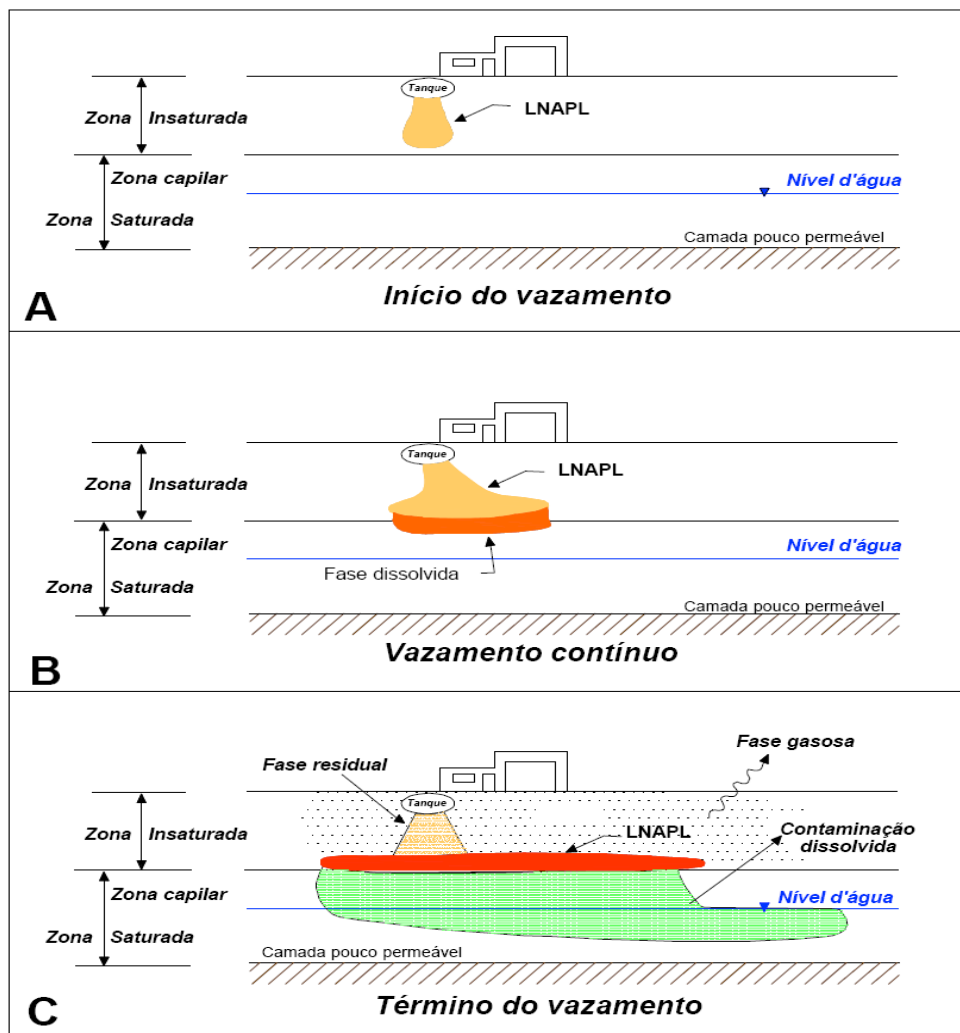


Figura 2: Esquema do comportamento das fases dos hidrocarbonetos no solo e água subterrânea. Fonte: adaptado de Mancini (2002).

1.5. Técnicas de remediação

O tratamento dos solos e das águas contaminadas por hidrocarbonetos pode ser realizado por diversas técnicas, desde que haja o conhecimento das características físico-químicas do contaminante, volume e tempo de vazamento, caracterização geológica e hidrogeológica do local, assim como a análise do meio físico superficial e subterrâneo e a extensão da pluma do contaminante (Spilborghs, 1997).

As técnicas de remediação podem ser aplicadas separadamente ou em conjunto, tendo como finalidade destruir, alterar, extrair, separar ou apenas imobilizar os contaminantes. Estas técnicas podem se dar através de métodos químicos, físicos e biológicos podendo ser aplicados *in situ* ou *ex situ*, com o propósito de se obter maior efetividade aliada ao menor impacto ambiental e reduzido custo financeiro (Seabra, 2008; Pietroletti *et al.*, 2010).

Nas técnicas aplicadas *in situ*, a remediação é feita no próprio local contaminado, enquanto que as técnicas *ex situ* envolvem a remoção e a destinação do material para uma instalação de depuração específica e apropriada. Além disso, as mesmas podem ser aplicadas na zona não saturada, cujas camadas do solo são preenchidas por ar, umidade, e fase orgânica nos seus vazios e zona não saturada, onde o espaço poroso é preenchido pelo somatório dos fluidos presentes, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Exemplos de técnicas de remediação da zona saturada e não saturada

Técnicas de remediação da zona não saturada	
Tratamentos <i>ex situ</i>	Lavagem de solo (soil wash) Incineração Biorremediação: reatores (slurry phase) Sistemas de tratamento de resíduos no solo (landfarming, biopilhas)
Tratamentos <i>in situ</i>	Lavagem de solo (soil flushing) Extração de compostos orgânicos voláteis (SVE, bioventing) Biorremediação

Técnicas de remediação da zona saturada	
Tratamentos <i>ex situ</i>	Carvão ativado Coluna de aeração (air stripping) Biorremediação
Tratamentos <i>in situ</i>	Bombeamento e tratamento (pump and treat), injeção de ar, injeção de vapor. Tratamentos químicos (injeção de oxidantes, barreiras reativas, etc.) Extração de compostos orgânicos voláteis (air sparging, bioventing) Biorremediação e processos eletroquímicos

Fonte: adaptado de Mariano (2006).

Os solos que apresentem baixo grau de contaminação por compostos orgânicos, por exemplo, poderiam passar apenas por processos que diminuam a disponibilidade ou restrinjam a mobilidade dos poluentes. Para isso, métodos de estabilização e imobilização seriam tecnologias indicadas para sanar essas contaminações. Já em solos onde a pluma de contaminação tende a migrar, a combinação de vários processos pode apresentar melhor resultado, (Zhu *et al.*, 2010).

Já algumas técnicas químicas envolvem o uso e aplicação de agentes oxidantes ou solventes para extração dos contaminantes do solo, como peróxido de hidrogênio, etanol, metanol, surfactantes, óleos vegetais, ciclohexano ou diclorometano (Zhu *et al.*, 2010).

No entanto, estes tratamentos envolvem altos custos, estimados entre \$30 a \$100, podendo variar em razão de fatores como: tipo e volume de solo, contaminantes presentes e as combinações de técnicas utilizadas, (Dadrasnia e Agamuthu, 2014). Os valores estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação dos custos dos tratamentos de remediação

Tratamento	Custo aproximado (\$.ton solo-1)
Biológico	5 - 266
Químico	19 - 940
Físico	31 - 266
Solidificação/estabilização	27 - 268
Térmico	47 - 1175

Fonte: Asha *et al.*, 2010.

Dessa forma os tratamentos de biorremediação vêm se tornando uma alternativa mais econômica que as demais técnicas de remediação.

1.5.1. Biorremediação

A aplicação de técnicas de biorremediação para recuperação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo tem despertado grande interesse (Seabra, 2008). Seu custo operacional relativamente mais baixo do que as tecnologias convencionais de remediação aliado a fácil aplicabilidade, faz com que o tratamento seja uma alternativa atraente principalmente para as indústrias. Além disso, a crescente pressão dos órgãos reguladores ambientais tem motivado as empresas a desenvolver tecnologias limpas, com destaque para

a tecnologia de biorremediação (Fernández-Luqueño *et al.*, 2011). Embora levando um tempo mais longo em alguns casos, é comprovadamente eficiente na transformação de contaminantes em substâncias inócuas (Madsen, 1991; Scragg, 2005; Zhang *et al.*, 2010).

As técnicas de biorremediação *ex situ* podem ser divididas em três grupos básicos: (1) fase lama, normalmente em biorreatores; (2) tratamento na camada reativa do solo, exemplo *landfarming* e; (3) empilhamento do solo, exemplo compostagem e biopilha, (Seabra, 2008; Chagas-Spinelli *et al.*, 2012; Nikolopoulou *et al.*, 2013). Dentre as técnicas *in situ*, a *biosparging* e bioventilação são caracterizadas por fornecerem injeção de ar ao solo e águas subterrâneas (Kirtland e Aelion, 2000; Boopathy, 2000; Rizzo *et al.*, 2006) e a fitorremediação que faz o uso de plantas para remediação de solos ou águas contaminadas (USEPA, 2010).

Além das técnicas citadas, a biorremediação ainda pode ser realizada através de três estratégias: atenuação natural, bioestimulação e bioaumentação, ambas *in situ* ou *ex situ*. Essas estratégias ou a combinação entre elas são as mais utilizadas para remediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos, (Bento *et al.*, 2005a; Megharaj *et al.*, 2011; Fukuhara *et al.*, 2013; Shankar *et al.*, 2014).

Na atenuação natural a microbiota nativa é responsável pela biorremediação e isso se dá através de eventos básicos, como: ocorrência de biotransformação dos contaminantes por populações microbianas indígenas; sorção do contaminante com a matriz ou fases minerais que tornam o composto menos biodisponível e, por conseguinte, menos tóxico aos ecossistemas e a perda da toxicidade por diluição ou volatilização (Frankenberger, 1992). Dessa forma, todos os fatores bióticos e abióticos do sistema são responsáveis pelo sucesso da biodegradação, podendo reduzir, assim, a mobilidade, a massa e os riscos do contaminante no sítio impactado (Fountoulakis *et al.*, 2009).

A técnica é aceita para tratamento de meios impactados por combustíveis (Atteia e Guillot, 2007; Silva *et al.*, 2009). No entanto, a aplicação isolada da bioatenuação se torna inadequada e prolongada em muitos casos, pois grande parte dos solos são originalmente oligotróficos e desprovidos de uma população microbiana degradadora em magnitude satisfatória (Megharaj *et al.*, 2011).

A bioestimulação consiste na correção de parâmetros físico-químicos do meio, a fim de acelerar a atividade microbiana, fazendo com que ocorra a degradação. São necessários a presença de fonte de carbono disponível, nutrientes, temperatura adequada, pH, umidade, aeração e potencial redox apropriados, por isso os componentes nutricionais do meio podem determinar a eficiência da técnica, (Lebkowska *et al.*, 2011).

Os ajustes nos parâmetros, principalmente dos macronutrientes fósforo e nitrogênio devem ser conduzidos de acordo com a área a ser tratada e dos poluentes existentes (Das e Chandran, 2011), considerando o equilíbrio da relação C:N:P. Dessa forma, o uso eficiente do carbono disponível pode ser viabilizado e níveis eficientes de biodegradação atingidos (Tyagi *et al.*, 2011; Kauppi *et al.*, 2011).

A técnica de bioaugmentação envolve a introdução de micro-organismos de uma linhagem isolada ou de consórcios potencialmente degradadores. As culturas podem ser derivadas de um solo contaminado (pré-adaptadas) ou obtidas de uma cultura estoque, assim como micro-organismos geneticamente modificados; enzimas livres ou adição de vetores gênicos (El Fantroussi e Agathos, 2005; Sarkar *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2010).

A utilização de consórcios em detrimento de inóculos de apenas um isolado tem demonstrado melhores resultados em trabalhos descritos, uma vez que muitos micro-organismos têm o potencial de biotransformar um composto tóxico em intermediários da rota de degradação tanto que vários representantes da microbiota potencialmente

degradadora participam de interações de sucessão ecológica à medida que o contaminante é biotransformado ao longo do tempo (Mrozik, 2010; Janbandhu e Fulekar, 2011).

O uso associado da bioaugmentação e bioestimulação tem sido descrito por muitos autores, como uma alternativa eficaz para a descontaminação de solos com hidrocarbonetos (Colla *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2014), assim como a inoculação sucessiva de micro-organismos durante o decorrer dos tratamentos, uma vez que aumentam a eficiência do processo, garantindo a presença da população degradadora em concentração adequada até o fim da biorremediação, (Lebkowska *et al.*, 2011; Tahhan *et al.*, 2011).

1.6. Produção de biossurfactantes

Devido ao caráter hidrofóbico dos hidrocarbonetos, além do aparato enzimático de degradação, os micro-organismos precisam desenvolver adaptações específicas que os habilitem a utilizar esses substratos insolúveis. Um dos mecanismos possíveis é a captação intracelular do hidrocarboneto na forma de micelas, envolvendo a produção de moléculas biológicas surfactantes. Esses compostos agem como emulsificantes, diminuindo a tensão superficial e formando diminutas gotículas, que permitem a internalização do poluente a ser metabolizado (Das e Chandran, 2011). A produção desses compostos por muitos dos micro-organismos degradadores não é constitutiva (Bento *et al.*, 2005a), o que indica que a exposição ao contaminante resulta na ativação de genes específicos, envolvidos na biodegradação do composto alvo.

Biossurfactantes e bioemulsificantes são produzidos por uma ampla variedade de micro-organismos, podendo apresentar diferentes propriedades e estruturas químicas. Podem estar localizados extra ou intracelularmente e agir no aumento da área de contato

entre a fonte de carbono e a célula microbiana, através de modificações na superfície celular, ou atuar sobre os hidrocarbonetos hidrofóbicos, de baixa solubilidade, aumentando sua disponibilidade ao ataque dos micro-organismos (Chrzanowski *et al.*, 2012). Em geral, podem ser moléculas de baixa massa molecular, tais como glicolipídeos e lipopeptídeos, que reduzem eficientemente tanto a tensão superficial quanto interfacial entre substâncias imiscíveis, ou polímeros de alta massa molecular, como biodispersantes, que atuam comumente como agentes emulsificantes, responsáveis pela formação de gotículas e estabilidade da emulsão (Calvo *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2014).

A diversidade desses compostos desperta o interesse em sua utilização em diferentes áreas, como agricultura e indústrias têxtil, alimentícia, farmacêutica e cosmética. Recentemente sua aplicação vem sendo explorada também em tratamentos de biorremediação, em áreas contaminadas por derivados de petróleo, por contribuírem para o aumento da biodisponibilidade desses compostos poluentes à ação microbiana (Tyagi *et al.*, 2011; Chrzanowski *et al.*, 2012).

1.7. Micro-organismos envolvidos na degradação de hidrocarbonetos

Uma grande diversidade microbiana está associada à degradação de hidrocarbonetos do petróleo, principalmente bactérias e fungos, sobre as quais existe uma extensa lista de trabalhos e revisões bibliográficas. Estes estudos têm sido relatados desde a década de 1940, (Zobel *apud* Ururauy, 1998) que investigou mais de 100 espécies com habilidade de degradar hidrocarbonetos.

Alguns gêneros como *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Sphingobacterium*, *Achromobacter*, *Klebsiella*, *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*,

Alcaligenes, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Paecilomyces*, os fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Pleurotus*, e as algas dos gêneros *Cladophora* e *Chlamydomonas*, são descritas como bons degradadores (Das e Chandran, 2011; Balba *et al.*, 1998; Bento *et al.*, 2005b; Leahy e Colwell, 1990).

Esses micro-organismos já foram isolados dos mais diversos ambientes, como solos, oceanos, águas costeiras, água doce, sedimentos marinhos, lagos, lagoas, estuários, assim como de diversos climas, temperado, tropical e ambiente ártico, (Rojas-Avelizapa *et al.*, 2007; Wolicka *et al.*, 2009; Quatrini *et al.*, 2008; Qiao e Shao, 2010; Hamamura *et al.*, 2006; Okpokwasili, 2006; Margesin *et al.*, 2003; Ruberto *et al.*, 2009).

1.8. Mecanismos de Biodegradação

Mecanismos de biodegradação requerem a presença de oxigênio molecular para iniciar o ataque enzimático, visto que é a via mais rápida e completa de degradação de poluentes orgânicos ocorre sob condições aeróbias (Das e Chandran, 2011). Deste modo, as oxigenases são responsáveis por introduzirem o oxigênio molecular ao hidrocarboneto, tornando o hidrocarboneto mais solúvel em água, gerando sítios reativos na molécula para que mais reações possam acontecer (Pazmiño *et al.*, 2010).

As oxigenases podem ser classificadas em monoxigenases e dioxigenases. As monoxigenases são uma classe de enzimas conhecidas como alceno hidroxilases que catalisam a oxidação das cadeias mais lábeis dos hidrocarbonetos (alcanos) (Figura 3). A oxidação por hidroxilação ocorre nas regiões terminais, subterminais ou biterminais de

compostos alifáticos lineares e ramificados, alicíclicos, alquil-cicloalcanos ou terpenos, (Fuchs *et al.*, 2011).

A etapa inicial do processo de biodegradação é a oxidação do substrato por oxigenase. A oxidação terminal inicia-se com a formação de um álcool primário. Após a etapa inicial, o álcool é oxidado, por ação das enzimas álcool e aldeído desidrogenase, aos correspondentes aldeído e ácido carboxílico, respectivamente. O ácido carboxílico, por sua vez, é utilizado como substrato para acil-CoA sintetase e posteriormente é biodegradado pelo processo de β -oxidação. Os *n*-alcanos de cadeias menores são oxidados subterminalmente (1° carbono secundário da cadeia do *n*-alcano), formando álcool secundário, cetona, éster e ácidos carboxílicos, que são posteriormente biodegradados pelo processo de β -oxidação.

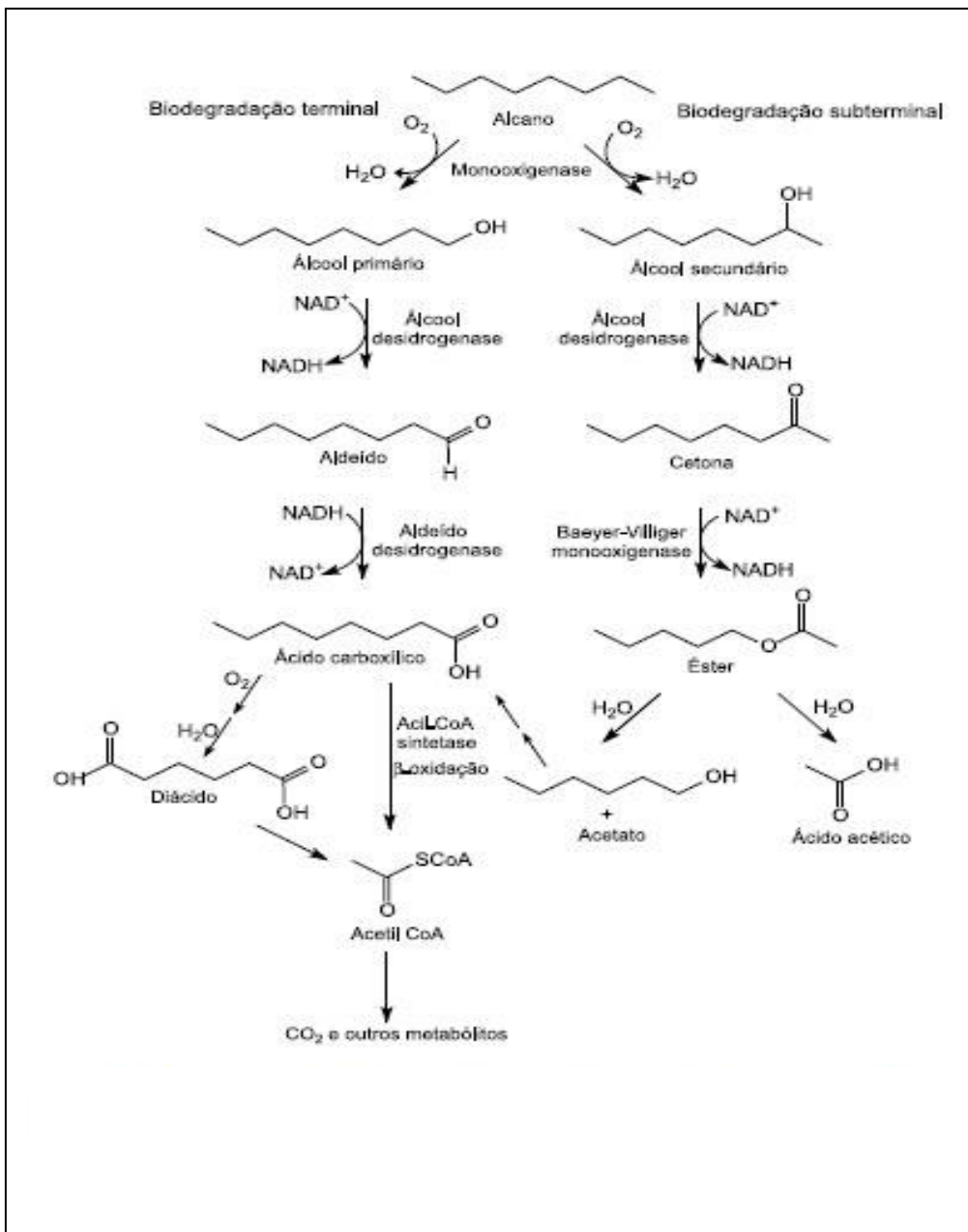


Figura 3: Etapa inicial do processo de biodegradação de um hidrocarboneto alifático.
 Fonte: adaptado de Da Cruz *et al.*, 2011.

Na degradação do benzeno, por exemplo, as dioxigenases atuam no processo de biodegradação e compõem um sistema enzimático multicomponente possuindo uma faixa ampla de especificidade pelo substrato. Essas enzimas convertem os hidrocarbonetos aromáticos aos correspondentes arenos cis-diol (Gibson e Parales, 2000).

O intermediário cis-dihidrodiol é oxidado a catecol e após convertido por rotas metabólicas conhecidas como a clivagem orto (β -cetoadipato) e a clivagem meta (α -cetoadipato) realizadas pelas enzimas catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase, respectivamente, resultando na formação de ácidos que são utilizados via ciclo do ácido tricarbóxico (Hamzah e AL-Baharna, 1994; Wilkstrom *et al.*, 1996; Ururahy, 1998; Loh e Chua, 2002).

Já a enzima catecol 2,3 dioxigenase catalisa a oxidação do catecol a 2 hidroxi-semialdeído mucônico e sua atividade enzimática representa um potencial para sua produção comercial e aplicação industrial (Fernandez-Lafuente *et al.*, 2000). A Figura 4 representa a rota metabólica de degradação do benzoato, por duas diferentes vias de degradação.

