UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

Estudo de comunidades bacterianas de solo impactado por misturas diesel-biodiesel (B0, B20, B100)

Julio Flavio Osti

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon

Trabalho de Conclusão de Curso, para obtenção do titulo de Bacharel em Ciências Biológicas, apresentado conforme as normas da Revista Trópica –Ciências Agrárias e Biológicas.

Porto Alegre, 2012

Estudo de comunidades bacterianas do solo impactadas por misturas diesel-biodiesel (B0, B20 e B100)

Julio Flavio Osti[1], Francielle Bücker[1], Fátima Menezes Bento[1] e Ana Paula Guedes Frazzon[1]

Resumo- O presente trabalho teve como objetivo analisar a estrutura das comunidades bacterianas do solo, após impacto de 60 dias por diesel (B0), misturas diesel-biodiesel (B20) e biodiesel (B100), sob tratamentos de biorremediação por atenuação natural ou bioaumentação acompanhada de bioestimulação, utilizando a técnica de DGGE. Foi observado um elevado grau de similaridade entre as amostras que foram contaminadas com B0 e B20, em ambas as estratégias de biorremediação. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas nas amostras contaminadas com biodiesel B100. Na estratégia de bioaumentação combinada com bioestimulação foram inoculadas 4 espécies bacterianas formando um consórcio, onde apenas uma destas espécies pode ter se mantida após 60 dias, sendo encontrada nos tratamentos B0 e B100.

Palavras-Chave- bicombustíveis, hidrocarbonetos, solo, DGGE

Study of bacterial communities of soil impacted for blends diesel-biodiesel (B0, B20 and B100)

Abstract- The objective of this work was to analyze the strutute of bacterial communities, after impact of 60 days of diesel (B0), diesel-biodiesel (B20) and biodiesel (B100), under treatments of bioremediation for natutal attenuation or bioaugmentation combined with biostimulation, using DGGE. It was observed a high similarity between the samples that were contaminated with B0 or B20, in both bioremediation strategies. It was not observed clear diferences in samples contamianted with biodiesel B100. In bioaugmentation combined with biostimulation strategy, it was incoulated 4 bacterial species forming a consortium, when only one specie can presented sucess after 60 days, when It was found in B0 B100 treatments.

Key-words- biofuels, hidrocarbons, soil, DGGE

[1]Universidade Federal do Rio Grande do Sul.juos87@hotmail.com; ana.frazzon@ufrgs.br

Agradecimentos

A professora Ana Paula, por ter me acolhido como aluno. Sua paciência e dedicação para tornar o trabalho escrito coerente, compreensivel e organizado foi essencial.

A professora Fátima, por aceitar me inserir em suas atividades cientificas.

A Francielle por ter dedicado seu tempo para tornar possível a realização do presente trabalho do inicio até o final.

Aos meus pais Rita e Aparecido, por toda a paciência e compreenção e aconchego demonstrados ao longo de toda graduação. Mesmo tão distantes sempre se mostraram incrivelmetne presentes.

A minha irmã Aline, pelas nossas conversas descontraídas . E a minha irmã Juliana, sobretudo por nossas longas conversas em meus momentos doloridos.

Ao Ivo, pela sua lealdade, carinho e atenção por tanto tempo. Sua preocupação e interesse com meu TCC foi muito notável.

Ao Arminius, por também ter se mostrado interessado neste trabalho, me perguntou sempre sobre ele.

INTRODUÇÃO

O biodiesel é uma alternativa ao uso dos combustíveis fósseis, e mostra-se consolidado na matriz energética brasileira e mundial, devido a sua origem renovável, diminuindo a dependência de combustíveis de origem fóssil apresentando como uma das grandes vantagens a redução dos impactos ambientais provocados pela utilização de uma matriz energética não renovável e altamente poluente como o diesel(Osaka & Batalha, 2011; Sallet & Alvin, 2012). Atualmente as principais fontes de biodiesel são a gordura animal, como por exemplo, o sebo bovino ou banha de origem suína e uma variedade de óleos vegetais, tais como óleos de coco, oliva, girassol, amendoim, algodão, milho, palma, mamona ou soja (Ramos et al., 2000; Sharid & Jamal, 2007). Segundo definições determinadas pela resolução ANP Nº 7/2008, o biodiesel deve ser constituído de mono alquil ésteres obtidos de ácidos graxos de cadeia longa, oriundos de lipídeos de origem animal ou vegetal através do processo de transesterificação (ANP, 2008). O biodiesel diferencia-se do diesel mineral, porque este é derivado do petróleo, constituído basicamente por hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos e aromáticos e, em menor quantidade, por substâncias cuja fórmula química contém átomos de enxofre, nitrogênio, metais, oxigênio, entre outros (Ferreira et al., 2008).