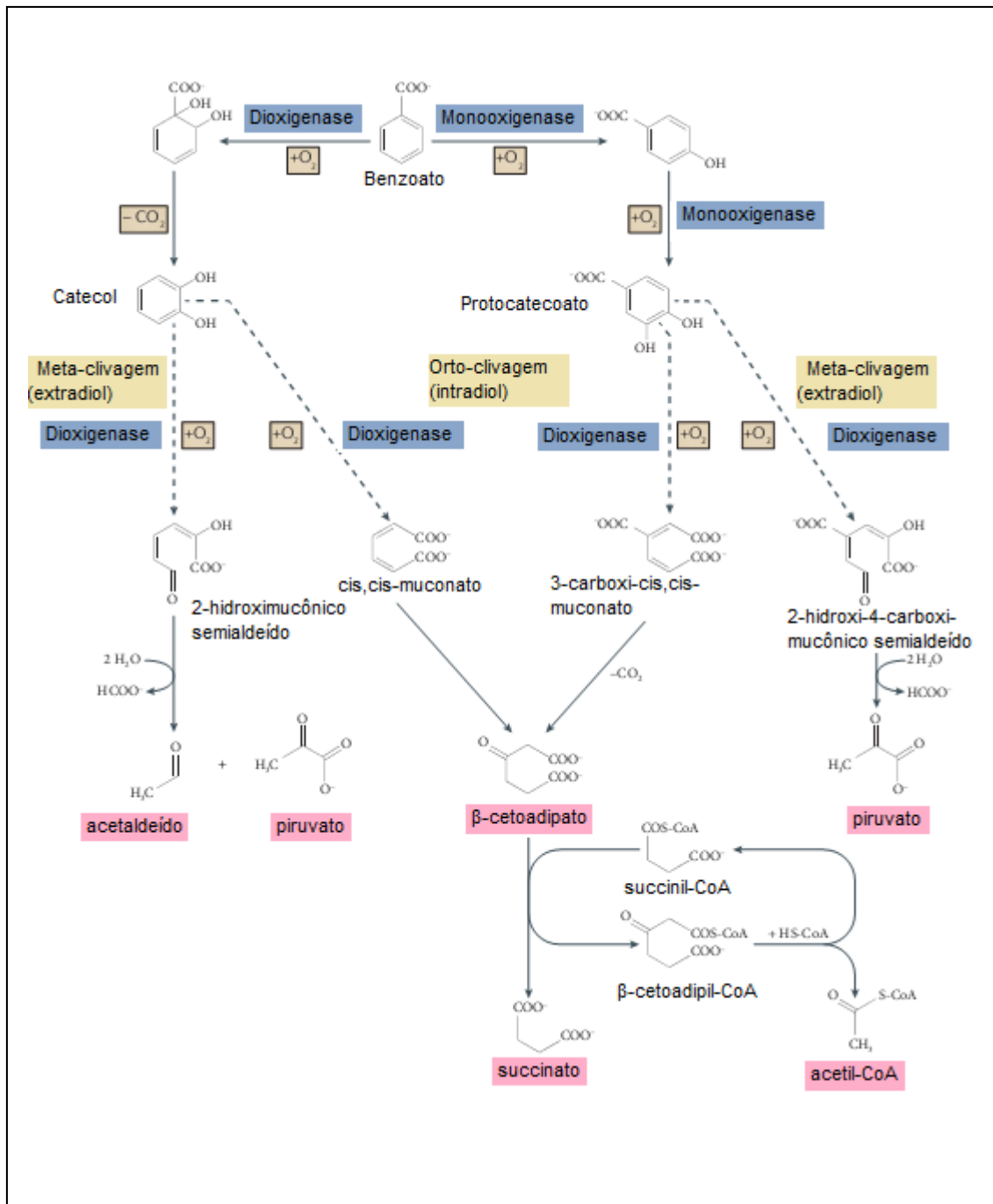


Figura 4. Representação da rota de degradação aeróbica do benzoato por fungos e bactérias, através da via β -cetoadipato e dioxigenases. A degradação aeróbica de benzoato de metilo em bactérias e fungos é mostrado como um exemplo de uma estratégia de O_2 dependente. Fungos convertem benzoato principalmente para protocatecoato, por mono e dioxigenases, enquanto a maioria das bactérias formam catecol. A via central da dioxigenases clivam o anel entre os dois grupos hidroxilas (orto-clivagem, visto na via β -cetoadipato) ou ao lado de um dos grupos hidroxilo (meta-clivagem). Fonte: adaptado de Fuchs *et al.*, (2011).

As enzimas do subgrupo das dioxigenases, responsáveis pela biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos, pode ser dividida em dois grupos: enzimas periféricas e enzimas de fissão. As primeiras participam inicialmente dos processos de inserção dos átomos de oxigênio à molécula, de hidroxilação do anel de ressonância e de rearomatização geral desses compostos, sendo estes oxidados a um número bastante limitado de intermediários centrais, como catecóis, galatos, protocatecóis e gentisatos (Harayama e Timmis, 1989). Já as enzimas de fissão são responsáveis por reconhecer estes intermediários e clivar seu anel aromático, (Mishra *et al.*, 2001).

Deste modo, podemos dizer que duas características são essenciais para um micro-organismo oxidar os contaminantes: uma oxigenase específica de grupo e ligada à membrana, conforme já demonstrado, e mecanismos para otimizar o contato entre os micro-organismos e os hidrocarbonetos insolúveis em água (Chikere *et al.*, 2011).

Esse mecanismo pode se dar pela produção de biosurfactantes e bioemulsificantes, os quais são produzidos por uma grande variedade de micro-organismos. Eles agem no aumento da área de contato entre a fonte de carbono e a célula microbiana, através de modificações na superfície celular ou atuando sobre os hidrocarbonetos hidrofóbicos de baixa solubilidade, aumentando sua disponibilidade ao ataque dos micro-organismos (Chrzanowski *et al.*, 2012).

2- OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma formulação comercial que possa ser utilizada no tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos, de forma que possa ser aplicada *in situ* ou *ex situ*, dependendo da necessidade do cliente, sem que o local de trabalho sofra intervenção durante o processo de aplicação.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e identificar micro-organismos que apresentem capacidade de degradação de hidrocarbonetos no solo;
- Determinar a produção de biossurfactantes pelos micro-organismos isolados;
- Formular consórcios microbianos e testar sua eficiência na remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos;
- Estimar a população heterotrófica e degradadora dos consórcios;
- Elaborar um teste em larga escala para a aplicação do consórcio que demonstrou melhor eficiência;
- Caracterizar a dinâmica populacional dos micro-organismos no teste em larga escala;

3. CAPÍTULO I

Evaluation of bioremediation of soil contaminated with diesel oil from a petrol station in the south of Brazil

Manuscrito submetido a **International Biodeterioration & Biodegradation** 07/04/2015

Manuscript Number:

Title: Evaluation of the bioremediation of soil contaminated with diesel oil from a petrol station in south Brazil

Article Type: Original Paper (max 10,000 words)

Keywords: Biodegradation; bioaugmentation; biostimulation; petroleum hydrocarbons; gas stations.

Corresponding Author: Prof. Marilene Henning Vainstein, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Sara R Allebrandt, MsC

Order of Authors: Sara R Allebrandt, MsC; Amanda P Napp, MsC; Sydnei Mitidieri, PhD; Fatima M Bento, PhD; Marilene Henning Vainstein, Ph.D.

Abstract: Large and small leaks occur as a result of the supply, storage and transport of fuel to gas stations. To find more effective and less costly bioremediation techniques, this study investigated the effectiveness of treatments of soil contaminated with hydrocarbons. The soil used in the experiment was removed from a southern Brazil gas station and used for consortium bioprospecting; 34 isolates were identified and tested for their ability to reduce tetrazolium chloride and produce biosurfactants. The bioaugmentation treatment was characterized by a bacterial consortium of *Pseudomonas mendocina* (BPB 1.6), *Bacillus cereus* (BPB 1.15), *Acinetobacter calcoaceticus* (BPB 1.22), *Bacillus subtilis* (BPB 1.13) and *Bacillus cereus* (BPB 1.26) identified using 16S rRNA analysis. To evaluate remediation techniques, the degradation and mineralization of hydrocarbons was monitored through the cumulative CO₂ production and quantification of total petroleum hydrocarbons. The initial concentration of hydrocarbons in the contaminated soil was 134.49 mg kg soil⁻¹; within 60 days, this level was reduced by 84% in the treatment with natural attenuation, 90% with bioaugmentation / biostimulation and 91% with biostimulation. The heterotrophic population abundance was not influenced by the bioremediation treatments, whereas the population of degrading bacteria increased in all treatments.

1 **Evaluation of the bioremediation of soil contaminated with diesel oil from a petrol**
2 **station in south Brazil**

3

4 Sara R. Allebrandt ^{a,b}, Amanda P. Napp ^{a,b}, Sydney Mitidieri ^b, Fatima M. Bento ^c, Marilene
5 H. Vainstein ^{a,d*}

6

7 ^a Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento
8 Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

9 ^b Bioplus Desenvolvimento Biotecnológico Ltda., Beco Jose Paris, 339, CEP 91140-310,
10 Porto Alegre, RS, Brazil

11 ^c Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal do Rio
12 Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

13 ^d Department of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande
14 do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, CEP 91500-970, Porto Alegre, RS, Brazil

15

16 * Corresponding author:

17 Marilene H. Vainstein

18 Tel.: +55 (51) 33086060;

19 Fax: +55 (51) 33087309

20 E-mail address: mhv@cbiot.ufrgs.br

21

22

23

24 **Abstract**

25 Large and small leaks occur as a result of the supply, storage and transport of fuel to gas
26 stations. To find more effective and less costly bioremediation techniques, this study
27 investigated the effectiveness of treatments of soil contaminated with hydrocarbons. The soil
28 used in the experiment was removed from a southern Brazil gas station and used for
29 consortium bioprospecting; 34 isolates were identified and tested for their ability to reduce
30 tetrazolium chloride and produce biosurfactants. The bioaugmentation treatment was
31 characterized by a bacterial consortium of *Pseudomonas mendocina* (BPB 1.6), *Bacillus*
32 *cereus* (BPB 1.15), *Acinetobacter calcoaceticus* (BPB 1.22), *Bacillus subtilis* (BPB 1.13) and
33 *Bacillus cereus* (BPB 1.26) identified using 16S rRNA analysis. To evaluate remediation
34 techniques, the degradation and mineralization of hydrocarbons was monitored through the
35 cumulative CO₂ production and quantification of total petroleum hydrocarbons. The initial
36 concentration of hydrocarbons in the contaminated soil was 134.49 mg kg soil⁻¹; within 60
37 days, this level was reduced by 84% in the treatment with natural attenuation, 90% with
38 bioaugmentation / biostimulation and 91% with biostimulation. The heterotrophic population
39 abundance was not influenced by the bioremediation treatments, whereas the population of
40 degrading bacteria increased in all treatments.

41

42 **Keywords:**

43 Biodegradation; bioaugmentation; biostimulation; petroleum hydrocarbons; gas stations

44

45

46 **1. Introduction**

47 Soil contamination with hydrocarbons is a worldwide problem and a long-term
48 environmental concern. Diesel spills usually occur during the manufacturing, storage and
49 transport of fuel and cause serious environmental pollution problems (Das and Chandran
50 2011). Oil companies are important sources of contamination because of their many
51 accidental spills; however, gas stations that do not conform to standards present a high
52 pollution potential through small and continuous leaks. The National Agency of Petroleum
53 (ANP 2013) estimates that of the 39,450 gas stations that sell automotive fuel in Brazil, 3,125
54 are located in Rio Grande do Sul (RS), southern Brazil. According to Companhia de
55 Tecnologia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB 2012), many of these stations
56 operate under non-standard conditions and harbor sources of contamination, such as very old
57 storage tanks (useful life of 20 to 25 years), which significantly contribute to the
58 contamination of soil and groundwater. There is existing legislation in Brazil to monitor gas
59 stations, for instance, the CONAMA Nº 273 resolution of 2000, which, in addition to the
60 recovery of degraded areas, requires the exchange of old tanks for carbon steel tanks coated
61 internally with internal glass fiber and externally with resins resistant to hydrocarbons, along
62 with an internal leak detection system. Several forms of remediation are utilized for the
63 recovery of degraded areas; however, the most commonly used is the physical removal of soil
64 for treatment *ex situ*, which is expensive because the gas stations remain inoperative during
65 the removal of the soil. Remediation techniques that present a cost / benefit relationship and
66 are compatible with social and environmental concerns need to be better understood to drive
67 the expansion of their use compared to conventional decontamination methods such as
68 incineration, solidification / stabilization, soil steam extraction and washing (Xu and Lu
69 2010).

70 The use of biological methods for the remediation of contaminated areas has been
71 recognized as a promising and effective strategy in terms of results and costs (Szulc et al.
72 2014); indeed, bioremediation may be a less costly technique because it can be applied *in situ*
73 without the need for a gas station to interrupt its activities. These techniques are characterized
74 by the addition of appropriate microorganisms (bioaugmentation) and adjustment of abiotic
75 factors, such as the incorporation of nutrients, pH correction, moisture and aeration
76 (biostimulation), and may be applied singly or in association with other factors (Evans et al.
77 2004).

78 Bioaugmentation offers toxic contaminant degradation through the use of
79 microorganisms with the metabolic and physiologic ability to utilize hazardous organic
80 compounds as a source of carbon and energy (Meyer et al. 2014). Compared to conventional
81 decontamination methods, bioaugmentation is advantageous because it is compatible with the
82 recycling of nutrients through the natural metabolite route (Fantroussi and Agathos 2005).
83 Furthermore, several studies confirm that an increase in the initial cell biomass can increase
84 biodegradability and improve the treatment process (Mishra et al. 2001; Mukherjee and
85 Bordoloi 2011).

86 Nonetheless, evidence has shown that contaminant reduction rates involving
87 bioaugmentation are not always satisfactory. As shown by Lin et al. (2011), biodegradation
88 kinetics exhibit an initial period of intense activity, followed by a reduction phase of
89 degradation rates. Tyagi et al. (2011) describe that an imbalance of abiotic factors may create
90 an unfeasible process under natural conditions, reducing the exposure of the inoculum to
91 appropriate conditions. Furthermore, Tahhan et al. (2011) demonstrate that competition
92 among microorganisms can also decrease biodegradation efficiency. Thus, there is a lack of
93 consensus in the literature regarding the best strategy among natural attenuation,
94 biostimulation, bioaugmentation or possible combinations thereof, which may be due to the

95 scarcity of data reporting actual applications of bioaugmentation in the field, despite the vast
96 amount of literature at the laboratory scale (Dybas et al. 2002). Accordingly, this study aimed
97 to evaluate different bioremediation treatments (natural attenuation, bioaugmentation /
98 biostimulation or biostimulation) in hydrocarbon-contaminated soil removed from a gas
99 station. For bioaugmentation / biostimulation treatments, successive amendments of the
100 bioprospected microbial consortium were applied to the same soils in 60-day experiments to
101 ascertain whether the addition of microorganisms acclimated to the contaminated
102 environment would be more effective compared to natural attenuation techniques and
103 biostimulation.

104

105 **2. Materials and Methods**

106

107 *2.1. Soil sampling*

108 The contaminated soil used in the bioprospecting and bioremediation tests was
109 removed from gas stations located in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil
110 (Latitude - 30.0277, Longitude - 51.2287 30 ° 1'40 "South, 51 ° 12'43" West). The soil had
111 been historically contaminated by diesel oil and more recently by diesel-biodiesel mixtures.
112 The soil collected served as a base for fuel tanks and was at a depth of 2 to 3 meters. The soil
113 was collected during the replacement of old tanks (20 years of use) due to leaks. After
114 collection, the samples were placed in sterile bags that were hermetically sealed and stored at
115 4 °C until use.

116 The concentrations of total petroleum hydrocarbons (TPHs) in the soil of the study
117 sites were assessed using gas chromatography at the start of the study to generate a baseline.
118 The physico-chemical analyses were performed by the Soil Analysis Laboratory of the

119 Federal University of Rio Grande do Sul, according to the methodologies described in
120 Tedesco et al. (1995) (Table 1).

121

122 *2.2. Bioprospecting*

123 For enrichment, the microbial isolation method according to the procedure described
124 by Bento et al. (2005) was used. Erlenmeyer flasks were inoculated with 1 g of contaminated
125 soil and diesel oil at 1% (B5, 95% petroleum diesel and 5% biodiesel) in a final volume of
126 100 mL of mineral medium 1 (MM1). Sterilization was performed by vacuum filtration into
127 sterilized flasks using a filter adapted with a membrane and a pore size of 0.22 µm; the
128 samples were stored at room temperature in glass vials wrapped in aluminum foil to prevent
129 photo-oxidation. The flasks with inoculum were incubated with agitation at 190 rpm and 30
130 °C. Every 7 days, a culture aliquot (10 mL) was transferred to a new flask containing the
131 same MM1 sterile medium and fuel at 1% and incubated under the same conditions. After
132 three transfers, the culture was serially diluted and spread on nutrient agar. The isolated
133 microorganisms were stored at 4 °C.

134

135 *2.3. Evaluation of oil degradation capability using a redox indicator*

136 The hydrocarbon degradation capability of the isolates was evaluated with the redox
137 indicator 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) according to Braddock and Catterall
138 (1999). Approximately 10^8 CFU/mL of each isolated microorganism was inoculated into 5
139 mL of mineral medium 1 (MM1) containing the redox indicator and 2% diesel oil (B5) as a
140 carbon source. The tubes were incubated at 30 °C for up to 120 h. We used sterile water to
141 replace the inoculum as a negative control. The isolates showing color change within the time
142 period were selected for further tests.

143

144 2.4. Evaluation of biosurfactant production

145

146 2.4.1. Evaluation of the emulsification index of isolates

147 The isolated bacteria were inoculated into 5 mL of nutrient broth (5 g/L peptone and 3
148 g/L meat extract) and cultivated at 30 °C and 180 rpm for 24 h. The evaluation of the
149 emulsifying index was performed in the presence of the cells, and there were four replicates
150 of the experiment with independent cultures. For the quantification of emulsifier activity, the
151 isolates were inoculated into Erlenmeyer flasks with 50 mL of nutrient broth at a final
152 concentration of $A_{600\text{nm}} = 0.07$ and incubated at 30 °C and 180 rpm for 24 h. In 100 mL
153 graduated cylinders, 25 mL of the supernatant and 5 mL of lubricant oil (B5) were vortexed
154 for 2 minutes; after 24 h, the volume of the emulsion (water in oil) was measured (mL), and
155 the percentage was calculated based on a method adapted from Cooper and Goldenberg
156 (1987).

157

158 2.4.2. Colorimetric evaluation for the detection of rhamnolipids

159 The colorimetric method using methylene blue and CTAB (cetyltrimethylammonium
160 bromide) was originally developed to select species that produce the rhamnolipid-type
161 biosurfactants or to select any anionic biosurfactant of low molecular weight that can be
162 produced by *Pseudomonas* spp.

163 After growth for 24 h in liquid medium, isolates were inoculated onto methylene blue
164 plates (10 g / L peptone, 10 g / L lactose, 2 g / L monobasic potassium phosphate, 0.065 g / L
165 methylene blue chloride, 15 g / L agar, and 10 g / L of CTAB) and incubated at 30 °C for 24
166 h. The formation of dark blue colonies around a halo indicated a positive result for the
167 production of a rhamnolipid-type biosurfactant.

168

169 *2.5. Bacterial identification*

170 The bacteria were grown in 10 mL of nutrient broth at 30 °C for 24 h, and the
171 genomic DNA of each culture was extracted according to Sambrook and Rousell (2001).
172 Polymerase chain reaction (PCR) for the amplification of the 16S rRNA gene of each
173 bacterial isolate was conducted using universal primers 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG
174 CTC AG 30) and 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'). The reactions were
175 prepared using Go Taq Reaction Buffer 1× (1.5 mM MgCl₂), 0.2 mM dNTP, 10 pmol of each
176 oligonucleotide, 1.25 U Go Taq DNA polymerase (Promega) and 1 µl genomic DNA in a
177 total volume of 25 µl. The amplifications were performed as follows: 1 cycle at 95 °C for 5
178 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 1 min, 65 °C for 1.3 min, and 72 °C for 1 min and a
179 final extension step at 72 °C for 5 min.

180 The PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. The amplicons
181 obtained were purified from the agarose gel using Kit PureLink™ Quick Gel Extraction
182 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. DNA quantification was performed
183 by fluorometric analysis using a Qubit fluorometer (Invitrogen) and DNA quantification kit
184 Quant-iT according to the manufacturer's instructions. Approximately 200 ng of genomic
185 DNA was used for the reaction using the MegaBACE 1000 Sequencing Platform. Sequence
186 similarity searches of the GenBank nucleotide database were conducted using BLAST.

187

188 *2.6. Biodegradation experiments*

189 Biodegradation experiments were performed in Bartha biometer flasks (500 mL),
190 which were used to measure microbial CO₂ production (Bartha and Pramer 1965). Triplicate
191 flasks were prepared with 300 g of contaminated soil using three different strategies: natural
192 attenuation, biostimulation and bioaugmentation / biostimulation. A single flask without
193 contamination was used as a negative control. For analysis, the treatments were maintained

194 for 60 days in a controlled ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) environment and protected from light. For
195 bioaugmentation / biostimulation, an inoculum of five bacterial isolates, with a final
196 concentration of 10^8 CFU/mL, was introduced (Bento et al. 2003). The bacteria were grown
197 separately in sterile nutrient broth for 24 h at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 190 rpm in a rotary shaker. The
198 nutrient solution consisted of 250 mg kg^{-1} of NH_4SO_4 and 100 mg kg^{-1} KH_2PO_4 , as suggested
199 by Jiménez et al. (2007). The microbial degradation activity was evaluated. The most
200 probable numbers (abundance) of the total heterotrophic and degrading populations were
201 estimated; fuel degradation was characterized by CO_2 evolution and gas chromatography
202 (GC) analysis of TPHs.

203

204 2.6.1. *Respirometry*

205 This method aims to directly determine microbial activity by measuring the carbon
206 dioxide produced during microbial respiration and to indirectly measure the biodegradation
207 of organic contaminants (Stotzky 1965). The carbon dioxide produced by microbial activity
208 was captured using a 0.20 M KOH solution (10 mL) inside the biometer flasks. Periodically,
209 the KOH solution was removed, and 1 mL of 0.5 M barium chloride solution and 3 drops of
210 1% phenolphthalein indicator were added. The residual KOH was titrated with a 0.1 M HCl
211 standardized solution.

212 The amount of carbon dioxide produced was obtained through Eq. (1):

$$213 \text{CO}_2 \text{ generated (mg/Kg soil)} = (V_B - V_A) \cdot (M_C/2) \cdot M_{\text{HCl}} \cdot \text{FC}/m \quad (1)$$

214 Where, V_B and V_A are the volume of 0.1 M HCl used to titrate the blank and the
215 treatment in mL, respectively; M_C is the molar mass of carbon dioxide in g/mol; M_{HCl} is the
216 molar concentration of the HCl standard solution in mol/L; FC is the correction factor for
217 acid/base molarity ($M_{\text{HCl}}/M_{\text{KOH}}$) and m is the mass in Kg of dry soil in the flask.

218

219 *2.6.2. Chromatography*

220 The levels of TPHs were determined using the EPA 8015-B-96 technique by gas
221 chromatography (AGILENT 6890 Series GC System) with a mass selective detector
222 (AGILENT 5973 Network Mass Selective Detector). A silica column was used with 5%
223 phenyl and 95% dimethylpolysiloxane (30 m × 0,35 mm × 0.25 mM) under the following
224 conditions: injection temperature 290 °C, with an initial temperature of 40 °C for 1 minute,
225 followed by an increase in temperature of 6 °C/minute to 300 °C, which was maintained for
226 30 minutes. This procedure was conducted using 1 µl of sample in splitless mode.

227

228 *2.6.3. Estimation of microbial number and degrader abundance*

229 The abundance of heterotrophic microorganisms during the 60-day study was
230 estimated using the Most Probable Number (MPN) according to the method described by
231 Bento et al. (2005). The microbial population was determined using MPN tables (APHA
232 1995).

233

234 *2.7. Statistical analysis*

235 Descriptive statistics (means and standard deviations) were utilized. ANOVA was
236 used to test for differences among the treatments. The means of the treatments were evaluated
237 by Bonferroni's test with a confidence level of 95%.

238

239 **3. Results**

240

241 *3.1. Microorganism isolation*

242 Bacterial isolates were obtained from soil historically contaminated with
243 hydrocarbons and collected from a gas station in the city of Porto Alegre. Thirty-four soil

244 bacteria were isolated through an enrichment technique in a liquid mineral medium using
245 diesel oil as the sole carbon source (Table 2).

246 The selection of bacterial isolates was based on preliminary assays of the
247 biodegradation of a redox indicator (TTC) and the production of biosurfactant rhamnolipids.
248 The biodegradability tests using TTC were positive for 24 of the isolated microorganisms,
249 suggesting not only the existence of adequate diesel-degrading microorganisms but also
250 varying degradation capabilities among the microorganisms studied, as indicated by the time
251 required for the color transition of the medium for each isolate.

252 Regarding the detection of rhamnolipids, the colorimetric assay was positive for 20 of
253 the isolates. Of these isolates, 16 are of the genus *Pseudomonas* and one of *Acinetobacter*; the
254 three others were not identified because they exhibited negative results in the TTC assay.

255

256 3.2. Bacterial identification

257 The isolates that tested positive in the TTC assay underwent further molecular
258 identification. Analyses of the partial sequence of the 16 S rRNA gene showed that 18
259 isolates belong to the genus *Pseudomonas*, 12 of which were identified as *P. aeruginosa*
260 (99% similarity), three are *P. mendocina* (99% similarity), one is *Pseudomonas*
261 *pseudoalcaligenes* (99% similarity), one is *Pseudomonas putida* (97% similarity), and one is
262 *Pseudomonas stutzeri* (99% similarity). Five bacteria belong to the *Bacillus* genus, with three
263 being *Bacillus cereus* (99% similarity) and two *Bacillus subtilis* (99% similarity).
264 *Acinetobacter calcoaceticus* (99% similarity) was also identified (Table 3). Among these
265 species, we chose not to pursue *P. aeruginosa* due to its pathogenicity, resulting in a total of
266 12 microorganisms evaluated by further testing.

267

268 3.3. Emulsifier production

269 Biosurfactants are substances that increase the bioavailability of hydrocarbons to
270 microorganisms, increasing their rate of biodegradation, and are therefore considered as
271 adjuvants in the degradation of heavy oils. Thus, to select microorganisms for use in
272 bioremediation, the production of emulsifiers was evaluated in the 12 selected
273 microorganisms. As shown in Figure 1, with the exception of *P. pseudoalcaligenes* (BPB
274 1.1), all of the isolates exhibited indices of greater than 20% emulsification.

275

276 3.4. Bioremediation experiment

277

278 3.4.1. Formulation of the consortium

279 Five microorganisms, *P. mendocina* (BPB 1.6), *B. cereus* (BPB 1.15), *A.*
280 *calcoaceticus* (BPB 1.22), *B. subtilis* (BPB 1.13) and *B. cereus* (BPB 1.26), were selected for
281 the consortium used in the bioaugmentation / biostimulation experiment. The criteria used to
282 select the isolates were based on the results of the TTC assay, rhamnolipid production and the
283 emulsification index. The bacteria were grown separately, and then 10^8 CFU/mL of each of
284 the five isolates was added to the bioaugmentation / biostimulation treatments.

285

286 3.4.2. Microbial activity (CO_2)

287 The results of CO_2 evolution during 60 days of incubation with hydrocarbon
288 contaminated and uncontaminated soils are shown in Figure 2. All of the treatments showed
289 levels of microbial respiration activity higher than the negative control (NC) (soil
290 contaminant) ($p < 0.001$) over time, indicating a capacity to metabolize hydrocarbon
291 contaminants. Very similar CO_2 production was observed among the natural attenuation,
292 bioaugmentation / biostimulation and biostimulation treatments, with no significant
293 differences.

294 A similar adaptive phase profile was also observed, which occurred after 7 days, with
295 a decrease in CO₂ production observed at the end of the experiment.

296

297 3.4.3. *Heterotrophic and diesel-degrading bacteria*

298 Bacterial growth throughout the 60 days of treatment was estimated using the MPN
299 technique. After 45 days of incubation, the number of heterotrophic microorganisms (Figure
300 3a) increased significantly in all of the treatments compared to the negative control.
301 Furthermore, the negative control remained constant until the end of the experiment, at
302 approximately 10⁵ CFU/mL, whereas the treatments presented growth between 10⁸ and 10⁹
303 CFU/mL.

304 In the experiment for the evaluation of diesel degraders (Figure 3b), the natural
305 attenuation treatment showed an increased number of degrading microorganisms compared to
306 the negative control, mainly between 45 and 54 days (10⁹ CFU/mL) but drastically
307 decreasing at 60 days of treatment (10³ CFU/mL). However, the biostimulation treatment
308 showed a reduction in CFU counts after 30 days compared to the negative control and
309 reached 10² CFU/mL at 60 days. For the bioaugmentation / biostimulation treatment, the
310 diesel-degrading populations remained within small variations during the 60 days of
311 treatment, showing the highest value among all of the treatments overall (10⁶ CFU/mL).
312 Based on the MPN values for the heterotrophic bacteria and degraders, no major differences
313 in size were observed for most of the soil microbial populations during the incubation time. It
314 can be concluded that there were no differences between the general populations and the
315 populations of heterotrophic degraders.

316

317 3.4.4. *Degradation of hydrocarbons*

318 TPH degradation was measured using gas chromatography and is summarized in
319 Table 4, which lists the variations of TPH levels at 0, 40, and 60 days for each treatment. The
320 contamination corresponded to fractions of aliphatic and aromatic hydrocarbons with C₁₃ to
321 C₂₇ chains and notable concentrations of pristane and phytane. The initial contamination of
322 the soil sample was 134.49 mg kg⁻¹ soil, which agrees with the “alert value” (limit 2.525 mg
323 kg⁻¹ soil) according to the Dutch List (Table 6530-2) (CETESB 1999). After being subjected
324 to treatment with natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation / biostimulation,
325 the contamination reached a “reference value”, for which the limit is 50 mg kg⁻¹ soil
326 according to the same literature.

327 The biostimulation treatment achieved a significant reduction in contaminants within
328 the first 40 days of treatment, whereas the reduction occurred within 60 days in the natural
329 attenuation and bioaugmentation / biostimulation treatments. The rate of degradation of the
330 contaminants at the end of the experiment showed no significant difference between the
331 natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation / biostimulation treatments, which
332 exhibited 84, 90 and 91% reductions in contamination, respectively. These results suggest
333 that the microbial consortium promoted the degradation of hydrocarbons at virtually the same
334 ratio as the native microbial community with and without the addition of nutrients.

335 In contrast to the results with the addition of a consortium that needed to acclimate in
336 the bioaugmentation / biostimulation treatment or with the lack of stimulation in the natural
337 attenuation treatment, the degradation observed within the first 40 days for the biostimulation
338 treatment suggests that stimulation of the local microbiota promoted a greater increase in the
339 rate of initial degradation.

340

341 4. Discussion

342 The partial sequence of the 16S rRNA gene of the 24 microorganisms positive for the
343 TTC redox indicator test were identified as bacteria belonging to the genera *Pseudomonas*,
344 *Bacillus* and *Acinetobacter* (Table 3). The microbial consortium was formed by *P. mendocina*
345 (BPB 1.6), *B. cereus* (BPB 1.15), *A. calcoaceticus* (BPB 1.22), *B. subtilis* (BPB 1.13) and *B.*
346 *cereus* (BPB 1.26).

347 Several authors have shown that *Pseudomonas* and *Bacillus* isolated from
348 hydrocarbon-contaminated environments are able to grow and degrade aliphatic and aromatic
349 chains (Assih et al. 2002; Fernández-Luqueño et al. 2011; Tahhan et al. 2011; Thavasi et al.
350 2011). In particular, *Pseudomonas* spp are commonly found in soils polluted with
351 hydrocarbons and, as described by Gunther et al. (2005), are the main sources of rhamnolipid
352 production. *P. aeruginosa* is considered to be a primary rhamnolipid producer, making it
353 more attractive for biodegradation, whereas biosurfactants increase the contaminant-
354 degrading capacity (Chrzanowski et al. 2012; Nitschke and Pastore 2002).

355 Coutinho et al. (2013) isolated species of *P. aeruginosa* exhibiting demulsification
356 abilities from a site contaminated with refined oil and identified that the species had a great
357 potential for the bioremediation of oil wastewater to promote environmental recovery and / or
358 oil degradation.

359 This study corroborates the literature reporting that 14 of positive isolates selected for
360 TTC were also positive for the production of rhamnolipid-type biosurfactants (Table 2), 13 of
361 which are members of *Pseudomonas* and one an *Acinetobacter* species. The emulsification
362 index of 11 isolates in our study showed indices of greater than 20% emulsification (Figure
363 1). These results are in agreement with a previous report (Dhote et al. 2010) of emulsification
364 rates of 46% and 57% for two bacteria identified as *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp.,
365 respectively, isolated from oily sludge.

366 The measurement of CO₂ production in soil is an indirect estimation of the
367 decarboxylation of organic compounds degraded in a system. Under appropriate aerobic
368 conditions, respiratory activity can be readily evaluated by the amount of CO₂ generated by
369 microbial activity under controlled conditions or in the field over a given period (Moreira and
370 Siqueira 2006). The microorganisms identified in this study are capable of assimilating
371 hydrocarbons as a carbon source to liberate CO₂.

372 All treatments resulted in higher CO₂ production than in the negative control (NC) (p
373 <0.001), suggesting the microbial capacity to metabolize hydrocarbon contaminants.
374 However, there was no significant difference in CO₂ production among the treatments
375 (Figure 2). The negative control samples showed no metabolic activity, and the natural
376 attenuation, bioaugmentation / biostimulation and biostimulation treatments had similar
377 adaptive-phase profiles, which occurred after 7 days, with a decrease in CO₂ production
378 observed at the end of the experiment (60 days). Alisi et al. (2009) showed that the microbial
379 community requires an adaptive phase to begin production of CO₂, which ceases as soon as
380 the availability of the carbon source is exhausted.

381 Additionally, the CO₂ production result was directly proportional to the growth of
382 heterotrophic and degrading microorganisms. These results suggest a positive synergistic
383 effect in the treatments, possibly due to the addition of the inoculum, the nutrient solution,
384 and even in the natural attenuation of the native microbiota, which showed high microbial
385 growth and the production of CO₂. Silva et al. (2012) demonstrated similar results for
386 biodiesel-contaminated soil, with an adaptation phase at 10 days into the experiment and a
387 decrease in behavior after 45 days. This similarity suggests that under appropriate abiotic
388 conditions, the metabolism and growth of resident microbiota were stimulated to the point of
389 achieving similar levels of CO₂ production as in the soils subjected to other treatments.

390 The biodegradation of petroleum hydrocarbons is a complex process that depends on
391 the nature and amount of oil and hydrocarbons present in the contaminated area. The low
392 availability of these contaminants to microbial attack influences the efficiency of
393 biodegradation (Cerqueira et al. 2011).

394 Although no significant differences in biodegradation were observed among the
395 bioremediation strategies, all of the degradation rates were relatively high after 60 days (84,
396 90, and 91% for natural attenuation, bioaugmentation / biostimulation and biostimulation,
397 respectively). Despite no significant difference among the treatments, these results show that
398 hydrocarbon reduction is greater in treatments with some type of stimulus, presenting
399 degradation rates that were above the average of previous studies. For example, Colla et al.
400 (2014) obtained a degradation percentage for TPH analysis that indicated biodegradation
401 levels of 35.7 and 32.2% for biostimulation and successive bioaugmentation treatments,
402 respectively.

403 A study conducted by Bento et al. (2005) also showed that natural attenuation resulted
404 in further degradation of the light fraction of TPHs in soil and attributed this effect to
405 indigenous adaptation that allows organisms to become physiologically compatible with their
406 habitat, in contrast to transient exogenous organisms that do not occupy a functional niche.
407 This effect is also demonstrated in a study by Couto et al. (2010), in which treatment via
408 natural attenuation was as efficient as treatments of bioaugmentation and biostimulation in
409 contaminated soil from a petroleum refinery.

410 Some authors suggest that more effective bioaugmentation is achieved by repeating
411 the application of the microbial consortium during the degradation period because of the
412 tendency of the autochthonous population to overcome the exogenous inoculum (Tahhan et
413 al. 2011) and thus the microbial communities in contaminated soil are able to express their
414 degrading potential.

415 However, in the present study, the difference between the attenuation and natural
416 treatments and bioaugmentation / biostimulation was only 6%, even with successive additions
417 of the consortium. According to Sabaté et al. (2004), natural attenuation in soils with old
418 contamination can have a very beneficial effect because the native microorganisms are
419 already adapted to the contaminant; however, this situation is not consistent with our study
420 because the microorganisms inoculated in the bioaugmentation / biostimulation treatment
421 were isolated from the soil that was used in the treatment and were already adapted to the
422 contaminants. As described by Tyagi et al. (2011), an imbalance in the natural conditions of
423 abiotic factors may make the process unachievable and reduce the exposure of a specialized
424 population of microorganisms to the natural conditions of competition and predation, also
425 potentially decreasing the efficiency of biodegradation.

426

427 **5. Conclusions**

428 This study showed that the contaminant degradation observed in bioaugmentation
429 performed with the same bioprospected microbes as found in the contaminated soil used in
430 microcosms was no higher than in natural attenuation and biostimulation treatments.
431 Nonetheless, bioremediation was achieved because all of the treatments were found to be
432 effective in reducing contaminants, even without a significant increase in the population of
433 heterotrophic and degrading bacteria. This would result in a low microorganism count, and
434 contaminated soils may be bioaugmented with native microbiota to stimulate remediation.

435

436 **Acknowledgments**

437 The authors are thankful for the infrastructure of Bioplus Desenvolvimento Biotecnológico
438 Ltda for the use of their facilities and their financial support.

439 This work was supported by grants from the following Brazilian agencies: Conselho Nacional
440 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento
441 de Pessoal do Ensino Superior (CAPES). SRA received a scholarship from Fundação de
442 Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).
443

444 **References**

- 445 Alisi, C., Musella, R., Tasso, F., Ubaldi, C., Manzo, S., Cremisini, C., Sprocati, A.R., 2009.
446 Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a
447 microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance.
448 Science of the Total Environment 407, 3024-3032.
449 doi:10.1016/j.scitotenv.2009.01.011.
- 450 ANP (Agência Nacional do Petróleo), 2013, online at: <http://www.anp.gov.br/>.
- 451 APHA, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Waste-Water (19th ed.),
452 American Public Health Association, Washington, DC.
- 453 Assih, E.A., Ouattara, A.S., Thierry, S., Cayol, J.L., Labat, M., Macarie, H., 2002.
454 *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., A strictly aerobic bacterium isolated from
455 an upflow anaerobic sludge blanket (Uasb) reactor. International Journal of
456 Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 559-568.
- 457 Bartha, R., Pramer, D., 1965. Features of a flask and method for measuring the persistence
458 and biological effects of pesticides in Soil. Soil Science 100, 68-70.
459 doi:10.1097/00010694-196507000-00011.
- 460 Bento, F.M., Camargo, F.A., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T., 2005. Comparative
461 bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation,
462 biostimulation and bioaugmentation. Bioresource Technology 96, 1049-1055.
463 doi:10.1016/j.biortech.2004.09.008.
- 464 Bento, F.M., Camargo, F.A.dO., Okeke, B., Frankenberger-Júnior, W.T., 2003.
465 Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. Brazilian Journal of Microbiology
466 34, 65-68. doi:10.1590/S1517-83822003000500022.

467 Braddock, J.F., Catterall, P.H., 1999. A simple method for enumerating gasoline- and Diesel-
468 degrading microorganisms. *Bioremediation Journal* 3, 81-84.
469 doi:10.1080/10889869991219226.

470 Cerqueira, V.S., Hollenbach, E.B., Maboni, F., Vainstein, M.H., Camargo, F.A., do Carmo R
471 Peralba, M., Bento, F.M., 2011. Biodegradation potential of oily sludge by pure and
472 mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology* 102, 11003-11010.
473 doi:10.1016/j.biortech.2011.09.074.

474 CETESB, 1999. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Lista holandesa de
475 valores de qualidade do solo e da água subterrânea, Valores STI., online at
476 http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/areas_contaminadas/anexos/download/6530.pdf

477 CETESB, 2012. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, online at
478 <http://www.cetesb.sp.gov.br>.

479 Chrzanowski, L., Lawniczak, L., Czaczyk, K., 2012. Why do microorganisms produce
480 rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 401-419.
481 doi:10.1007/s11274-011-0854-8.

482 Colla, T.S., Andrezza, R., Bücke, F., De Souza, M.M., Tramontini, L., Prado, G.R.,
483 Frazzon, A.P., Camargo, F.A., Bento, F.M., 2014. Bioremediation assessment of
484 diesel-biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy.
485 *Environmental Science and Pollution Research International* 21, 2592-2602.
486 doi:10.1007/s11356-013-2139-2.

487 CONAMA Nº 273, 2000. Conselho Nacional do Meio Ambiente, online at
488 <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27300.html>.

489 Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface-active agents from two *bacillus* species.
490 *Applied and Environmental Microbiology* 53, 224-229.

491 Coutinho, J.O., Silva, M.P., Moraes, P.M., Monteiro, A.S., Barcelos, J.C., Siqueira, E.P.,
492 Santos, V.L., 2013. Demulsifying properties of extracellular products and cells of
493 *Pseudomonas aeruginosa* MSJ isolated from petroleum-contaminated soil.
494 *Bioresource Technology* 128, 646-654. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.137.

495 Couto, M.N., Monteiro, E., Vasconcelos, M.T., 2010. Mesocosm trials of bioremediation of
496 contaminated soil of a petroleum refinery: comparison of natural attenuation,
497 biostimulation and bioaugmentation. *Environmental Science and Pollution Research*
498 *International* 17, 1339-1346. doi:10.1007/s11356-010-0318-y.

499 Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants:
500 an overview. *Biotechnology Research International* 2011, 941810.
501 doi:10.4061/2011/941810.

502 Dhote, M., Juwarkar, A., Kumar, A., Kanade, G.S., Chakrabarti, T., 2010. Biodegradation of
503 chrysene by the bacterial strains isolated from oily sludge. *World Journal of*
504 *Microbiology and Biotechnology* 26, 329-335. doi:10.1007/s11274-009-0180-6.

505 Dybas, M.J., Hyndman, D.W., Heine, R., Tiedje, J., Linning, K., Wiggert, D., Voice, T.,
506 Zhao, X., Dybas, L., Criddle, C.S., 2002. Development, operation, and long-term
507 performance of a full-scale biocurtain utilizing bioaugmentation. *Environmental*
508 *Science & Technology* 36, 3635- 3644. doi:10.1021/es0114557.

509 El Fantroussi, S., Agathos, S.N., 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant
510 removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology* 8, 268-275.
511 doi:10.1016/j.mib.2005.04.011.

512 Evans, F.F., Rosado, A.S., Sebastián, G.V., Casella, R., Machado, P.L., Holmström, C.,
513 Kjelleberg, S., Van Elsas, J.D., Seldin, L., 2004. Impact of oil contamination and
514 biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil

515 microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* 49, 295-305.
516 doi:10.1016/j.femsec.2004.04.007.

517 Fernández-Luqueño, F., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Martínez-Suárez, C., Vázquez-
518 Núñez, E., Dendooven, L., 2011. Microbial communities to mitigate contamination of
519 PAHs in soil – possibilities and challenges: a review. *Environmental Science and*
520 *Pollution Research International* 18, 12-30. doi:10.1007/s11356-010-0371-6.

521 Gunther, N.W., Nuñez, A., Fett, W., Solaiman, D.K., 2005. Production of rhamnolipids by
522 *pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and Environmental*
523 *Microbiology* 71, 2288-2293. doi:10.1128/AEM.71.5.2288-2293.2005.

524 Jiménez, N., Viñas, M., Bayona, J.M., Albaiges, J., Solanas, A.M., 2007. The prestige oil
525 spill: bacterial community dynamics during a field biostimulation assay. *Applied*
526 *Microbiology and Biotechnology* 77, 935-945. doi:10.1007/s00253-007-1229-9.

527 Lin, T.C., Pan, P.T., Young, C.C., Chang, J.S., Chang, T.C., Cheng, S.S., 2011. Evaluation of
528 the optimal strategy for ex situ bioremediation of diesel oil-contaminated soil.
529 *Environmental Science and Pollution Research International* 18, 1487-1496.
530 doi:10.1007/s11356-011-0485-5.

531 Meyer, D.D., Beker, S.A., Bücker, F., Peralba, M.dC.R., Guedes Frazzon, A.P., Osti, J.F.,
532 Andreatza, R., Camargo, F., Bento, F.M., 2014. Bioremediation strategies for diesel
533 and biodiesel in oxisol from southern Brazil. *International Biodeterioration and*
534 *Biodegradation* 95, 356-363. doi:10.1016/j.ibiod.2014.01.026.