As misturas entre diesel mineral e biodiesel recebem diferentes denominações, correspondendo à porcentagem de biodiesel no composto final. Desta forma, diesel mineral que não contém biodiesel é denominado B0, um mistura de diesel-biodiesel que contém 5% de biodiesel é denominada B5, uma mistura diesel-biodiesel de 20% de biodiesel B20, e biodiesel puro 100%, é chamado de B100 (Rathmann et al., 2005).

Em relação aos impactos nos ambientes aquáticos e terrestres, o biodiesel apresenta baixa toxicidade e elevada degradabilidade quando comparado ao diesel mineral (Peterson & Möller , 2004). O solo pode ser contaminado por hidrocarbonetos como gasolina e diesel, por meio de derramamentos acidentais ou vazamentos de dutos (Gallego et al., 2001). Um estudo conduzido por Lanpinskiene et al. (2006), realizado ao longo de 6 dias, demonstrou os efeitos tóxicos de elevadas concentrações diesel sobre a atividade microbiana do solo, enquanto que o biodiesel se mostrou atóxico sobre a atividade microbiana, até o limite de retenção deste no solo, evidenciando a toxidade, pelo menos inicial do diesel sobre a microbiota. Observou-se também, que elevadas concentrações de biodiesel no solo interferiram na germinação de sementes, mas seu impacto é menor do que o observado em tratamentos com diesel (Peterson et al., 2004). Destacando-se que a biodegrabilidade do biodiesel é quatro vezes mais rápida do que o petrodiesel (Demirbas, 2007).

Como alternativa de reparação e atenuação aos danos causados ao solo, a biorremediação pode ser definida como a utilização de microrganismos para degradação de poluentes no meio ambiente. Essa capacidade de restauração do meio ambiente ocorre pela diversidade e adaptabilidade dos

microrganismos presente no ambiente em degradar ou transformar uma gama de contaminantes inorgârnicos e/ou orgânicos como hidrocarbonetos derivados do petróleo como o diesel (Cunningham & Philip, 2000).

Entre os métodos de biorremediação destacam-se: a atenuação natural, bioaumentação e a bioestimulação. Segundo Mulligan & Yong (2004) a atenuação natural pode ser descrita como um processo que ocorre naturalmente no ambiente, onde acontece uma diminuição da concentração de poluentes, através de biodegradação, volatilização, dispersão, diluição e sorção do contaminante por minerais argilosos ou matéria orgânica.

A bioaumentação ocorre devido ao acréscimo de microrganismos ou consórcios de microrganismos com capacidade de degradação do contaminante (Fantroussi & Agathos, 2005; Meyer, 2011). O inóculo utilizado no meio impactado pode ter origem do próprio local, recebendo assim o nome de autóctone ou de outros ambientes contaminados, chamados assim de exógenos (Meyer, 2011). Em situações de pouco sucesso sugere-se que ocorre diminuição da população inoculada pela pouca adaptação ao novo ambiente exógeno (Fantroussi & Agathos , 2005).

A bioestimulação caracteriza-se pela simples adição de nutrientes ao solo a fim de estimular sua microbiota nativa (Bento et al., 2005). A estratégia de utilizar um tratamento combinado de bioaumentação com bioestimulação pode ser interessante, uma vez que estimula tanto a microbiota nativa, quanto o consórcio autóctone (El Fantroussi & Agathos , 2005).

Muyzer & Smalla (1998), Evans et al.(2004) e Silva & Armas (2010), relatam que a identificação da estrutura das comunidades bacterianas, utilizando as técnicas tradicionais baseadas em cultivo de microrganismos muitas vezes é inviável para acessar a real constituição da microbiota do ambiente, uma vez que existem espécies bacterianas que não são cultiváveis em laboratório. Assim para solucionar este problema, os autores apontam técnicas moleculares como a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) que têm se mostrado muito promissora em estudos de ecologia microbiana. Esta técnica em particular, avalia diferentes polimorfismos de um mesmo gene, que são separados por um gradiente de desnaturação de uréia e formamida.

No contexto da biorremediação apresentado, a identificação das linhagens bacterianas de um ambiente contaminado por misturas diesel-biodiesel pode ser interessante, uma vez que informa o impacto que os contaminantes provocam nas comunidades microbianas do ecossistema do solo, contribuindo na escolha das estratégias mais promissoras de biorremediação (Evans et al., 2004). O presente trabalho teve como objetivo analisar a dinâmica da comunidade microbiana bacteriana do solo após impacto por diesel B0, mistura diesel-biodiesel B20 e biodiesel B100, sob tratamento de biorremediação por atenuação natural ou bioaumentação acompanhada de bioestimulação, utilizando a técnica de DGGE, ao final de 60 dias.