535 Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R.C., Lal, B., 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate
536 in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied and Environmental*
537 *Microbiology* 67, 1675-1681. doi:10.1128/AEM.67.4.1675-1681.2001.

538 Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O., 2006. *Microbiologia e bioquímica do Solo*. Editora Ufla,
539 Lavras.

540 Mukherjee, A.K., Bordoloi, N.K., 2011. Bioremediation and reclamation of soil contaminated
541 with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-
542 scale study. *Environmental Science and Pollution Research International Environ.*
543 *Sci. Environmental Science and Pollut. Res. Pollution Research* 18, 471-478.
544 doi:10.1007/s11356-010-0391-2.

545 Nitschke, M., Pastore, G.M., 2002. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química*
546 *Nova* 25, 772-776.

547 Sabaté, J., Viñas, M., Solanas, A.M., 2004. Laboratory-scale bioremediation experiments on
548 hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*
549 54, 19–25.

550 Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring
551 Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

552 Silva, G.S., Marques, E.L.S., Dias, J.C.T., Lobo, I.P., Gross, E., Brendel, M., Da Cruz, R.S.,
553 Rezende, R.P., 2012. Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments
554 using soil from the Atlantic Rain Forest. *Applied Soil Ecology* 55, 27-35.
555 doi:10.1016/j.apsoil.2012.01.001.

556 Stotzky, G., 1965. Microbial respiration. In: Black, C.A. (Ed.), *Methods in Soil Analysis*,
557 SSSA, Madison, pp. 1550-1572.

558 Szulc, A., Ambrożewicz, D., Sydow, M., Lawniczak, L., Piotrowska-Cyplik, A., Marecik, R.,
559 Chrzanowski, L., 2014. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition
560 on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field
561 studies. *Journal of Environmental Management* 132, 121-128.
562 doi:10.1016/j.jenvman.2013.11.006.

563 Tahhan, R.A., Ammari, T.G., Goussous, S.J., Al-Shdaifat, H.I., 2011. Enhancing the
564 biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified

565 bioaugmentation strategy. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65, 130-
566 134.

567 Tedesco, M.J., Gianello, C., Bissani, C.A., Bohnen, H., Volkweiss, S.J., 1995. *Análise de*
568 *Solos, Plantas e Outros Materiais (Analysis of Soils, Plants and Other Materials)*,
569 Departamento de Solos, UFRGS, Porto Alegre, 174.

570 Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Banat, I.M., 2011. Effect of biosurfactant and fertilizer on
571 biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*,
572 *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*
573 102, 772-778. doi:10.1016/j.biortech.2010.08.099.

574 Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., de Carvalho, C. C., 2011. Bioaugmentation and
575 biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes.
576 *Biodegradation* 22, 231-241.

577 USEPA METODO 8015B Orgânicos Nonhalogenados usando GC/FID (Nonhalogenated
578 Organics Using GC/Fid), 1996, online at
579 <http://www.caslab.com/EPAMethods/PDF/8015b.pdf>.

580 Xu, Y., Lu, M., 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different
581 biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials* 183,
582 395-401. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.07.038.

583

584 **Figure legends**

585

586 **Fig. 1**

587 Biosurfactant production after 24 h. C- Negative control.

588

589 **Fig. 2**

590 Mineralization rates ($\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1}$) during experiments involving microcosms with B5 and
591 lasting 60 days.

592

593

594 **Fig. 3**

595 Estimated number of total heterotrophic and degrading microorganisms during the 60 days of
596 the experiment. (A) Heterotrophic bacteria; (B) Bacterial degradation.

597

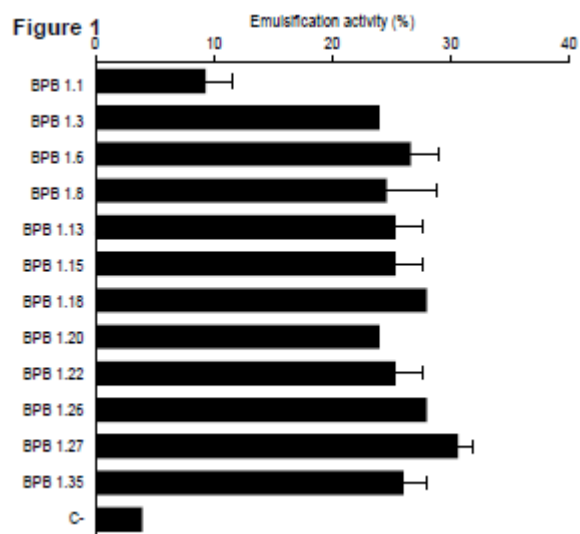


Figure 2

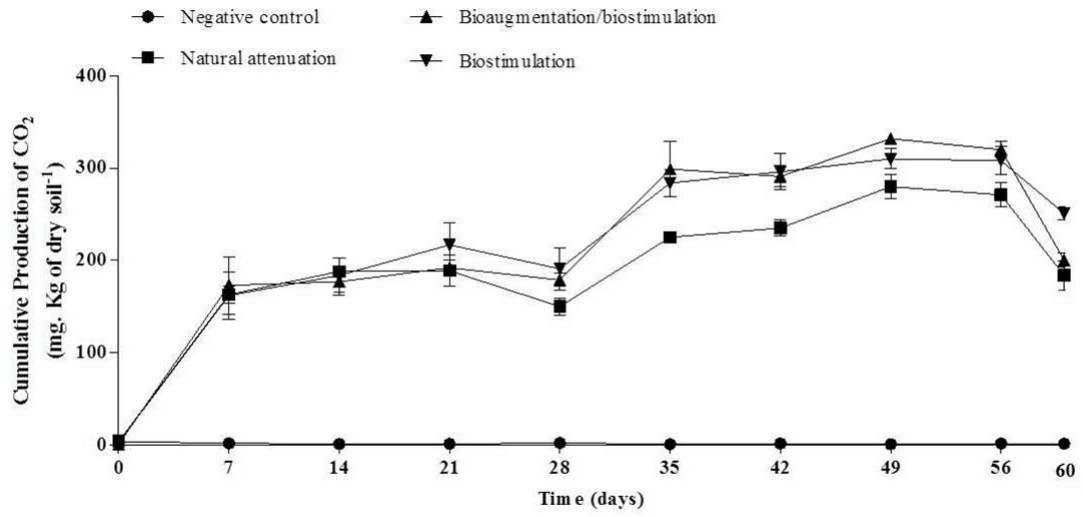


Figure 3

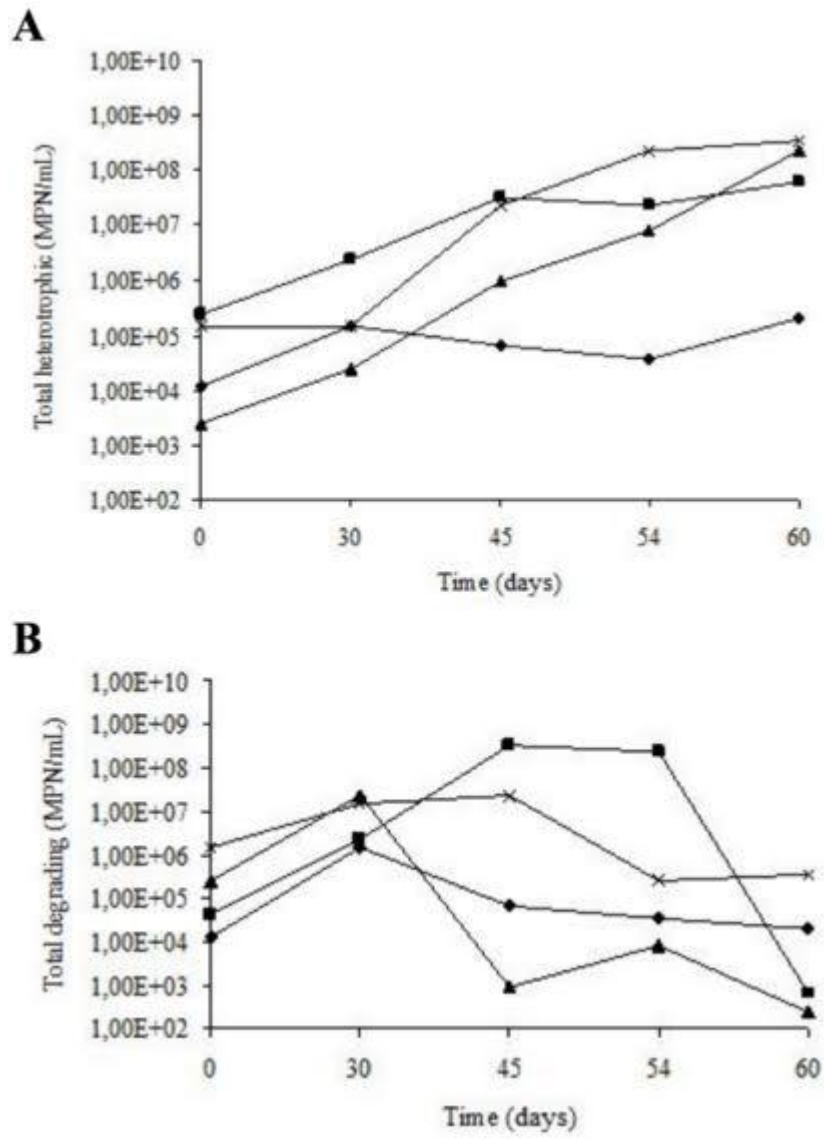


Table 1. Physico-chemical characteristics of diesel oil-contaminated soils

Parameter	Depth (2-3m)
Organic matter (g Kg^{-1})	11
Clay (%)	9
Fine sand (%)	41
Silt (%)	8
Organic carbon (g Kg^{-1})	5
Total nitrogen (g Kg^{-1})	0.5
P (mg / dm^3)	0
K (mg / dm^3)	65
CTC ($\text{mmol}_c / \text{dm}^3$) ¹	2.4
CTC pH 7 ($\text{mmol}_c / \text{dm}^3$) ²	5.2
Al ($\text{mmol}_c / \text{dm}^3$)	0.8
Ca ($\text{mmol}_c / \text{dm}^3$)	0.6
Mg ($\text{mmol}_c / \text{dm}^3$)	0.2
Al+H ($\text{cmol}_c / \text{dm}^3$)	3.9
pH (H_2O)	4.5

Table 2. Rhamnolipid production and degradation by 34 isolates based on the TTC method.

Isolate	Rhamnolipid	TCC
BPB 1.1	+	+
BPB 1.2	+	-
BPB 1.3	+	+
BPB 1.4	+	+
BPB 1.5	-	-
BPB 1.6	-	+
BPB 1.7	-	-
BPB 1.8	-	+
BPB 1.9	+	+
BPB 1.10	+	+
BPB 1.11	+	+
BPB 1.12	+	+
BPB 1.13	-	+
BPB 1.14	+	+
BPB 1.15	-	+
BPB 1.16	-	-
BPB 1.17	-	+
BPB 1.18	-	+
BPB 1.19	-	+
BPB 1.20	-	+
BPB 1.21	+	+
BPB 1.22	+	+
BPB 1.23	+	-
BPB 1.24	+	+
BPB 1.25	-	+
BPB 1.26	-	+
BPB 1.27	+	+
BPB 1.28	+	-
BPB 1.29	-	-
BPB 1.30	+	+
BPB 1.31	+	-
BPB 1.32	+	-
BPB 1.33	+	-
BPB 1.35	+	+

+ positive reaction; - negative reaction

Table 3. Molecular identification of bacteria isolated from contaminated soil.

Isolate	Identification	Identity (%)
BPB 1.1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	98
BPB 1.3	<i>Pseudomonas mendocina</i>	99
BPB 1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
BPB 1.6	<i>Pseudomonas mendocina</i>	99
BPB 1.8	<i>Pseudomonas mendocina</i>	99
BPB 1.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
BPB 1.10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
BPB 1.11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
BPB 1.12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
BPB 1.13	<i>Bacillus subtilis</i>	99
BPB 1.14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
BPB 1.15	<i>Bacillus cereus</i>	99
BPB 1.17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
BPB 1.18	<i>Bacillus subtilis</i>	99
BPB 1.19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
BPB 1.20	<i>Bacillus cereus</i>	99
BPB 1.21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
BPB 1.22	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	99
BPB 1.24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
BPB 1.25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
BPB 1.26	<i>Bacillus cereus</i>	99
BPB 1.27	<i>Pseudomonas putida</i>	97
BPB 1.30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
BPB 1.35	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99

Table 4. Degradation of total petroleum hydrocarbons (TPHs), pristane and phytane present in contaminated soils using different bioremediation strategies.

Original sample	Time (days)	Natural attenuation	Bioaugmentation/ Biostimulation	Biostimulation
132.7 ± 1.53	0			
	40	120.6 ± 84.32 Aa	103.0 ± 8.81 Aa	43.6 ± 13.26 Ab
	60	17.1 ± 12.87 Bb**	9.42 ± 4.00 Bb**	7.79 ± 3.17 ABb**

Biodegradation extent (mg/Kg soil⁻¹). The values followed by the same capital letters are not significantly different among treatments based on Bonferroni's test ($p < 0.05$), and values followed by the same lowercase letters are not significantly different among time (days) based on Bonferroni's test ($p < 0.05$).

Asterisks denote a significant difference (*, $p < 0.05$) between the original sample and the treatments calculated by Bonferroni's test.

4. CAPÍTULO II

Development of a microbial consortium for large-scale treatment of hydrocarbon-contaminated soils.

Manuscrito submetido a **Environmental Science and Pollution Research** 15/04/2015.

Environmental Science and Pollution Research
Development of a microbial consortium for large-scale treatment of hydrocarbon-contaminated soils
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:					
Full Title:	Development of a microbial consortium for large-scale treatment of hydrocarbon-contaminated soils				
Article Type:	Research Article				
Keywords:	Large-scale; biodegradation; hydrocarbons; bioremediator; bacterial diversity; DGGE.				
Corresponding Author:	Marilene Henning Vainstein Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, Rio Grande do Sul BRAZIL				
Corresponding Author Secondary Information:					
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Rio Grande do Sul				
Corresponding Author's Secondary Institution:					
First Author:	Sara R Allebrandt, MsC				
First Author Secondary Information:					
Order of Authors:	Sara R Allebrandt, MsC Amanda P Napp, MsC Sydnei Mitidieri, PhD Franciele Bucker, MsC Fatima M Bento, PhD Marilene Henning Vainstein				
Order of Authors Secondary Information:					
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (000091-2551/12-7)</td> <td>Sara R Allebrandt</td> </tr> <tr> <td>Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (23038001433/2014-64)</td> <td>Dra. Marilene Henning Vainstein</td> </tr> </table>	Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (000091-2551/12-7)	Sara R Allebrandt	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (23038001433/2014-64)	Dra. Marilene Henning Vainstein
Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (000091-2551/12-7)	Sara R Allebrandt				
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (23038001433/2014-64)	Dra. Marilene Henning Vainstein				
Abstract:	Bioremediation techniques can be used for the treatment of diesel oil-contaminated soils. Thus, the aim of the present study was to compare different methodologies of bioremediation applied on a large-scale (300 Kg of soil). The bioaugmentation/biostimulation (BAE), biostimulation (BE) and natural attenuation (NA) techniques were analyzed with and without aeration. The consortium used in bioaugmentation was produced at a scale of 100 liters, comprising four microorganisms. The degradation of contaminants was quantified in fractions C8-C11, C11-C14, C14-C20 and C20-C40. Treatment using NA with aeration reached a maximum of 98% degradation. The total amount of contaminants increased after BE treatment, and BAE treatment with aeration and without aeration obtained 32% and 85% degradation, respectively. Denaturing gradient gel electrophoresis showed no significant difference in the biodiversity of the treatments with or without air.				
Suggested Reviewers:	Christine C Gaylarde, PhD Professor, University of Portsmouth, UK cgaylarde@gmail.com				

	Expert in the subject of the manuscript.
	andrea franzetti andrea.franzetti@unimib.it
	published work with bioaugmentation
	Antonio Mucha, PhD amucha@cimar.up.pt
	expert in the subject
Opposed Reviewers:	

1 1 **Development of a microbial consortium for large-scale treatment of hydrocarbon-**
2
3
4 2 **contaminated soils.**
5
6 3 Sara R. Allebrandt ^{a,b}, Amanda P. Napp ^{a,b}, Sydney Mitidieri ^b, Francielle Bucker ^c,
7
8 4 Fatima M. Bento ^c, Marilene H. Vainstein ^{a,d*}
9
10
11
12
13 6 ^a Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento
14
15 7 Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.
16
17 8 ^b Bioplus Desenvolvimento Biotecnológico Ltda., Beco Jose Paris, 339, CEP 91140-
18
19 9 310, Porto Alegre, RS, Brazil.
20
21 10 ^c Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal do
22
23 11 Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.
24
25 12 ^d Department of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do Rio
26
27 13 Grande do Sul, Bento Gonçalves, 9500, CEP 91500-970, Porto Alegre, RS, Brazil.
28
29
30
31
32 14
33
34 15 Sara R. Allebrandt (sallebrandt@gmail.com)
35
36 16 Amanda P. Napp (amanda.apn@gmail.com)
37
38 17 Sydney Mitidieri (mitidieri@bioplus.ind.br)
39
40 18 Franciele Bucker (franbucker@gmail.com)
41
42 19 Fátima M. Bento (fatima.bento@ufrgs.br)
43
44 20 Marilene H. Vainstein (mhv@cbiot.ufrgs.br)
45
46
47 21
48
49 22 * Corresponding author. Tel: +55 (51) 33086060; Fax: +55 (51) 33087309 (M.H.
50
51
52 23 Vainstein). E-mail: mhv@cbiot.ufrgs.br
53
54
55
56
57 24
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

25 **Abstract**

26 Bioremediation techniques can be used for the treatment of diesel oil-
27 contaminated soils. Thus, the aim of the present study was to compare different
28 methodologies of bioremediation applied on a large-scale (300 Kg of soil). The
29 bioaugmentation/biostimulation (BAE), biostimulation (BE) and natural attenuation
30 (NA) techniques were analyzed with and without aeration. The consortium used in
31 bioaugmentation was produced at a scale of 100 liters, comprising four microorganisms.
32 The degradation of contaminants was quantified in fractions C₈-C₁₁, C₁₁-C₁₄, C₁₄-C₂₀
33 and C₂₀-C₄₀. Treatment using NA with aeration reached a maximum of 98%
34 degradation. The total amount of contaminants increased after BE treatment, and BAE
35 treatment with aeration and without aeration obtained 32% and 85% degradation,
36 respectively. Denaturing gradient gel electrophoresis showed no significant difference
37 in the biodiversity of the treatments with or without air.

38

39

40

41

42 Keywords: Large-scale; biodegradation; hydrocarbons; bioremediator; bacterial

43 diversity; DGGE.

44

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

45 **Introduction**

46 Petroleum hydrocarbons and derivatives, including saturated and unsaturated
47 alkanes and aromatic organic compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons
48 (PAHs) and aromatic hydrocarbons containing nitrogen and sulfur, are among the main
49 environmentally hazardous compounds (Liang et al., 2012).

50 Accidental spills during exploitation transport, processing, storage, and use
51 result in soil pollution, presenting potential hazards to human health and ecosystems
52 (Banks and Schultz 2005; Teng et al. 2013). In addition, cases of large or small spills
53 remained undetected for a long period, resulting in combustible gases in the soil and
54 potentially dangerous conditions for the environment and population of soils (Bofetta et
55 al. 1997; Almeida et al. 2010).

56 Bioremediation might be utilized as an alternative for decontamination of
57 polluted areas, offering the potential for degrading toxic contaminants primarily using
58 microorganisms with metabolic and physiological capacity to use hazardous organic
59 compounds as a source of carbon and energy. Additionally, this technique provides
60 efficient results, simplified maintenance, wide applicability and low cost of operation
61 (Bento et al. 2005; Megharaj et al. 2011).

62 The use of microorganisms in bioremediation (bioaugmentation) represents a
63 cost effective alternative to reduce and/or eliminate the hydrocarbon compounds in
64 contaminated soil (Chandra et al. 2013; Fukuhara et al. 2013; Shankar et al. 2014).
65 Indeed, the presence of microorganisms that potentially degrade petroleum
66 hydrocarbons in contaminated and uncontaminated soils has been well documented
67 (Kaczorek and Olszanowski 2011), suggesting that the natural soil microflora can be
68 useful for stimulated degradation. This stimulation (biostimulation) occurs through the

1 69 addition of nutrients together with microorganisms that accelerate the fuel degrading
2
3 70 process (Tyagi et al. 2011).
4

5 71 Previous studies have described methods of remediation; however, most of these
6
7 72 results were reported at the laboratory scale. Large-scale studies concerning both the
8
9 73 production of microorganisms and bioremediation treatment are limited. Thus, the aim
10
11 74 of the present study was to evaluate the production and application of microorganisms
12
13 75 in a large-scale assay to analyze the effects of different remediation treatments applied
14
15 76 *in situ* to generate an environmentally safe alternative formulation.
16
17
18
19
20
21

22 77

23 78 **Materials and Methods**

24 79 **Soil samples**

25 80 Diesel oil-contaminated soils utilized in large-scale experiment were collected
26
27 81 from the sand filters system of gas stations located in Porto Alegre, Rio Grande do Sul,
28
29 82 Brazil. The filter system, comprising a sand box, an oil separator box and an oil
30
31 83 collector box, was used to collect the oil and fractionate of the solid waste generated at
32
33 84 fuel stations. This system separates water from oil coming from the car wash, car
34
35 85 supply, fuel discharge and exchange of lubricants. After collecting, the samples were
36
37 86 placed in sterile bags hermetically closed and stored at 4 °C until further use.
38
39
40
41
42
43
44

45 87

46 88 **Isolation of hydrocarbon degraders**

47 89 The bacterial strains used in this study were isolated from diesel-biodiesel-
48
49 90 contaminated soil collected during the replacement of underground fuel storage tanks
50
51 91 from a gas station located in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Latitude: -
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 92 30.0277, Longitude: -51.2287 30°1'40" South, 51°12'43" West). This soil was used as
2
3
4 93 the basis for the belowground supply tank located at a 2-3 meter depth.

5
6 94 The microbial isolation was conducted according to Bento et al. (2005).
7
8 95 Erlenmeyer flasks (250 mL) were inoculated with contaminated soil (1 g) and 1% diesel
9
10 96 oil B5 (95% petroleum diesel and 5% biodiesel) in a final volume of 100 mL of mineral
11
12 97 medium 1 (MM1). The cultures were incubated at 190 rpm and 30 °C. After incubation
13
14 98 for 7 days, a 10-mL aliquot was collected and transferred to a flask containing 100 mL
15
16 99 of MM1, followed by incubation under the same conditions. After three transfers, the
17
18 100 cultures were serially diluted and subjected to surface spreading, and the selected
19
20
21 101 colonies were plated onto nutrient agar. The isolated microorganisms were maintained
22
23
24
25 102 at 4 °C.
26
27

28 103

30 104 **Molecular Identification of microorganisms**

31
32 105 The bacteria isolates were grown in 10 mL of nutrient broth at 30 °C for 24 h.
33
34 106 The genomic DNA of each culture was extracted according to Sambrook and Russell
35
36 107 (2001). Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to amplify the 16S rRNA gene of
37
38 108 each bacterial isolate using the following universal oligonucleotides: 27F (5' AGA GTT
39
40 109 TGA TCM TGG CTC AG 3) and 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3').
41
42
43 110 The reactions were prepared using 1X Go Taq Reaction Buffer (containing 1.5 mM
44
45 111 MgCl₂), 0.2 mM dNTP, 10 pmol of each oligonucleotide, 1.25 U Go Taq DNA
46
47 112 polymerase (Promega) and 1 µg genomic DNA in 25 µl total reaction volume. The
48
49 113 following amplifications conditions were used: one cycle at 95°C for 5 min, followed by
50
51 114 35 cycles at 95 °C for 1 min, 65 °C for 1.3 min, 72 °C for 1 min and a final extension
52
53
54
55 115 step at 72 °C for 5 min.
56
57
58
59
60
61
62
63
64

1 116 The PCR products were analyzed using 1% agarose gel electrophoresis. The
2
3 117 amplicons were purified using the PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen),
4
5 118 according to the manufacturer's instructions. The DNA quantification was performed
6
7 119 through fluorometric analysis using a Qubit fluorometer (Invitrogen) and DNA
8
9 120 quantification Quant-iT Kit, according to the manufacturer's instructions.
10
11 121 Approximately 200 ng of genomic DNA were used for sequencing on a MegaBACE
12
13 122 1000 Sequencing Platform. Nucleotide sequence similarity searches were conducted
14
15 123 using GenBank nucleotide collection BLAST searches.
16
17
18
19
20
21

22 124

23 125 **Cell growth in 100 liters reactor and Formulation of Microbial Consortium**

24
25 126 The production of microorganisms was conducted in four phases: (1) the pre-
26
27 127 inoculum of each microorganism was generated in 10 mL of sterile nutrient broth for 24
28
29 128 h at 37 °C with shaking (200 rpm); (2) after incubation, the 10 mL pre-inoculum was
30
31 129 transferred to 300 mL sterile nutrient broth and incubated for an additional 12 h at 37 °C
32
33 130 with shaking (200 rpm); (3) the 300 mL inoculum was subsequently transferred to a 10
34
35 131 L reactor containing sterile nutrient broth, and incubated for 15 h at 37 °C with shaking
36
37 132 (200 rpm); and (4) the contents of the 10 L reactor was transferred to a 100 L reactor
38
39 133 containing sterile nutrient broth (0.5 g/L MgSO₄, 0.05 g/L MnSO₄ and 0.1 g/L CaCl₂)
40
41 134 and incubated at 37 °C under agitation at 400 rpm. After 24 h incubation, the cells were
42
43 135 centrifuged in an industrial centrifuge at 5,000 rpm for 2 h. Cell growth in the 10 and
44
45 136 100 L reactors was monitored for pH, optical density (OD₆₆₀) and Gram staining (Table
46
47 137 1). The cell pellet was resuspended and stored at 4 °C until further use.
48
49
50
51

52 138

53 139 **Large-Scale Bioremediation Treatments**

54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 140 Three wood boxes, with dimensions of 1 m × 1 m × 0.60 m (L × W × H), were
2
3 141 used to accommodate contaminated soil. Each box containing 300 kg of soil
4
5 142 contaminated with hydrocarbons represented one of the following remediation
6
7 143 treatments: natural attenuation (NA) (natural ability to degrade the contaminant),
8
9 144 bioaugmentation/biostimulation (BAE) and biostimulation (BE). The boxes were
10
11 145 divided in half, and each moiety sustained 150 kg of contaminated soil. One side of the
12
13 146 box received a weekly injection for 60 days at 0.25 kgf/cm² of air using an air
14
15 147 compressor for 30 min.
16
17
18
19

20 148 During this period, the corresponding stimuli were applied: for BE, the soil was
21
22 149 treated with 200 mL of nutrient solution (NH₄SO₄ and KH₂PO₄), for BAE, the soil was
23
24 150 treated with 500 mL of consortium, containing *Pseudomonas mendoncina* (BPB 1.8),
25
26 151 *Bacillus cereus* (BPB 1.20), *Bacillus cereus* (BPB 1.26) and *Bacillus sphaericus* (BPB
27
28 152 1.35) at 2.24 × 10⁸ cells mL⁻¹ of each microorganism, and 200 mL of the same nutrient
29
30 153 solution. Soil samples were collected at depths of 0.2 m to 0.5 m at four different sites
31
32 154 in the boxes, forming a composite sample to determine the pH, bacterial diversity and
33
34 155 concentration of total petroleum hydrocarbons (TPH). The treatments were performed at
35
36 156 room temperature ranging from 15 to 30 °C.
37
38
39
40
41

42 157 The soil pH at both sides of the boxes was determined three times (0, 30 and 60
43
44 158 days) using a digital pH meter (Beckman PHI 71 Model).
45
46
47

48 159

49 160 **Gas chromatography**

50
51 161 Total petroleum hydrocarbons (TPH) were determined using the EPA 8015-D
52
53 162 technique to analyze different fractions of organic compounds: C₈–C₁₁ (gasoline range
54
55 163 organics), C₁₁–C₁₄ (kerosene range organics), C₁₄–C₂₀ (diesel range organics) and C₂₀–
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 164 C₄₀ (lubricating oil range organics). The analyses were based on the Purge-and-Trap
2
3 165 (Methods 5030 or 5035) and Headspace (Method 5021) methods. A 1- μ L sample was
4
5 166 injected into GC under the following conditions: 50 °C for 0.5 min, with a ramp to 350
6
7
8 167 °C at 50 °C/min, and this temperature was maintained for 3.5 min; Inlet: 270 °C with
9
10 168 Split 12 mL/min; Carrier: 1 mL/min; Chromatographic Column 5 - 30-m x 0.53-mm ID
11
12 169 fused-silica capillary column bonded with HP Basic Wax (or equivalent), 1- μ m film
13
14 170 thickness.
15
16
17
18 171

20 172 **Soil DNA extraction, PCR and DGGE analysis**

22 173 Total DNA was extracted from 300 mg of soil samples using the PowerSoil
23
24 174 DNA Isolation Kit (MO BIO Inc., USA), according to the manufacturer's instructions.
25
26 175 A fragment of the V3 region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified from
27
28 176 metagenomic DNA using the primers BA338 F-GC (5'-278 CGC CCG CCG CGC GCG
29
30 177 GCG GGC GGG GCG GGGCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-
31
32
33 178 3') and UN518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Ovreas et al., 1997).
34
35
36

37 179 Amplification was performed in a reaction containing 20 ng μ L⁻¹ of DNA
38
39 180 template, 1 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 3 mM MgCl₂, 0.2 mM
40
41 181 dNTP, and 5 pmol of each primer at a final volume of 25 μ L. The amplification
42
43 182 conditions were 5 min at 95 °C, followed by 30 cycles for 1 min at 95 °C, 1 min at 55
44
45 183 °C, and 1 min at 72 °C with a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR amplicons
46
47 184 were analyzed through Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) according to
48
49 185 the method of Ovreas et al. (1997). An 8% polyacrylamide (acrylamide/bis -acrylamide
50
51 186 mix 37.5:1w/v) gel containing a 15–55% urea-formamide gradient was used. The
52
53
54 187 electrophoresis was performed in 1 \times TAE buffer at a constant 200 V for 3 h and 30 min
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 188 at 60 °C using the DCode TM System (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA). After
2
3 189 electrophoresis, the gel was stained with 3 µL Syber Green I (Invitrogen) in 300 mL of
4
5 190 Milli-Q water for 30 min. The images were acquired using a Kodak GL2200
6
7
8 191 photodocumentation system. The DGGE profiles were compared using Gel Compar
9
10 192 software, followed by visual analysis. The resulting patterns were used to estimate the
11
12 193 diversity via the Shannon-Weaver (H') index. Each band was considered an operational
13
14 194 taxonomic unit. The data analysis was performed using the DivEs Species Diversity
15
16 195 program, version 2.0. Dendrograms were produced after evaluating the binary array
17
18 196 generated from the band profiles and subjected to statistical analysis using the Dice
19
20 197 coefficient.
21
22
23
24
25
26

27 198

28 199 **Evaluation of CO₂ production**

29
30 200 The CO₂ production was determined using the respirometric method of Bartha
31
32 201 (Bartha and Pramer 1965), which directly assesses microbial activity based on the
33
34 202 carbon produced during microbial respiration as an indirect measurement of the
35
36 203 biodegradation of organic contaminants. Microcosms were assembled with 300 g of the
37
38 204 soil obtained from the remediation treatments (NA, BAE and BE) and a negative
39
40 205 control (soil without contamination) and monitored for 60 days.
41
42
43

44 206 The carbon dioxide produced during the microbial activity was captured using a
45
46 207 0.2 M KOH solution (10 mL) located at the side of the biometer flasks. Periodically, the
47
48 208 KOH solution was removed and 1 mL of 0.5 M BaCl₂ solution and 3 drops of 1%
49
50 209 phenolphthalein indicator were added. The residual KOH was titrated with 0.1 M HCl
51
52 210 standardized solution. The amount of carbon dioxide produced was obtained through
53
54 211 the Eq. (1):
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 212 $\text{CO}_2 \text{ generated (mg/Kg soil)} = (V_B - V_A) \cdot (M_C/2) \cdot M_{\text{HCl}} \cdot FC/m$ (1)
2
3

4 213 Where V_B and V_A are the volume of 0.1 M HCl used to titrate the blank and the
5
6 214 treatment in mL, respectively; M_C is the molar mass of carbon dioxide in g/mol; M_{HCl} is
7
8 215 the molar concentration of HCl standard solution in mol/L; FC is the correction factor
9
10 216 for acid/base molarity ($M_{\text{HCl}}/M_{\text{KOH}}$); and m is the mass in Kg of dry soil in the flask.
11
12

13 217

14 218 **Statistical Analysis**

15
16 219 Descriptive statistics were based on biological triplicates using ANOVA, followed
17
18 220 by Boneferroni's test with a confidence level of 95%.
19
20

21 221

22 222 **Results and discussion**

23 223 **Selection of microorganisms**

24
25 224 Four microorganisms were selected as the most promising candidates to
26
27 225 formulate the consortium associated with bioaugmentation and biostimulation based on
28
29 226 the TTC indicator redox test and rhamnolipids production. Partial sequencing of the 16S
30
31 227 rRNA gene revealed that the two bacteria used in this study exhibited 98% similarity to
32
33 228 *Pseudomonas mendoncina* and 99% similarity to *Bacillus sphaericus* and other two
34
35 229 microbes presented 99% similarity to *Bacillus cereus*. *Pseudomonas spp.* and *Bacillus*
36
37 230 *spp.* are commonly found in hydrocarbon-contaminated soils and have been described
38
39 231 as potential bioremediations. According to Yu et al. (2014), *Bacillus spp.* isolated from
40
41 232 petroleum-contaminated soil have been used for the bioremediation of the Shengli Oil
42
43 233 Field, China, showing a crude oil removal rate of 67.7% after 2 months. Another study
44
45 234 demonstrated that two strains of indigenous *Bacillus* presented a significant potential for
46
47 235 the *in situ* remediation of contaminated soil with low (500 ppm) and high (10,000 ppm)
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 236 diesel concentrations, reaching approximately 87% and 81% degradation in 15 days,
2
3 237 respectively (Kebria et al. 2009).
4
5 238 Cyplik et al. (2011) reported that the combination of *Achromobacter sp.* and
6
7 239 *Pseudomonas sp.* enhanced the bioremediation of diesel/biodiesel-contaminated soils,
8
9 240 as both microbes metabolized the hydrocarbon fractions. Additionally, Pacwa-
10
11 241 Płociniczak et al. (2014) used a strain of *Pseudomonas* species isolated from soil
12
13 242 contaminated with hydrocarbons and showed the degradation of crude oil fractions A5
14
15 243 (components of light fuel oils), P3 (components of high fuel oils), and hexadecane (27,
16
17 244 39, 27 and 13% of hydrocarbons were degraded, respectively), whereas Kumar et al.
18
19 245 (2008), Arun et al. (2008) and Sopeña et al. (2013) demonstrated the ability of
20
21 246 *Pseudomonas spp.* to degrade a broad range of hydrocarbons, including crude oils,
22
23 247 refined fuels, alkanes and PAHs.
24
25
26
27
28
29
30
31

32 248

33 249 **Production of microorganisms and Microbial activity (CO₂ production)**

34
35 250 The microorganisms used in the consortium were separately cultivated in a
36
37 251 sterile 100 L reactor. The reactor inoculum of 10 L and 100 L was monitored for the
38
39 252 parameters of pH, optical density (OD₆₆₀) and Gram staining (Table 1).
40
41

42 253 CO₂ production is a parameter for quantifying the microbial activity in the soil
43
44 254 (Cerqueira et al. 2011), demonstrating that microorganisms are capable of assimilating
45
46 255 hydrocarbons as a carbon source. Fig. 1 shows the values of CO₂ accumulated during 60
47
48 256 days in the negative control (NC), NA, BAE, and BE treatments.
49
50

51
52 257 All treatments showed higher levels of CO₂ compared with the negative control
53
54 258 (NC) (soil contaminant) (p < 0.001); however, the behavior among the treatment of
55
56 259 microbial communities showed differences in CO₂ production, including the NA
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 260 treatment, with no addition of inoculum and nutrients. This observation suggests that
2
3 261 under appropriate abiotic conditions, the resident microbiota exhibited metabolic
4
5 262 activity and stimulated growth, achieving similar levels of CO₂ emissions as the soils
6
7
8 263 under the addition of inoculants and nutrients (BE and BAE).
9

10
11 264 The behavior of microbial communities presented differences in CO₂ production
12
13 265 in all treatments compared with the negative control (NC). Notably, the NA treatment
14
15 266 showed similar levels of CO₂ emissions as the soils subjected to the addition of
16
17
18 267 inoculants and nutrients (BE and BAE), suggesting that adequate abiotic soil conditions
19
20 268 stimulated the growth and metabolism of the resident flora. It is also reasonable to
21
22
23 269 conclude that these treatments showed a similar profile in the oscillation of the values
24
25 270 and experienced an adaptive phase during the initial period of the experiment, between
26
27
28 271 1 and 5 days. The BAE treatment showed CO₂ production levels similar to the NA
29
30 272 treatment, demonstrating that the addition of autochthonous microorganisms in
31
32 273 contaminated soil did not increase the rate of cellular respiration.
33
34

35 274 The BE treatment obtained a higher microbial activity compared with the other
36
37 275 treatments, in contrast with other studies, where the rate of CO₂ production was higher
38
39 276 in BAE treatments (Meyer et al. 2014; Szulec et al. 2014; Colla et al. 2013).
40
41

42 277

43 44 45 278 **Evaluation of large-scale bioremediation treatments**

46 47 279 **Characteristics of the soil used in large-scale trials**

48
49 280 Contaminated soil was analyzed based on physico-chemical characteristics
50
51 281 (Table 2) according to the Laboratory of the Department of Soils of the Agronomy
52
53 282 Faculty of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. The analyses were
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 283 performed separately for each treatment because the soil was sampled at different stages
2
3 284 and showed different characteristics.

4
5 285 The pH was monitored during the experiment on both sides of the boxes, with or
6
7
8 286 without air. The values remained between 6.2 and 7.2 in all treatments. There were
9
10 287 oscillations during this period, however these differences were not statistically
11
12 288 significant.

13
14
15 289 The pH directly affects the activity of microorganisms through the effect of H⁺
16
17
18 290 ions on enzymatic activity and cellular permeability, thereby indirectly influencing the
19
20 291 availability of macro and micronutrients (Caldwell 2000). However, the small variations
21
22 292 observed in the present study did not show a negative effect on microbial growth
23
24
25 293 because the pH values remained neutral as a favorable condition for microbial growth.
26
27
28 294 Horel and Schiewer (2009) previously reported the adequate physical and
29
30 295 environmental conditions for microbial growth and activity.

31
32 296

33 34 35 297 **Degradation of hydrocarbons**

36
37 298 The total degradation of hydrocarbons in contaminated soils under the different
38
39 299 treatments is shown in Table 3. The initial values of the contaminants showed variations
40
41 300 between treatments due the origin of the contaminated soil and difficulties in
42
43 301 homogenization, reflecting the high volume of soil used in the treatments. In the NA
44
45 302 treatment, contamination was 3,621 mg/kg (hydrocarbons/soil), whereas in BE and
46
47 303 BAE treatments, contamination was 1,586 mg/kg (hydrocarbons/soil) and 6,703 mg/kg
48
49 304 (hydrocarbons/soil), respectively.

50
51
52 305 As shown in Table 3, TPHs were markedly reduced between the initial and the
53
54
55 306 final samples for all treatments, with or without the addition of oxygen.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 307 In addition to the total concentration of hydrocarbons, the fractions C₈–C₁₁,
2
3 308 C₁₁–C₁₄, C₁₄–C₂₀ and C₂₀–C₄₀ were also analyzed at 0, 30 and 60 days (Tables 4 and 5).
4
5 309 Regarding the initial time, fraction C₈–C₁₁ was detected at a higher concentration in
6
7 310 soils after BAE treatment (487 mg/kg) with or without aeration. For the other
8
9 311 treatments, the C₈–C₁₁ concentrations were below the limit of quantification, potentially
10
11 312 reflecting the high initial concentration of TPHs present in the soil used for the BAE
12
13 313 treatment compared with the other treatments. The fraction C₁₁–C₁₄ was detected in all
14
15 314 treatments at the initial time (Table 4).
16
17

18 315 The highest concentration of fraction C₁₁–C₁₄ was observed with the BAE
19
20 316 treatment (1,146 mg/kg) (Table 4). The concentration of fraction C₈–C₁₁ was reduced to
21
22 317 levels lower than the quantification limit at 30 days after treatment in all remediation
23
24 318 strategies (Table 4). Similarly, the concentration of fraction C₁₁–C₁₄ was reduced after
25
26 319 30 days in all remediation treatments; however, BE treatment with aeration and NA
27
28 320 treatment without aeration showed more significant reductions.
29
30

31 321 Additionally, after treatments, fraction C₁₁–C₁₄ was also reduced to
32
33 322 concentrations lower than the quantification limit (Table 4), demonstrating that the three
34
35 323 remediation strategies used for 60 days decreased the high concentration of
36
37 324 hydrocarbons in both fractions (C₈–C₁₁ and C₁₁–C₁₄).
38
39

40 325 The heavier fractions (C₁₄–C₂₀ and C₂₀–C₄₀) were also detected in soils with or
41
42 326 without aeration (Table 5). Fraction (C₁₄–C₂₀) showed the highest reduction after 60
43
44 327 days in BAE treatment without aeration (181 mg/Kg) and NA treatment with aeration
45
46 328 (<11.3 mg/Kg). In the BE treatment with aeration, this fraction was initially reduced
47
48 329 after 30 days and increased reduction was observed after 60 days
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 330 Fraction C₂₀ - C₄₀ showed a reduction of contaminants only for the NA treatment
2
3 331 with aeration (<11.3 mg/Kg). In treatments without aeration, the BAE soil treatment
4
5 332 showed an even higher reduction (788 mg/Kg) (Table 5).
6
7

8 333 Independent of the TPH fractions assessed (light or heavy) and bioremediation
9
10 334 treatments applied, changes to the level of soil contamination were observed. The
11
12 335 percentage of degradation for the three TPH remediation strategies is shown in Fig. 2,
13
14 336 where treatment with NA aeration reached a maximum of 98% degradation, while the
15
16 337 total value of oil increased 12%. In the BE treatment, the total amount of contaminants
17
18 338 increased in relation to the initial time, both with (52%) or without aeration (2%), and
19
20 339 the BAE treatment with aeration obtained 32% degradation and without aeration the
21
22 340 degradation rate was 85% (Fig. 2).
23
24
25
26

27 341 In summary, these results demonstrated that BAE treatment without aeration
28
29 342 obtained a higher reduction of contaminants compared with the NA treatment, as the
30
31 343 BAE treatment had higher initial contamination the NA treatment in both light and
32
33 344 heavy fractions.
34
35
36

37 345 The light fractions were degraded after 30 days, while the heavy fractions were
38
39 346 more degraded within 60 days, inferring that the successive addition of the consortium
40
41 347 favored degradation because 85% of the total contaminants were removed.
42
43
44

45 348 However, some variations were observed, likely reflecting the release of organic
46
47 349 compounds derived from intermediates of the degradation process, as shown in a
48
49 350 previous study (Colla et al. 2013). The successive biostimulation with bioaugmentation
50
51 351 has been previously described as the most effective among treatments (Tahhan et al.
52
53 352 2011), and the indigenous population overcame the exogenous inoculum and the
54
55 353 successive addition increased bioremediation activity.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 354 In the NA aeration treatment, a reduction of the contaminants was observed,
2
3 355 suggesting the air-stimulated activity of native microbiota, whereas in the BAE and BE
4
5 356 treatments, potentially impacted soil aeration resulted from the addition of the inoculum
6
7
8 357 and nutrient solution, thus rather than hardening, damp areas were created in the soil,
9
10
11 358 forming clods and hampering the dispersal of inoculum.

12
13 359 In the BAE and BE treatments, aeration likely impacted the ground resulting
14
15 360 from the addition of the inoculum and nutrient solution, followed by soil clod
16
17 361 formation, damaging the dispersal of the inoculum. Although the NA treatment
18
19 362 removed 98% of the contamination, the initial contamination concentration in this
20
21 363 treatment was lower, favoring the removal rate.

22
23
24
25 364 Couto et al. (2010) demonstrated that natural attenuation was as effective as
26
27 365 bioaugmentation and biostimulation in an oil refinery. According to Bento et al. (2005)
28
29 366 and Sabaté et al. (2004), this observation is associated with the age of the soil and
30
31 367 physiologically adapted indigenous microorganisms, which can be effective in the
32
33 368 degradation of this contamination.

34
35
36
37 369 The BE treatment was not effective in bioremediation. Despite having the lowest
38
39 370 rate of contaminants at the end of the experiment, an increase in both treatments with
40
41 371 (52%) and without aeration (2%) was observed.

42
43
44 372 As the nutrient relation is important for the microflora (carbon, nitrogen and
45
46 373 phosphorus), (Atlas and Bartha, 1998), we inferred that the relation of the nutrients was
47
48 374 not appropriate or available for microbial use. This increase in the contaminants was
49
50 375 also observed in the BAE treatment with aeration, reflecting the release of organic
51
52 376 compounds derived from intermediates of the degradation process. Bento et al. (2005)
53
54 377 reported similar results, showing that treatment with concomitant bioaugmentation and
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 378 biostimulation obtained 72.7% and 75.2% degradation, respectively of light and heavy
2
3 379 fractions, respectively, after 12 weeks of treatment. In addition, the natural attenuation
4
5 380 treatment was more effective than biostimulation.
6
7
8 381 Thus, BAE treatment showed potential for large-scale use and could be tested in
9
10 382 hydrocarbon-contaminated environments.
11
12
13 383
14
15 384 **Bacterial community dynamics and structure analysis**
16
17
18 385 To understand how bioremediation influences the microbial community
19
20 386 composition and the diversity of microorganisms, DGGE analyses were performed for
21
22 387 all treatments during different periods (0, 30 and 60 days). Four samples were
23
24 388 additionally analyzed through DGGE, representing the enrichment cultures used in
25
26 389 bioaugmentation (BPB 1.8, BPB 1.20, BPB 1.26 and BPB 1.35) (Fig. 3 A and B).
27
28
29 390 The BAE treatment initially formed a cluster with the four microorganisms
30
31 391 added in the consortium (Fig. 3B). This cluster can be associated with the addition of
32
33 392 the microbial consortium ($10 \times \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$), justifying the stronger presence of the
34
35 393 consortium in relation to indigenous microorganisms from contaminated soil. Thus,
36
37 394 during the process of DNA extraction, and subsequent PCR amplification highlighted
38
39 395 the consortium of microorganisms for the detriment of the native microorganisms.
40
41
42 396 The BE treatment on day 0 showed 90% similarity to 0 BEA treatment for 30
43
44 397 days (30 days), implying that the addition of air favored the aerobic microbial
45
46 398 population of the native soil during 30 days of treatment. The BE and NA treatments
47
48 399 were similar (75%) throughout the experiment (0, 30 and 60 days). Thus, the air
49
50 400 injection did not affect the final composition of the microbial community, as resident
51
52 401 communities with high similarities at different times were observed. However, the BAE
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 402 treatment with successive additions of the consortium for 30 days under conditions
2
3 403 without aeration, the inoculum of microorganisms showed higher growth compared
4
5 404 with the natural soil community. The Shannon-Wiener diversity index, presented in
6
7
8 405 Table 6, shows that there was no significant difference in the biodiversity of the
9
10 406 treatments, suggesting that the native microbiota acted synergistically with the
11
12 407 microorganisms inoculated in the bioaugmentation treatment.

13
14
15 408 These findings suggest that hydrocarbon removal is associated with the presence
16
17 409 of microorganisms adapted to the contaminated soil.

18
19
20 410

21 411 **Conclusion**

22
23 412 The application of a microbial consortium showed potential for bioremediation
24
25 413 compared with the other treatments. The production of microorganisms at a 100 L scale
26
27 414 facilitated the formation of the inoculum used in these experiments. The application of
28
29 415 aeration was not effective for the BAE and BE treatments but was essential for
30
31 416 stimulating native microbiota in NA. The results suggest that the degradation of
32
33 417 hydrocarbons can effectively be achieved through the formulation and application of
34
35 418 microbes, depending on the characteristics of the contaminated area.

36
37
38 419

39 420 **Acknowledgments**

40 421 The authors would like to thank Bioplus Desenvolvimento Biotecnologico Ltda
41
42 422 for the use of facilities and financial support. This work was financially supported
43
44 423 through grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino
45
46 424 Superior (CAPES). SRA received a scholarship from the Fundação de Amparo à

47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 425 Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). The authors would also like to
2
3
4 426 thank Dr. Livia Kmetzsch for reviewing this manuscript.
5
6 427
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 428 **References**
2
3
4 429 Almeida A, J Augusto F, Jardim ICF (2010) Biorremediação de solos contaminados por
5
6 430 petróleo e seus derivados. *Eclética Química* 35(3): 17-43
7
8 431
9
10
11 432 Arun A, Raja PP., Arthi R, Ananthi M, Kumar KS, Eyini M (2008) Polycyclicaromatic
12
13 433 hydrocarbons (PAHs) biodegradation by basidiomycetes fungi, *Pseudomonas* isolate,
14
15 434 and their cocultures: comparative in vivo and in silico approach. *Appl Biochem*
16
17 435 *Biotechnol* 151: 132–142
18
19
20 436
21
22
23 437 Atlas RM, Bartha R (1998) Bioremediation. Microbial ecology: fundamentals and
24
25 438 applications, 4th ed USA: Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, pp 213-235
26
27 439
28
29
30 440 Banks MK, Schultz KE (2005) Comparison of plants for germination toxicity tests in
31
32 441 petroleum contaminated soils. *Water Air Soil Pollut* 167: 211–219
33
34 442
35
36
37 443 Bartha R, Pramer D (1965) Features of flask and method for measurement
38
39 444 of the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Sci* 100: 68-70
40
41 445
42
43
44 446 Bento FM, Camargo FAO, Okeke BC, Frankenberger WT (2005) Comparative
45
46 447 bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation,
47
48 448 biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour Technol* 96: 1049–1055
49
50 449
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 450 Bofetta P, Jourenkova N, Gustavson P (1997) Cancer risk from occupational and
2
3
4 451 environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes and*
5
6 452 *Control* 8(3): 444-472
7
8 453
9
10
11 454 Caldwell DR (2000) *Microbial physiology and metabolism*, 2.ed. Belmont: Star, pp 403
12
13 455
14
15 456 Cerqueira VS, Hollenbach EB, Maboni F, Vainstein MH, Camargo FAO, Peralba
16
17
18 457 MCR, Bento FM (2011) Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed
19
20 458 bacterial cultures. *Biores Technol* 102: 11003-11010
21
22
23 459
24
25 460 Chandra S, Sharma R, Singh K, Sharma A (2013) Application of bioremediation
26
27
28 461 technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Ann*
29
30 462 *Microbiol* 63: 417-431
31
32
33 463
34
35 464 Colla TS, Andrezza R, Bücke F, De Souza M M, Tramontini L, Prado GR, Frazzon
36
37
38 465 APG, Camargo FAO, Bento FM (2013) Bioremediation assessment of diesel-biodiesel-
39
40 466 contaminated soil using an alternative e bioaugmentation strategy. *Environ Sci Pollut*
41
42 467 *Res* 21(4): 2592-602
43
44
45 468
46
47 469 Couto MNPFS, Monteiro E, Vasconcelos MTSD (2010) Mesocosm trials of
48
49
50 470 bioremediation of contaminated soil of a petroleum refinery: comparison of natural
51
52 471 attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Environ Sci Pollut Res* 17: 1339-1346
53
54 472
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 473 Cyplik P, Schmidt M, Szulc A, Marecik R, Lisiecki P, Heipieper HJ, Owsianiak M,
2
3
4 474 Vainshtein M, Chrzanowski L (2011) Relative quantitative PCR to assess bacterial
5
6 475 community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various
7
8 476 aeration conditions. *Biores Technol* 102: 4347–4352
9
10 477
11
12
13 478 Fukuhara Y, Horii S, Matsuno T, Matsumiya Y, Mukai M, Kubo M (2013) Distribution
14
15 479 of hydrocarbon-degrading bacteria in the soil environment and their contribution to
16
17 480 bioremediation. *Appl Biochem Biotechnol* 170: 329–339
18
19 481
20
21
22 482 Horel A, Schiewer S (2009) Investigation of the physical and chemical parameters
23
24 483 affecting biodegradation of diesel and synthetic diesel fuel contaminating Alaskan soils.
25
26 484 *Cold Regions Science and Technology* 58: 113–119
27
28 485
29
30
31 486 Kaczorek E, Olszanowski A (2011) Uptake of hydrocarbon by *Pseudomonas*
32
33 487 *fluorescens* (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) strains in the presence of surfactants: a
34
35 488 cell surface modification. *Water Air Soil Pollut* 214: 451–459
36
37 489
38
39
40 490 Kebria DY, Khodadadi A, Ganjidoust H, Badkoubi A, Amoozegar M (2009) Isolation
41
42 491 and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel.
43
44 492 *Int J Environ Sci Tech* 6: 435–442
45
46 493
47
48
49 494 Kumar M, León V De Sisto A, Ilzins OA, Luis L (2008) Biosurfactant production and
50
51 495 hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. *World J*
52
53 496 *Microbiol Biotechnol* 24: 1047–1057
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 497 Liang YT, Zhang X, Wang J, Li GH (2012) Spatial variations of hydrocarbon
2
3 498 contamination and soil properties in oil exploring fields across China. J Haz Mat 241:
4
5 499 371–378
6
7
8 500
9
10 501 Megharaj M, Ramakrishnan B, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R (2011)
11
12 502 Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. Environ Int 37:
13
14 503 1362–1375
15
16
17 504
18
19 505 Meyer DD, Beker SA, Bücken F, Peralba MCR, Frazzon APG, Osti JF, Andreatza R,
20
21 506 Camargo FAO, Bento FM (2014) Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in
22
23 507 oxisol from southern Brazil. Int Biodeterior Biodegr 95: 356-363
24
25
26 508
27
28 509 Ovreas L, Forney L, Dae FL, Torsvik V (1997) Distribution of bacterioplankton in
29
30 510 meromictic lake saelenvannet, as determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
31
32 511 of PCR-amplified gene fragment coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 63:
33
34 512 3367-3373
35
36
37 513
38
39 514 Pacwa-Płociniczak M, Plaza GA, Poliwoda A, Piotrowska-Seget Z (2014)
40
41 515 Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas*
42
43 516 sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil.
44
45 517 Environ Sci Pollut Res 21: 9385–9395
46
47
48 518
49
50 519 Sabaté J, Viñas M, Solanas AM (2004) Laboratory-scale bioremediation experiments on
51
52 520 hydrocarbon-contaminated soils. Int Biodeterior Biodegrad 54: 19–25
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 521
2
3
4 522 Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning, a laboratory manual, third ed., Cold
5
6 523 Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-576-5
7
8 524
9
10
11 525 Shankar S, Kansrajh C, Dinesh MG, Satyan RS, Kiruthika S, Tharanipriya A (2014)
12
13 526 Application of indigenous microbial consortia in bioremediation of oil contaminated
14
15 527 soils. Int J Environ Sci Technol 11: 367–376
16
17
18 528
19
20 529 Sopena F, Laiz L, Morillo E, Sanchez-Trujillo MA, Villaverde J, Jurado V, Saiz-
21
22 530 Jimenez C (2013) Phenanthrene biodegradation by *Pseudomonas xanthomarina* isolated
23
24 531 from an aged contaminated soil. Clean Soil Air Water 42: 785-790
25
26
27 532
28
29
30 533 Szule A, Ambrozewicz D, Sydow M, Lawniczak L, Piotrowska-Cyplik A, Marecik R,
31
32 534 Chrzanowski L (2014) The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on
33
34 535 bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field
35
36 536 studies. J Envir Manag 132: 121-128
37
38
39 537
40
41
42 538 Teng Y, Feng D, Song L, Wang J, Li J (2013) Total petroleum hydrocarbon distribution
43
44 539 in soils and groundwater in Songyuan oilfield, Northeast China. Environ Monit Assess
45
46 540 185: 9559–9569
47
48
49 541
50
51
52 542 Tahhan RA, Ammari TG, Goussous SJ, Al-Shdaifat HI (2011) Enhancing the
53
54 543 biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified
55
56 544 bioaugmentation strategy. Inter Biodeterior Biodegrad 65: 130–134
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 545
2
3 546 Tyagi M, Da Fonseca MR, De Carvalho CCCR (2011) Bioaugmentation and
4
5
6 547 biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes.
7
8 548 Biodegrad 22: 231-241
9
10 549
11
12 550 Yu Y, Zhang W, Chen G, Gao Y, Wang J (2014) Preparation of petroleum-degrading
13
14
15 551 bacterial agent and its application in remediation of contaminated soil in Shengli Oil
16
17
18 552 Field, China. Environ Sci Pollut Res 21: 7929–7937
19
20 553
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 554 **Figure Legends**
2 555
3
4 556 Fig. 1. Cumulative CO₂ production assessed through respirometry in soil contaminated
5
6 557 with hydrocarbons after incubation for 60 days. NC: negative control; NA: natural
7
8 558 attenuation; BAE: bioaugmentation/biostimulation; BE: biostimulation
9
10 559
11
12 560 Fig. 2. Biodegradation rates of different treatments with and without aeration. NA:
13
14 561 natural attenuation without aeration; NAA: natural attenuation with aeration; BAE:
15
16 562 bioaugmentation/biostimulation without aeration; BAEA:
17
18 563 bioaugmentation/biostimulation with aeration; BE: biostimulation without aeration and
19
20 564 BEA: biostimulation with aeration
21
22 565
23
24 566 Fig. 3A. Banding profile obtained through DGGE based on V3 region amplification of
25
26 567 the bacterial 16S rRNA gene. B. Bacterial dendrogram based on the DGGE banding
27
28 568 profile generated from soil treated through bioaugmentation/biostimulation (BAE),
29
30 569 biostimulation (BE) or natural attenuation (NA) at time 0.
31
32 570 Bioaugmentation/biostimulation with aeration (BAEA30), bioaugmentation/
33
34 571 biostimulation without aeration (BAE30), biostimulation with aeration (BEA30),
35
36 572 biostimulation without aeration (BE30), natural attenuation with aeration (NAA30),
37
38 573 natural attenuation without aeration (NA30) after 30 days and
39
40 574 bioaugmentation/biostimulation with aeration (BAEA60),
41
42 575 bioaugmentation/biostimulation without (BAE60), biostimulation with aeration
43
44 576 (BEA60), biostimulation without aeration (BE60), natural attenuation with aeration
45
46 577 (NAA60), natural attenuation without aeration (NA60) after 60 days. The enrichment
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 578 cultures are represented as BPB 1.8, BPB 1.20, BPB 1.26 and BPB 1.35. The x-axis
2
3
4 579 shows community similarities based on Dice coefficient.
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1
Click here to download Figure: Figure_1.tif

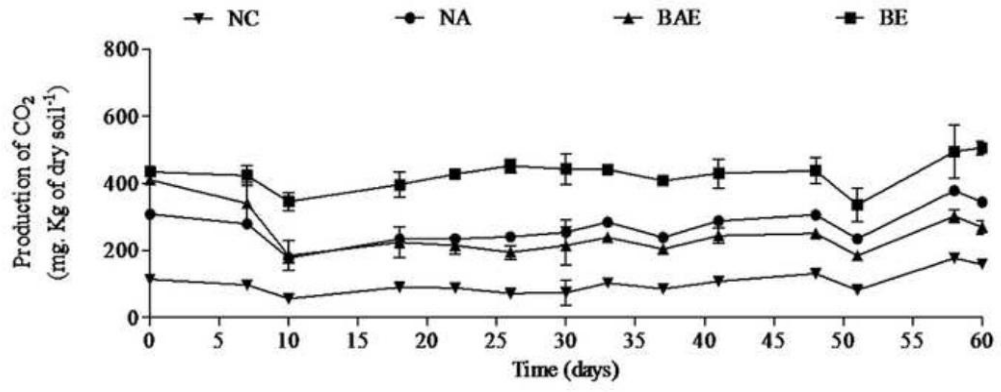


Figure 2
[Click here to download Figure: Figure_2.tif](#)

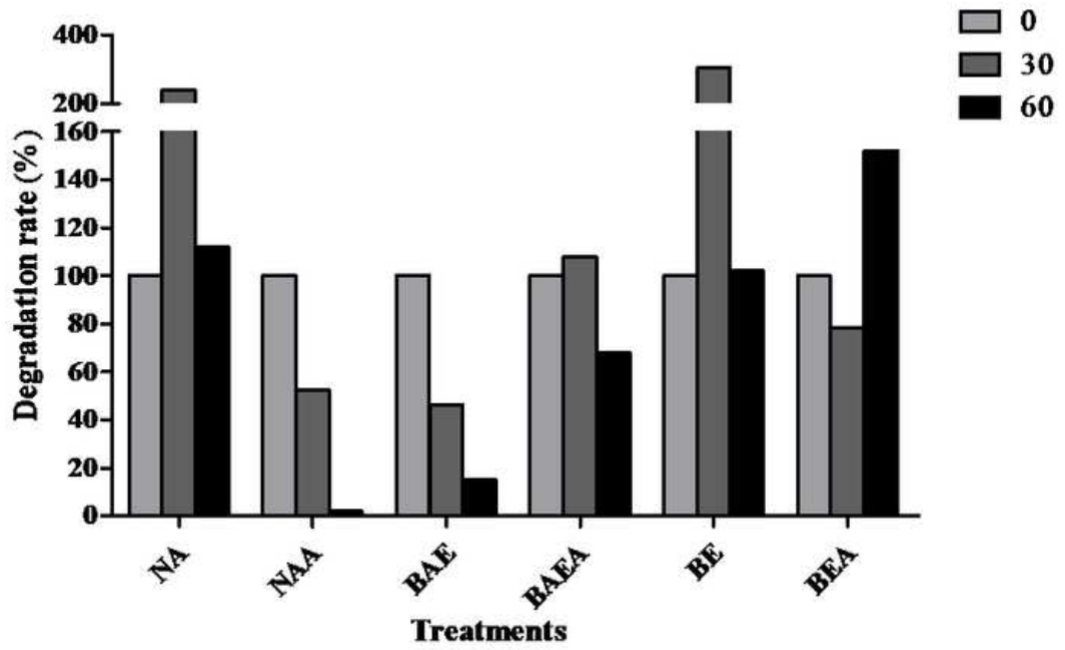


Figure 3
Click here to download Figure: Figure_3.tif

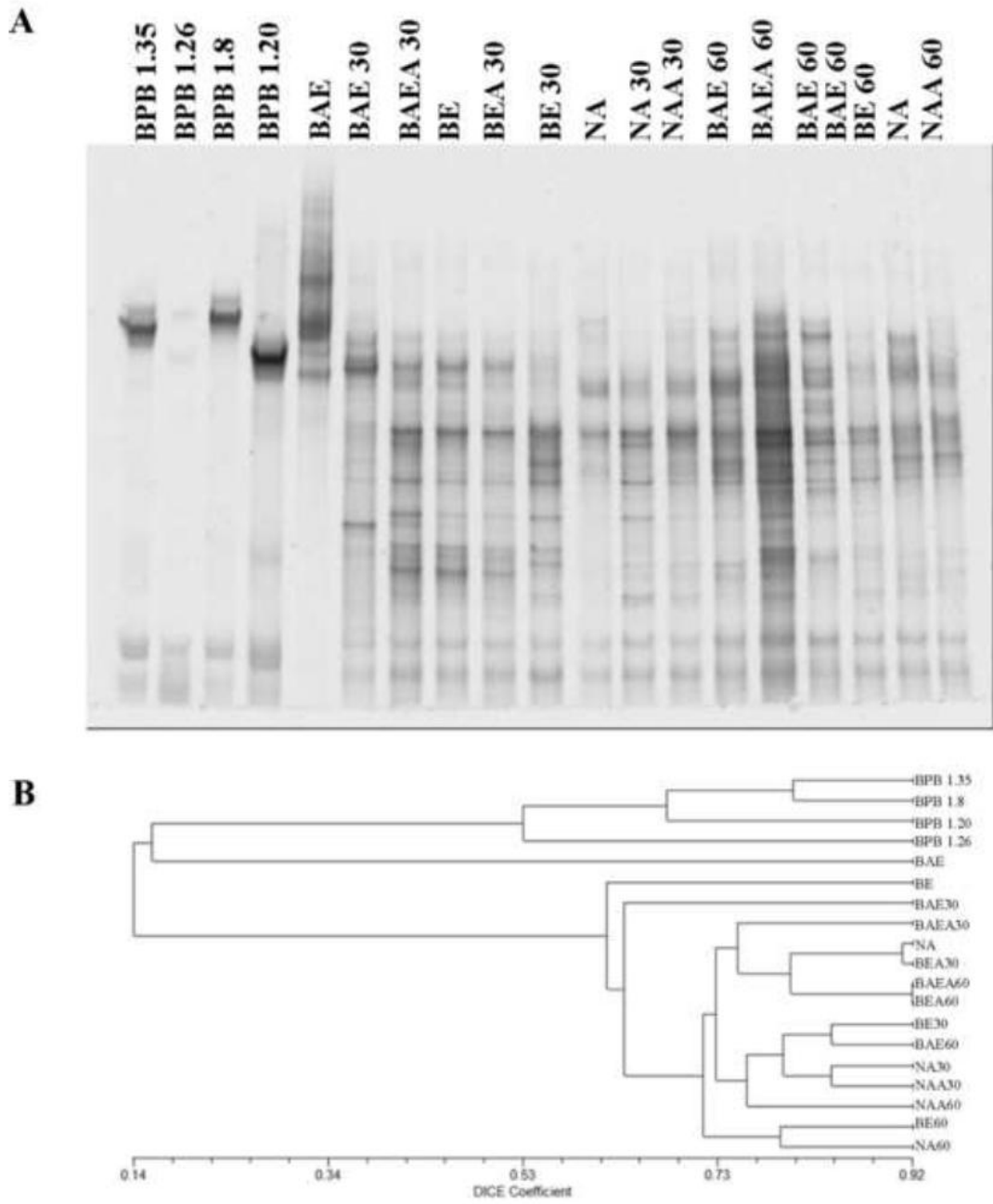


Table 1

Table 1. Production of microorganisms (phases 3 and 4) used in the consortium for large-scale treatment of hydrocarbon-contaminated soils.

Microorganisms Incubation period (h)	Phase 3* (10 L reactor)			Phase 4* (100 L reactor)		
	Gram staining	Growth (OD ₆₆₀)	pH	Gram staining	Growth (OD ₆₆₀)	pH
<i>Pseudomonas mendoncina</i> BPB 1.8						
3	nd	nd	nd	+	1.203	7.4
6	nd	nd	nd	+	1.420	7.2
9	nd	nd	nd	+	1.521	7.6
15	+	0.608	7.0	nd	nd	nd
23	nd	nd	nd	+	1.636	8.0
<i>Bacillus cereus</i> BPB 1.20						
3	nd	nd	nd	+	1.117	7.5
6	nd	nd	nd	+	1.402	6.9
9	nd	nd	nd	+	1.518	7.0
15	+	0.707	7.0	nd	nd	nd
23	nd	nd	nd	+	1.840	8.0
<i>Bacillus sphaericus</i> BPB 1.35						
3	nd	nd	nd	+	0.951	7.0
6	nd	nd	nd	+	1.109	7.4
9	nd	nd	nd	+	1.381	7.7
15	+	0.500	7.3	nd	nd	nd
23	nd	nd	nd	+	1.697	7.7
<i>Bacillus cereus</i> - BPB 1.26						
3	nd	nd	nd	+	1.209	7.5
6	nd	nd	nd	+	1.510	7.5
9	nd	nd	nd	+	1.670	7.8
15	+	0.700	7.0	nd	nd	nd
23	nd	nd	nd	+	1.985	8.0

*The production of microorganisms was conducted in four phases: (1) the pre-inoculum of each microorganism was generated in 10 mL of sterile nutrient broth for 24 h at 37 °C with shaking (200 rpm); (2) after incubation, the 10 mL pre-inoculum was transferred to 300 mL sterile nutrient broth and incubated for an additional 12 h at 37 °C with shaking (200 rpm); (3) the 300 mL inoculum was subsequently transferred to a 10 L reactor containing sterile nutrient broth, and incubated for 15 h at 37 °C with shaking (200 rpm); and (4) the contents of the 10 L reactor was transferred to a 100 L reactor containing sterile nutrient broth (0.5 g/L MgSO₄, 0.05 g/L MnSO₄ and 0.1 g/L CaCl₂) and incubated at 37 °C under agitation at 400 rpm.
Nd: not determined

Table 2

Table 2. Physico-chemical characteristics of diesel oil-contaminated soils.

Parameters	Treatments		
	NA ^a	BE ^b	BAE ^c
Organic matter (%)	2.8	4.1	5
Clay (%)	12	7	7
pH	6.5	6.7	6.4
P (mg/ dm ³)	30	40	47
K (mg/ dm ³)	158	80	78
Al (mmol _c /dm ³)	0	0	0
Ca (mmol _c /dm ³)	10.1	12.9	8.9
Mg (mmol _c /dm ³)	2.8	2.2	1.3
Al+H (cmol _c /dm ³)	1.5	1.0	1.0
Ca/Mg	3.5	6.0	7.0
Ca/K	25	63	45
Mg/K	7	11	7
S (mg/ dm ³)	134	88	108
Zn (mg/dm ³)	60	141	187
Cu (mg/dm ³)	32	86	106
B (mg/dm ³)	0.5	4.3	2.5
Mn/Mg (mg/dm ³)	40	47	29

^aNA: natural attenuation; ^bBE: biostimulation; ^cBAE: bioaugmentation/biostimulation.

Table 3

Table 3. Analysis of the degradation of the total petroleum hydrocarbons (TPHs) present in soils contaminated with diesel oil

Time (days)	Total petroleum hydrocarbons - TPHs (mg/kg soil)					
	With aeration			Without aeration		
	NA ^a	BE ^b	BAE ^c	NA ^a	BE ^b	BAE ^c
0	3,621	1,586	6,703	3,621	1,586	6,703
30	1,904	1,247	7,216	8,675	4,828	3,111
60	<11.3	2,416	4,570	4,057	1,625	969

^aNA: natural attenuation; ^bBE: biostimulation; ^cBAE: bioaugmentation/biostimulation.

Table 4

Table 4. Analysis of the degradation of petroleum hydrocarbons light fractions present in soils contaminated with diesel oil

Time (days)	Petroleum hydrocarbons light fractions (mg/kg soil)					
	With aeration			Without aeration		
	NA ^a	BE ^b	BAE ^c	NA ^a	BE ^b	BAE ^c
<i>Fraction (C₈-C₁₁)</i>						
0	<56.8	<20.8	487	<56.8	<20.8	487
30	<51.9	<58	<128	<106	<59.4	<61
60	<11.3	<57.2	<117	<55.8	<56.5	<25.5
<i>Fraction (C₁₁-C₁₄)</i>						
0	134	76	1146	134	76	1146
30	55.5	<58	494	<106	86	66
60	<11.3	<57.2	<117	<55.8	<57.5	<25.5

^aNA: natural attenuation; ^bBE: biostimulation; ^cBAE: bioaugmentation/biostimulation.
 Values <: less than the limit of quantification.

Table 5

Table 5. Analysis of the degradation of petroleum hydrocarbons heavy fractions present in soils contaminated with diesel oil

Time (days)	Petroleum hydrocarbons heavy fractions (mg/kg soil)					
	With aeration			Without aeration		
	NA ^a	BE ^b	BAE ^c	NA ^a	BE ^b	BAE ^c
<i>Fraction (C₁₄-C₂₀)</i>						
0	480	357	1,605	480	357	1,605
30	455	121	1,318	876	620	491
60	<11.3	238	1,120	427	146	181
<i>Fraction (C₂₀-C₄₀)</i>						
0	3,007	1,153	3,465	3,007	1,153	3,465
30	1,393	1,126	5504	7,799	4,122	2,554
60	<11.3	2,178	3450	3,630	1,479	788

^aNA: natural attenuation; ^bBE: biostimulation; ^cBAE: bioaugmentation/biostimulation.
Values <: less than the limit of quantification.

Table 6

Table 6. Determination of the Shannon-Wiener diversity index for bioremediation treatments after incubation for 60 days.

Treatment	Shannon-Wiener diversity index
BPB 1.8	0.6021
BPB 1.20	0.6021
BPB 1.26	0.9031
BPB 1.35	0.7782
BAE	0.8451
BE	1.2553
NA	1.2304
BAEA30	1.1761
BAE30	1.1461
BEA30	1.1761
BE30	1.2441
NAA30	1.2304
NA30	1.3001
BAEA60	1.0792
BAE60	1.2041
BEA60	1.1761
BE60	1.1761
NAA60	1.2553
NA60	1.1761

The enrichment cultures are represented as BPB 1.8, BPB 1.20, BPB 1.26 and BPB 1.35. Soil treated through bioaugmentation/biostimulation (BAE), biostimulation (BE) or natural attenuation (NA) at time 0. Bioaugmentation/biostimulation with aeration (BAEA30), bioaugmentation/ biostimulation without aeration (BAE30), biostimulation with aeration (BEA30), biostimulation without aeration (BE30), natural attenuation with aeration (NAA30), natural attenuation without aeration (NA30) after 30 days and bioaugmentation/biostimulation with aeration (BAEA60), bioaugmentation/biostimulation without (BAE60), biostimulation with aeration (BEA60), biostimulation without aeration (BE60), natural attenuation with aeration (NAA60), natural attenuation without aeration (NA60) after 60 days.

5-DISSCUSSÃO GERAL

A utilização dos recursos naturais acompanha os avanços na ciência e tecnologia desde a revolução industrial e têm permitido ao homem explorar de forma mais intensa os recursos, gerando distúrbios importantes nos ciclos de energia globais (ELDREDGE, 1999; PULITANO, 2003). A medida que a exploração aumenta, os impactos gerados se tornam mais evidentes, incapacitando a autodepuração dos ecossistemas, resultando assim na acumulação de poluentes para níveis problemáticos ou mesmo perigosos.

Aliados a isso, o descuido com a produção, transporte, armazenamento e vazamentos de produtos derivados de petróleo acabam por contaminar solos e águas, sendo a água essencial para a sobrevivência de toda a população do planeta (Farhadian *et al.*, 2008).

A fim de minimizar e/ou eliminar essas contaminações, surge a necessidade do desenvolvimento de tecnologias de remediação que sejam viáveis, rápidas e implementáveis em uma grande variedade de configurações físicas, já que é reconhecido o perigo potencial que misturas químicas complexas como hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH), podem representar perante a saúde humana e ambiental (Khan *et al.*, 2004).

Neste contexto, o principal objetivo deste estudo, foi o desenvolvimento de uma formulação comercial, composta por micro-organismos e que pudesse vir a ser aplicada diretamente no ambiente contaminado, utilizando ou não o auxílio de outras técnicas de remediação. Para apresentar os resultados, esse trabalho foi dividido em dois capítulos. O Capítulo I, inicia pelo isolamento de 34 micro-organismos bioprospectados em solo com histórico de contaminação por hidrocarbonetos. A escolha pelo solo já contaminado se deu ao fato de que a exposição dos micro-organismos à contaminação crônica pode aumentar a possibilidade de seleção de organismos com capacidade para metabolização de poluentes dessa espécie, já que a exposição prolongada da comunidade microbiana ao contaminante

pode realizar uma pressão seletiva sobre a mesma, permitindo a sua sobrevivência no meio impactado.

Os isolados bioprospectados foram submetidos a técnica que utiliza um indicador redox (TTC) no meio mínimo mineral com o contaminante, para avaliar a capacidade de metabolização dos poluentes pelos micro-organismos. A interpretação do teste é baseada na mudança de coloração do meio de cultura, de incolor para cor-de-rosa, devido à redução do TTC para TPF. Apesar de ser um teste preliminar é usado em diversos trabalhos (Hanson *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 2002; Cerqueira *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2014; Colla *et al.*, 2014), demonstrando ser uma técnica simples, que fornece resultados rápidos e confiáveis.

Os resultados identificaram 12 isolados positivos ao indicador, os quais foram identificados pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, avaliadas quanto a produção de biossurfactantes e seu crescimento exponencial. Utilizando o mesmo solo da bioprospecção, foi realizado o experimento de biorremediação, contemplando as técnicas de atenuação natural, bioaugmentação e bioestimulação, acompanhados pela técnica de liberação de CO₂ e determinação de micro-organismos degradadores e heterotróficos através da técnica do NMP.

Para a técnica de bioaugmentação foi utilizado um consórcio com cinco micro-organismos, BPB 1.6, BPB 1.15, BPB 1.22, BPB 1.13 e BPB 1.26 (nomenclatura referente a coleção de micro-organismos da empresa Bioplus), sendo (*Pseudomonas mendocina*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*).

Os resultados mostraram que após 60 dias de experimento, as concentrações de TPH realizadas por cromatografia a gás tiveram uma redução significativa para os

tratamentos de atenuação natural, bioaugmentação e bioestimulação, sendo 84, 90 e 91 % respectivamente.

Entretanto, quando analisamos os resultados de 40 dias de tratamento, observamos que as taxas de degradação ainda estão lentas nos tratamentos de atenuação natural e bioaugmentação, enquanto que na bioestimulação já atinge cerca de 70%. Esse aumento rápido no tratamento infere que a otimização dos nutrientes não limita a atividade microbiana (Kauppi *et al.*, 2011), e que a sua adição em poucos dias já estimula as populações indígenas a degradação dos hidrocarbonetos (Chang *et al.*, 2010).

Já no tratamento de bioaugmentação, optou-se pela inoculação sucessiva, realizada semanalmente durante 60 dias, visto que trabalhos recentes envolvendo essa metodologia têm obtido resultados satisfatórios no tratamento de solos impactados, chegando a uma eficiência maior que 30% em relação à bioaugmentação convencional (Lebkowska *et al.*, 2011; Tahhan *et al.*, 2011; Colla *et al.*, 2014).

No entanto, a adição sucessiva de micro-organismos pode ter gerado inicialmente uma competição por fonte de carbono com a microbiota já presente na amostra, e por isso a degradação mais tardia. Conforme Alisi *et al.* (2009), os micro-organismos passam por uma fase adaptativa a fim de mudar a sua dinâmica de degradação e assimilação, fazendo com que a degradação ocorra após algum período, ou mesmo, a transformação dos contaminantes em novas fontes de carbono, pode tornar as mesmas indisponível para a microbiota.

Podemos dizer que não houve diferença significativa entre os tratamentos, e que o tratamento de atenuação natural embora não recebesse estímulo obteve um alto nível de degradação, conforme resultados apresentados por outros autores (Sabaté *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2005a; Couto *et al.*, 2010). No entanto as taxas de degradação apresentadas

pelos os tratamentos foram elevadas e embora o consórcio microbiano não tenha apresentado vantagem sobre a microbiota nativa do solo, ele se mostrou eficiente no final do experimento promovendo a degradação de hidrocarbonetos praticamente na mesma proporção que os demais tratamentos.

Após estes resultados, o trabalho objetivou avaliar os tratamentos em maior escala, portanto, os resultados apresentados no Capítulo II, mostram os experimentos realizados com 300 Kg de solo contaminado com hidrocarbonetos, conforme Figura 5, e a composição de um novo consórcio microbiano produzido em escala de 100 Litros.

Além disso, para compreender melhor como a biorremediação influencia na biodiversidade das populações nativas do solo, as alterações ocorrentes ao longo do período de incubação foram acompanhadas por análise de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).

Neste experimento cada caixa correspondia a um tratamento (AN: atenuação natural, BAE: bioaumentação/bioestimulação e BE: bioestimulação), sendo que as mesmas eram divididas por uma barreira física para que apenas um dos lados recebesse a injeção de ar.

A umidade foi mantida em todos os tratamentos e as aplicações foram realizadas semanalmente com a adição dos respectivos estímulos: solução nutriente para o tratamento de BE e solução nutriente + consórcio no tratamento BAE, onde o consórcio foi composto pelos isolados: BPB 1.8, BPB 1.20, BPB 1.3, BPB 1.26 (*P. mendoncina*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. cereus*), sendo que um dos isolados de *B.cereus* já tinha sido utilizado no experimento anterior. As amostras foram analisadas no tempo 0, 30 e 60 dias para diferentes frações de TPHs: C₈-C₁₁, C₁₁-C₁₄, C₁₄-C₂₀ e C₂₀-C₄₀, por cromatografia gasosa.

Paralelamente foi montando um experimento de bancada em microcosmo utilizando o mesmo solo para acompanhar a liberação do CO₂.

Para a otimização da produção dos micro-organismos em grande escala -100 Litros, foram seguidos os mesmos procedimentos já usados na empresa Bioplus para a produção dos micro-organismos referente aos seus produtos. Isso facilitou a formação do inóculo ($2,24 \times 10^8$ UFC/mL) de cada micro-organismo, o qual foi utilizado em volume de 500 mL para cada aplicação realizada semanalmente durante os 60 dias de experimento.

As análises de cromatografia mostraram que a injeção de ar foi importante somente para o tratamento de AN, atingindo 98% de degradação, enquanto que sem aeração, a concentração total dos hidrocarbonetos aumentou 12%. Nos demais tratamentos a injeção de ar não foi tão efetiva. No tratamento de BE, as concentrações totais dos contaminantes aumentaram em relação ao tempo inicial, tanto com a aeração (52%) quanto sem aeração (2%). Já o tratamento de BAE com aeração obteve 32% de degradação e sem aeração a degradação foi de 85%. Esse fato pode estar relacionado a umidade, que embora tenha sido controlada

em todos os tratamentos, pode ter ficado muito baixa ou muito alta para os solos tratados com BE e BAE, fato que pode ter sido gerado pela adição sucessiva dos nutrientes e do consórcio, fazendo com que o solo fosse impactado nestes dois tratamentos.

Nos tratamentos de AN a contaminação inicial foi 3.007 mg/kg, sendo que após 30 dias de monitoramento sem a injeção de ar, a contaminação atingiu uma concentração de 7.799 mg/kg, caindo para 3.630 mg/kg após 60 dias de tratamento, se mantendo acima da concentração inicial. Enquanto que com a injeção de ar após 60 dias de tratamento não foram detectadas contaminações dentro do limite de quantificação da técnica.

Os tratamentos de BE tinham a menor concentração de contaminação, 1.153 mg/kg, e em ambas as condições (com ar e sem ar) as contaminações aumentaram ao final do experimento. Quanto ao tratamento de BAE que continha a maior concentração inicial de contaminação, 3.465 mg/kg, na condição com ar após 30 dias de experimento, a contaminação aumentou para 5.504 mg/kg, vindo a diminuir após 60 dias. Já na condição sem ar a maior redução aconteceu com 60 dias de experimento ficando em 788 mg/kg.

Essas diferenças iniciais de contaminação se deram porque as coletas foram realizadas em diferentes postos de combustíveis, em razão do grande volume de amostra utilizado nos experimentos.

Em relação as frações leves (C_8-C_{11} , $C_{11}-C_{14}$ e $C_{14}-C_{20}$), elas estavam presentes em maior proporção no solo tratado com BAE e foram degradadas praticamente nos primeiros 30 de experimento, sem a injeção de ar. Já as frações pesadas ($C_{20}-C_{40}$) representavam a maior contaminação em todos os solos.

Conforme observado por Bento *et al.*, (2005a), as frações mais leves TPH são primeiramente degradadas pelos micro-organismos, uma vez que essas frações são compostas por fontes de hidrocarbonetos lineares e de cadeia aberta. Com a diminuição desta fonte de carbono, os micro-organismos passam a degradar os hidrocarbonetos mais recalcitrantes (hidrocarbonetos aromáticos, provavelmente com maior peso molecular) de forma menos eficiente. Também é possível que a degradação de hidrocarbonetos de maior peso molecular tenha produzido intermediários tóxicos, o que justifica o aumento de contaminantes em alguns momentos do experimento, conforme também observado em um estudo de Colla *et al.* (2014).

Esses intermediários tóxicos fazem parte da Mistura Complexa não Resolvida (MCNR), a qual inclui alcanos cíclicos, ramificados e produtos de transformações polares.

A presença dessas misturas em amostra serve como indicadores da presença de hidrocarbonetos degradados (Volkman *et al.*, 1992). Alguns estudos mostram que devido as suas estruturas, os compostos não resolvidos são resistentes à degradação, gerando o acúmulo destes compostos no ambiente (Gough & Rowland, 1990).

Analisando os resultados apresentados, podemos inferir que o tratamento BAE sem ar se mostrou mais eficiente em relação aos demais, primeiramente porque apresentou uma concentração de contaminantes maior que os demais tratamentos, vindo a atingir 85 % de degradação ao final do experimento e segundo porque esse tratamento não necessitou a injeção de ar para promover a degradação.

Para alguns autores, o uso da injeção de ar para auxiliar na degradação é um processo caro e ineficiente (Coates *et al.*, 1998). Segundo os mesmos autores, outros aceptores de elétrons como nitratos e sulfatos são solúveis em água e apresentam um melhor desempenho. Segundo Cyplik *et al.* (2011), mudanças na aeração não afeta a comunidade bacteriana, uma vez que a maioria dos degradadores no consórcio pode mudar o seu metabolismo a partir da disponibilidade dos hidrocarbonetos. Já Muckian *et al.* (2009), fizeram o uso de ar em microcosmos apenas na bioestimulação, para testar a degradação de fenantreno e fluoranteno e obtiveram uma degradação de 80% após 28 dias de tratamento, assim como Kauppi *et al.* (2011) que aceleraram a purificação do solo fornecendo em conjunto nutrientes (N, P) e arejamento.

Apesar de haver muitos estudos sobre biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos, percebemos que os estudos em grande escala ainda são limitados. Os poucos estudos apresentados nessas proporções, normalmente se dão em biopilhas ou biorreatores. Quando em biorreatores, condições como pH, temperatura e nutrientes são controlados, podendo atingir uma remoção de hidrocarbonetos entre 75 e 100 % (Moscoso

et al., 2012). Já os estudos em biopilhas se assemelham ao trabalho apresentado, uma vez que trabalham com as condições naturais locais. Łebkowska *et al.*(2011), pesquisaram o impacto da bioaumentação sucessiva em uma biopilha contaminada com óleo diesel e combustível de aviação. Obtiveram uma degradação de 50% a mais em relação ao controle (atenuação natural) e 30% no solo com apenas uma inoculação, resultando uma remoção de 80% do solo contaminado com óleo diesel e 98% do solo contaminado com combustível de aviação.

Quando analisamos os efeitos dos tratamentos de biorremediação sobre a estrutura e dinâmica da comunidade bacteriana dos solos, observamos que o tratamento BAE formou um cluster com os quatro micro-organismos adicionados no consórcio e o manteve por 30 dias, sob condições sem aeração. Isso representou um maior crescimento em comparação com a comunidade natural do solo. Já o tratamento de BE e BEA com aeração no tempo 0 mostraram 90% de similaridade durante os primeiros 30 dias, enquanto que os tratamentos BE e AN sem aeração apresentaram similaridade de 75% ao longo do experimento (0, 30 e 60 dias).

Entretanto, o índice de diversidade de Shannon-Wiener, mostra que não houve diferença significativa na biodiversidade dos tratamentos, o que sugere que a microbiota nativa atuou de forma sinérgica com os micro-organismos inoculados no tratamento bioaumentado.

Comparando os resultados apresentados nos dois capítulos, concluímos que ambos os consórcios utilizados se mostraram eficientes, no entanto, quando se tenciona a estimulação da degradação de hidrocarbonetos por micro-organismos, devemos levar em conta que as variações ambientais são bem menores em escala laboratorial, onde fatores como nutrientes; umidade; temperatura; aeração; pH; estrutura química dos contaminantes,

entre outros, podem ser melhor controlados. Esses fatores são fundamentais na efetividade do processo de biodegradação dos hidrocarbonetos, quer seja isoladamente, quer seja suas interfaces.

Assim, a opção para a composição da formulação comercial a ser utilizada pela empresa Bioplus para a produção do biorremediador para hidrocarbonetos será o segundo consórcio, composto por BPB 1.8, BPB 1.20, BPB 1.3, BPB 1.26 (*P. mendoncina*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. cereus*). Com base nas literaturas consultadas, estes gêneros de bactérias estão entre os mais importantes para a degradação de hidrocarbonetos no solo, (Okpokwasili *et al.* 2006; Watanabe e Hamamura, 2003; Ollivier e Magot, 2005; Bento *et al.*, 2005b; Xu *et al.*, 2013) e segundo a Lista de Remediadores Registrados no IBAMA (2015), alguns desses micro-organismos já são utilizados para a produção de biorremediadores, como é o caso do *B. cereus*, utilizado para a composição dos remediadores BAC TRAT; BIOMIX; BIOMIX L.

Com a produção em escala da formulação remediadora para hidrocarbonetos estaremos colocando no mercado um produto eficiente e 100% brasileiro, já que todos os micro-organismos são isolados de solos brasileiros, disponibilizando uma tecnologia segura, ambientalmente saudável e rentável.

6- CONCLUSÕES

- Foi possível isolar, selecionar e identificar micro-organismos potencialmente degradadores de hidrocarbonetos;
- Testar sua eficiência na produção de biossurfactantes;
- A formação dos consórcios bacterianos refletiram resultados satisfatórios nos experimentos de bioaugmentação;
- O experimento em grande escala se mostrou efetivo para todos os tratamentos, sendo melhor representado pelo tratamento BAE;
- A injeção de ar se mostrou eficiente apenas para o tratamento de AN;
- A produção de micro-organismos em reator de 100 Litros facilitou a formulação do inóculo de 500 mL;
- É possível uma formulação comercial para a degradação de hidrocarbonetos e sua aplicação pode ser efetiva, dependendo das características da área contaminada.

7- PERSPECTIVAS

- Identificar as frações de hidrocarbonetos assimiladas durante o processo de biorremediação do solo contaminado pelos isolados, através do método de CG-FID, para poder avaliar qual a melhor concentração de cada isolado na formulação do remediador;
- Testar a formulação diretamente em um ambiente contaminado;
- Fazer um metagenoma neste ambiente para identificar se o inóculo está presente;
- Otimizar a produção da formulação junto a empresa Bioplus Desenvolvimento Biotecnológico Ltda;
- Proceder aos registros da formulação junto aos órgãos competentes.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 16161:2013: Armazenamento de líquidos inflamáveis e combustíveis. Tanque metálico subterrâneo, Especificação de fabricação e modulação, p. 1-42, 2013.

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

ALMEIDA, F. M. DE; SOUZA, D. M. DE; LUIZ, J. G. Contaminação por hidrocarbonetos em postos de serviço de Abaetetuba - PA: Um estudo com Georadar. 4°. PDPETRO, Campinas, São Paulo, 2007.

ANP. Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis. Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2013. Rio de Janeiro, p.236, 2013.

API. American Petroleum Institute. Risk-Based Decision-Making for Assessing Petroleum Impacts at Exploration and Production Sites. Washington.: Department of Energy and the Petroleum Environmental Research Forum. p.245, 2001. ISBN 0-9717288-0-1.

ARAMBARRI, I.; LASA, M.; GARCIA, R.; MILLAN, E. Determination of fuel dialkyl ethers and BTEX in water using *headspace* solid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*. Amsterdam, v.1033, n.2, p. 193-203, 2004.

ASHA, A.J., SANJEEV, K. S.; ACKMEZ, M. A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Rev Environ Sci Biotechnol*, n. 9, p. 215-288, 2010.

ATTEIA, O. & GUILLOT, C. Factors controlling BTEX and chlorinated solvents plume length under natural attenuation conditions. *Journal of Contaminant Hydrology*, França, v. 90, p. 81-104, 2007.

BALACHANDRAN, C.; DURAIKANDIYAN, V.; BALAKRISHNA, K.; IGNACIMUTHU, S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces sp.* (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresour Technol*, v. 112, p. 83-90, 2012.

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

BANKS, M.K., SCHULTZ, K.E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum contaminated soils. *Water Air Soil Pollut*, 167, p. 211-219, 2005.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour Technol*, v. 96, n. 9, p. 1049-55, 2005a.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER JR, W.T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiol. Res.*, v.160, p.249-255, 2005b.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 63-67, 2000.

BRASIL. Fundação Estadual de Proteção Ambiental - FEPAM- Portaria nº 016/2010 de 20 de abril de 2010.

BRASIL. Decreto Municipal nº 11.423 de 12 de janeiro de 1996.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 273 de 29 de novembro de 2000.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 420 de 12 de fevereiro de 2004.

BREGNARD, T. P. A.; HÖHENER, P.; HÄNER, A.; ZEYER, J. Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. *Environmental Toxicology Chemical*, v.15, n. 3, p. 299-307, 1996.

CALVO, C.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; FANDIÑO, C.G.; LAGUNA, J.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropic* in different hydrocarbon bioremediation assays. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 1493-1501, 2008.

CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; VAINSTEIN, M. H.; CAMARGO, F. A.; DO CARMO, R. P. M.; BENTO, F. M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresour Technol*, v. 102, n. 23, p. 11003-10, 2011.

CETESB.2015a. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>, acessado em 7 de fevereiro de 2015.

CETESB. 2015b. Companhia de tecnologia e saneamento ambiental. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/manual.asp> acessado em 12 janeiro de 2015.

CHAGAS-SPINELLI, A.C.O.; KATO, M.T.; LIMA, E. S.; GAVAZZA, S. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *Journal of Environmental Management*, p. 1-7, 2012.

CHANG, W.; DYEN, M.; SPAGNUOLO, L.; SIMON, P.; WHYTE, L.; GHOSHAL, S. Biodegradation of semi-and non-volatile petroleum hydrocarbons in aged, contaminated soils from a sub-Arctic site: Laboratory pilot-scale experiments at site temperatures. *Chemosphere*, v. 80, p. 319-326, 2010.

CHIKERE, C.B.; OKPOKWASILI, G.C.; CHIKERE, B.O. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech*, v.1, p.117-138, 2011.

CHRZANOWSKI, Ł.; ŁAWNICZAK, Ł.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 401- 419, 2012.

COATES, J.D.; BRUCE, R.A.; HADDOCK, J.D. *Nature*, v. 396, p. 730 , 1998

COLLA, T.; ANDREAZZA, R.; BÜCKER, F.; DE SOUZA, M.; TRAMONTINI, L.; PRADO, G.; FRAZZON, A.; CAMARGO, F.; BENTO, F. Bioremediation assessment of diesel–biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 4, p. 2592-2602, 2013.

COLOMBO, J. C.; PELLETIER, E.; BROCHU, C.; KHALLL, M. Determination of Hydrocarbon Sources Using *n* -Alkane and Potyaromatic Hydrocarbon Distribution Indexes. Case Study: Rio de La Plata Estuary, Argentina. *Environ. Sci. Technol.*, n.23, p. 888-894, 1989.

COUTINHO, R. C. P. e GOMES, C. C. Técnicas para biorremediação de aquíferos contaminados por vazamentos de derivados de petróleo em postos de combustíveis. *XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos*, 2006.

COUTO, M. N. P. F. S.; MONTEIRO, E.; VASCONCELOS, M. T. S. D. Mesocosm trials of bioremediation of contaminated soil of a petroleum refinery: comparison of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 17, p. 1339-1346, 2010.

DA CRUZ, G. F.; DE VASCONCELLOS, S. P.; ANGOLINI, C. F.; DELLAGNEZZE, B. M.; GARCIA, I. N.; DE OLIVEIRA, V. M.; DOS SANTOS NETO, E. V.; MARSAIOLI, A. J. Could petroleum biodegradation be a joint achievement of aerobic and anaerobic microorganisms in deep sea reservoirs? *AMB Express*, v. 1, n. 1, p. 47, 2011.

DAS, N. e CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int*, v. 2011, p. 941810, 2011.

DADRASNIA, A. e AGAMUTHU, P. Diesel toxicity and soil remediation- technical report. *Malaysian Journal of Science*, v. 33, n. 2, p. 92-97, 2014.

DAVID, T.; GIBSON, D.T.; PARALES, E.P. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v.11, p. 236- 243, 2000.

EL FANTROUSSI, S. e AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, n. 3, p. 268-275, 2005.

ELDREDGE, N. Malthus estava certo? Folha de São Paulo, São Paulo, 4 abr. 1999. Caderno especial, p.10-11.

FEPAM. Fundação Estadual de Proteção Ambiental. Disponível em: http://www.fepam.rs.gov.br/emergencia/rel_acidentes.asp, acessado em 03 de março de 2015.

FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; VALENZUELA-ENCINAS, C.; MARSCH, R.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, C.; VÁZQUEZ-NÚÑEZ, E.; DENDOOVEN, L. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil – possibilities and challenges: a review. *Environmental Science Pollution Resolution*, n.18, p.12- 30, 2011.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M.; ALI, S.; COWAN, D. Immobilization of functionally unstable catechol-2,3-dioxygenase greatly improves operational stability. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, p. 568-573 , 2000.

FOUNTOULAKIS, M.S.; TERZAKIS, S.; KALOGERAKIS, N.; MANIOS, T. Removal of poly-cyclic aromatic hydrocarbons and linear alkylbenzene sulfonates from

domestic wastewater in pilot constructed wetlands and a gravel filter. *Ecological Engineering*, v. 35, p. 1702- 1709, 2009.

FRANKENBERGER, JR.; W.T. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In CALABRESE, E.J.; KOSTECKI, P.T. *Hydrocarbon contaminated soils and groundwater*, v. 2, p. 237-293, 1992.

FUKUHARA, Y.; HORII, S.; MATSUNO, T.; MATSUMIYA, Y.; MUKAI, M.; KUBO, M. Distribution of Hydrocarbon-Degrading Bacteria in the Soil Environment and Their Contribution to Bioremediation. *Appl Biochem Biotechnol*, v.170, p. 329- 339, 2013.

FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds- from one strategy to four. *Nature Reviews*, Alemanha, v. 9, p. 803-816, 2011.

FARHADIAN, M., DUCHEZ, D., VACHELARD, C., LARROCHE, C. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors – A review. *Water Research*, v. 42, p. 1325–1341, 2008.

GOUGH, M. A.; ROWLAND, S.J. Characterization of unresolved complex mixtures of hydrocarbons in petroleum. *Nature*, v.334, p.648-650, 1990.

GUIGUER, N. Poluição das águas subterrâneas e do solo causada por vazamentos em postos de abastecimento. *Waterloo Hydrogeologic*, Inc. p. 356, 2000.

HAMAMURA, N.; OLSON, S.H.; WARD, D.M.; INSKEEP, W.P. Microbial population dynamics associated with crude oil biodegradation in diverse soils. *Appl Environ Microbiol.*, v.72, p.6316- 6324, 2006.

HAMZAH, R. Y. e AL-BAHARNA, B. S. Catechol ring-cleavage in *Pseudomonas cepacia*: the simultaneous induction of ortho and meta pathways. *Appl. Microbiol Biotechnol*, v.41, p. 250-256, 1994.

HANSON, K.G.; DESAI, J.D.; DESAI, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol. Technol.*, v. 7, p. 745-748, 1993.

HARAYAMA, S.; TIMMIS, K.N. Catabolism of Aromatic Hydrocarbons by Pseudomonas. In: *Genetics of Bacterial Diversity*, Hopwood, DA and Chater, KF, ed. Florida, USA, p. 152-174, 1989.

JANBANDHU, A. e FULEKAR, M.H. Biodegradation of Phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *J. Hazard. Mater.*, v. 187, p. 333-340, 2011.

KAUPPI, S.; SINKKONEN, A.; ROMANTSCHUK, M. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Finlândia, v. 65, p. 359-368, 2011.

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. *J Environ Manage*, v. 71, n. 2, p. 95-122, 2004.

KILLOPS, S. e KILLOPS, V. Introduction to Organic Geochemistry. ed.2. Blackwell Publishing, p.406, 2005. ISBN 0-632-06504-4.

KIRTLAND, B. C. e AELION, C. M. Petroleum mass removal from low permeability sediment using air sparging/soil vapor extraction: impact of continuous or pulsed operation. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 41, n. 3-4, p. 367-383, 2000.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, USA, v. 36, p. 364-373, 2010.

LEAHY, J. G. e COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev*, v. 54, n. 3, p. 305-15, 1990.

LEBKOWSKA, M.; ZBOROWSKA, E.; KARWOWSKA, E.; MIASKIEWICZ, E.; MUSZYNSKI, A.; TABERNACKA, A.; NAUMCZYK, J.; JECZALIK, M. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. *Ecological Engineering*, v. 37, p. 1895 -1900, 2011.

LOH, K.C.; CHUA, S.S. Ortho pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of meta pathway at high substrate concentrations. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 620-626, 2002.

MADSEN, E.L. Determining in situ biodegradation – Facts and challenges. *Environmental Science & Technology*, v. 25, n. 10, p. 1662-1673, 1991.

MANCINI, T. M. Métodos de caracterização de áreas potencialmente contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo. Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Unesp – Rio Claro, 2002.

MAPA. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 7, de 11 de janeiro de 2010.

MARCHAL, R.; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J. P. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology*, v. 58, n. 4, p. 441-448, 2003.

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

MARIANO, Adriano. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminadas com óleo diesel. Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 162 f., Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARIANO, A. P.; BONOTTO, D. M.; ANGELIS, D.F.; PIRÔLLO M. P. S; CONTIERO, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, n.39, p.133-142, 2008.

MARIANO, A.P.; TOMASELLA, R.C.; DI MARTINO, C.; MORAIS, E.B.; FILHO, R.M.; SELEGHIM, M.H.R; CONTIERO, J.; TORNISIELO, S.M.T; ANGELIS, D.F. Aerobic biodegradation of butanol and diesel oil blends. *African Journal of Biotechnology*, Brasil, v. 9, n. 42, p. 7094-7101, 2010.

MEGHARAJ, M.; RAMAKRISHNAN, B.; VENKATESWARLU, K.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*, Austrália, v. 37, p. 1362 -1375, 2011.

MEYER, D.D., BEKER, S.A., BÜCKER, F., PERALBA, M.C.R., FRAZZON, A. P.G., OSTI, J.F., ANDREAZZA, R., CAMARGO, F.A.O., BENTO, F.M. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. *Int. Biodeterior. Biodegr.*, v. 95, p.356-363, 2014.

MISHRA, S.; JYOT, J.; KUHAD, R.C.; LAL, B.. Evaluation of Inoculum Addition to Stimulate In Situ Bioremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Índia, v. 67, n. 4, p. 1675-1681, 2001.

MOSCOSO, F.; TEIJIZ, I.; F.J. DEIVE, F.J.; SANROMÁN, M.A. Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Bioresource Technology*, v. 119, p. 270-276, 2012.

MROZIK, AGNIESZKA; PIOTROWSKA-SEGET, ZOFIA. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, v.165, p. 363-375, 2010.

MUCKIAN, L.M., GRANT, R.J., CLIPSON, N.J.W., DOYLE, E.M. Bacterial community dynamics during bioremediation of phenanthrene- and fluoranthene-amended soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 63, p. 52-56, 2009.

NADIM, F.; HOAG, G. E.; LIU, S.; CARLEY, R. J.; ZACK, P. Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview. *J. of Petrol. Sci. and Eng.*, v.26, p. 169-178, 1999.

NIKOLOPOULOU, M.; PASADAKIS, N.; NORF, H. e KALOGERAKIS, N. Enhanced ex situ bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids. *Marine Pollution Bulletin*, v. 77, n. 1-2, p. 37- 44, 2013.

OLIVEIRA, S. D.; BAISCH, P. R.; MACHADO, M.I. Degradação do petróleo em ambiente estuarino na Lagoa dos Patos através de um derrame induzido. 4º PDPETRO, Campinas, p. 7, 2007.

OLLIVIER, B.; MAGOT, B. Petroleum Microbiology. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, DC, 2005.

OKPOKWASILI, G.C. Microbes and the Environmental Challenge. Inaugural lecture series n. 53. University of Port Harcourt Press., *Port Harcourt*, p 1-77, 2006.

PATNAIK, P. Handbook of Environmental Analysis: *Chemical Pollutants in Air, Water, soil, and Solid Wastes*, p. 604, 1996.

PAZMIÑO, D.E.T.; WINKLER M.; GLIEDER A.; FRAAIJE, M.W. Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*, v. 146, p.9-24, 2010.

Phase Separation Science, Inc., disponível em:<http://www.phaseonline.com/tech_updates/phasefact_04.html>. acessado em 05 de março de 2015.

PIETROLETTI, M.; CAPOBIANCHI, A.; RAGOSTA, E.; MECOZZI, M. Preliminary evaluation of hydrocarbon removal power of *Caulerpa racemosa* in seawater by means of infrared and visible spectroscopic measurements. *Spectrochimica Acta Part A*, Itália, v. 77, p. 673- 679, 2010.

PULITANO, F. M. Análise da estrutura e funcionamento de reflorestamento de mata ciliar aos 18 e 28 anos após o plantio, no município de Cândido Mota, SP. 2003, 152f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Carlos.

QIAO, N. e Z. SHAO. Isolation and characterization of a novel biosurfactant produced by hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax* diesel oil B-5. *Journal of Applied Microbiology*., v. 108, p. 1207-1216, 2010.

QUATRINI, P.; SCAGLIONE, G.; DE PASQUALE, C.; REILA, S.; PUGLIA, A. M. Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon contaminated Mediterranean shoreline. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, p. 251-259, 2008.

RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C.; SOBRAL, L. G. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2006. ISBN 978-85-61121-03-7.

ROY, S.; HENS, D.; BISWAS, D.; KUMAR, R. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 18, p. 575-581, 2002.

ROJAS-AVELIZAPA, N. G. et al. A field trial for an ex-situ bioremediation of a drilling mud-polluted site. *Chemosphere*, v. 66, n. 9, p.1595-1600, 2007.

RUBERTO, L.; DIAS, R.; BALBO, A.L.; VAZQUEZ, S.C.; HERNANDEZ, E.A.; CORMACK, W.P.M. Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the

hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. *J Appl Microbiol.*, v.106, p.1101-1110, 2009.

RUSSELL, J. B. Química Geral. Tradução: M. Guekezian, 2. ed., v. I, Sao Paulo: Makron Books, 1994.

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

SANTOS, M. A. Avaliação do risco a saúde por exposição ambiental a hidrocarbonetos aromáticos monocíclicos – estudo de caso. Dissertação de Mestrado apresentada Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Universidade de Brasília, p.138, 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.

SCOTT, C.; LEWIS, S.E.; MILLA, R.; TAYLOR, M.C.; RODGERS, A.J.W.; DUMSDAY, G. A free-enzyme catalyst for the bioremediation of environmental atrazine contamination. *J. Environ. Manage.*, v. 91, p. 2075–8, 2010.

SCRAGG, A. Environmental Biotechnology. Ed. Oxford, Nova York, 2ª ed., p.447, 2005.

SEABRA, P.N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. *Microbiologia Ambiental*. 2º ed. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2008, p. 547-570.

SHANKAR, S.; KANSRAJH, C.; DINESH, M.G.; SATYAN, R.S.; KIRUTHIKA S., THARANIPRIYA, A. Application of indigenous microbial consortia in bioremediation of oil-contaminated soils. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, v. 11, p. 367-376, 2014.

SILVA, I.S.; SANTOS, E.C.; MENEZES, C.R.; FARIA, A.F.; FRANCISCON, E.; GROSSMAN, M.; DURRANT, L.R. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon

contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*, Brasil, v. 100, p. 4669-4675, 2009.

TAHHAN, R.A; AMMARI, T.G.; GOUSSOUS, S.J.; AL-SHDAIFAT, H.I. Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Jordânia, v. 65, p. 130-134, 2011.

TENG, Y., FENG, D., SONG, L., WANG, J., LI, J. Total petroleum hydrocarbon distribution in soils and groundwater in Songyuan oilfield, Northeast China. *Environ. Monit. Assess.*, v. 185, p.9559-9569, 2013.

TIBURTIUS. ELAINE R. L; ZAMORA. PATRICIO P., LEAL. ELENISE S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Quím. Nova*, v.27, n.3, São Paulo, 2004.

TRAN, T.C.; LOGAN, G.A.; GOSJEAN, E.; RYAN, D.; MARRIOTT, P.J. Use of comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the characterization of biodegradation and unresolved complex mixtures in petroleum. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 74, p. 6468-6484, 2010.

TYAGI, M.; DA FONSECA, M. M. R.; DE CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, v. 22, n. 2, p. 231-241, 2011.

URURAHY, A. F. P. Biodegradacao de residuo oleoso proveniente de refinaria de petroleo. Dissertacao de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Quimica, Rio de Janeiro, 344p, 1998.

USEPA. Toxic Release Inventory Public Data Release. Washington, D.C.: Office of Environmental Information, United States Environmental Protection Agency; 2004.

USEPA. In Situ and Ex Situ Biodegradation Technologies for Remediation of Contaminated Sites. Washington, D.C.: Office of Environmental Information, United States Environmental Protection Agency; 2006.

VIEIRA, P.A.; VIEIRA, R.B.; FARIA, S.; RIBEIRO, E.J.; CARDOSO, V.L. Biodegradation of diesel oil and gasoline contaminated effluent employing intermittent aeration. *Journal of Hazardous Materials*, v.168, p. 1366-1372, 2009.

VOLKMAN, J. K.; HOLDSWOTH, G.D.; NEILL, G.P.; BAVOR, H.J. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *Sci. Total Environment*, v.112, p.203-219, 1992.

VOLLHARDT, K. P. C. e SCHORE, N. E. Química orgânica: estrutura e função. ed. 4. Porto Alegre: 2004. ISBN 85-363-0413-8.

WATANABE, K.; HAMAMURA, N. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *Curr Opin Microbiol*, v.14, p. 289-295, 2003.

WILKSTROM, P.; WIKLUND, A.; ANDERSSON, A-C.; FORSMAN, M. DNA recovery and PCR quantification of catechol 2,3-dioxygenase genes from different soil types. *Journal of Biotechnology*, v.52, p.107- 120, 1996.

WOLICKA, D.; SUSZEK, A.; BORKOWSKI, A.; BIELECKA, A. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology*, v.100, p.3221-3227, 2009.

XIE, G.; BARCELONA, M. J.; FANG, J. Quantification and interpretation of Total Petroleum Hydrocarbons in sediment samples by a GC/MS method and comparison with EPA 418.1 and a rapid field method. *Analytical Chemistry*, v. 71, n. 9, p. 1899-1904, 1999.

XU, N.; BAO, M.; SUN, P.; LI, Y. Study on bioadsorption and biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbial consortium. *Bioresour Technol*, v. 149, p. 22-30, 2013.

ZHANG, Z.; GAI, L.; HOU, Z.; YANG, C.; MA, C.; WANG, Z.; SUN, B.; HE, X.; TANG, H.; XU, P. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Bioresource Technology*, China, v. 101, p. 8452–8456, 2010.

ZHU, X.; VENOSA, A. D.; SUIDAN, M. T. e LEE, K. Guidelines for the Bioremediation of Marine shorelines and Freshwater wetlands. U.S. EPA, p.163, 2001.

ZHU, L.; LU, L.; ZHANG, D. Mitigation and remediation technologies for organic contaminated soils. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, v. 4, n. 4, p. 373–386, 2010.

ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.*, v.10, p.1-49, 1946.