MATERIAS E MÉTODOS

As amostras de solo utilizadas no presente estudo são provenientes de trabalho anterior desenvolvido por Meyer (2011). O autor desenvolveu duas estratégias de biorremediação: 1) atenuação natural e 2) bioaumentação combinada com bioestimulação. Todas as amostras foram acondicionadas em frascos respirométricos (1L), onde se adicionou 300 gramas de solo que não apresentava histórico de contaminação, colhido a uma profundidade de 0-20 cm e classificado como solo argiloso Nitossolo Vermelho Distrófico, de substrato basáltico. Aos solos nos frascos, adicionou-se 30 ml dos seguintes combustíveis: diesel (B0), mistura diesel-biodiesel (B20) e biodiesel (B100).

Para os experimentos de biorremediação foram organizados tratamentos controles: A) controle de todos os tratamentos de biorremediação, onde se utilizou o mesmo solo, comum a todos os experimentos, mas sem a contaminação com combustível, nem incubação por 60 dias (Arg); B) controle negativo dos tratamentos de biorremediação por atenuação natural (A_CN), onde o solo foi incubado sem contaminação por combustíveis e C) controle negativo do tratamento de biorremediação por bioaumentação combinado com bioestimulação (B_CN), sem contaminação por combustíveis, mas incubado com adição de consórcio bacteriano e nutrientes minerais (tabela 1). Nos experimentos de biorremediação por atenuação natural, ocorreu apenas à contaminação dos solos pelos combustíveis utilizados (A_B0; A_B20 e A_B100), sem adição de consórcios bacterianos, nem a adição de nutrientes. Nos experimentos de biorremediação por bioaumentação combinada com bioestimulação (B_B0; B_B20 e B_B100), adicionou nas amostras de solos, bactérias previamente isoladas de um solo com histórico de contaminação petroquímica, formando um consórcio, além de uma solução de NH_4NO_3 e KH_2PO_4, para enriquecer o solo com N e P. O consórcio bacteriano foi composto de *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*. As referidas espécies foram previamente identificadas e caracterizadas quanto a sua capacidade de degradação de misturas de diesel-biodiese (Meyer, 2011). Os frascos respirométricos foram incubados por um período de 60 dias e mantidos a temperatura ambiente, com média de 22°C.

A partir de uma amostra de 300 mg de solo, foi realizada a extração de DNA dos microrganismos presentes na amostra utilizando o kit *PowerSoil DNA Isolation* (MO BIO Inc., Laboratories, USA). A amplificação da região variável V3 do gene *16S rRNA* do domínio Bacteria por PCR, foi realizada utilizando os *primers* universais BA338F (5′ACTCCTACGG GAGGCAGCAG) ligado a um grampo GC e UN518R (5'ATTACCGCGGCTGCTGG). A amplificação do gene *16S rRNA* foi realizada em solução contendo 1-5 ng/μl^{-1} de DNA molde, 1U *Taq* DNA Polimerase Platinum (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 1,5 mM $MgCl_2$; 200 µM dNTP; 5

pmol de cada *primer* universal, em um volume final de 25µl. As condições da amplificação da PCR foram: 5 min. a 94 ºC, 35 ciclos de 1 min. a 94 ºC, 1 min. a 55 ºC e 1 min. a 72ºC, e extensão final a 72ºC por 10 min. A amplificação foi conduzida em um termociclador TX96 Plus (AMPLITHERM). Os produtos amplificados foram analisados em agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (5µg/ul) e visualizado em luz ultravioleta

Os amplicons obtidos foram analisados em eletroforese em gel com gradiente desnaturante como descrito por Ovreas et al. (1997). Os géis continham 8% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1 m:m), e apresentavam um gradiente desnaturante de 15% a 55% de formamida e uréia (Øvreås et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 200 V, durante 3 horas e 30 minutos no DCode TM System (Bio-Rad Inc.,Hercules, USA) em tampão de corrida 1X TAE. O gel foi corado com Syber Safe (Invitrogen, São Paulo, Brasil) durante 30 minutos. A aquisição das imagens foi feita por fotodocumentador GL2200 (KODAK). Gerou-se uma matriz binária utilizada para calcular uma matriz de similaridade (coeficiente de DICE) e para agrupar um dendrograma UPGMA, utilizando-se o programa NTSYSpc 2.10.

Tabela1. Tratamentos de biorremediação no solo, contaminados com diferentes combustíveis e adições conforme a estratégia de biorremediação utilizada.

Tratamento	**Adição**	**Sigla**
Controle negativo	Sem combustíveis, sem incubação	**Arg**
Controle negativo da atenuação natural	Sem combustíveis	**A_CN**
Atenuação natural+ diesel	Diesel (B0)	**A_B0**
Atenuação natural+ diesel-biodiesel	Diesel-biodiesel (B20)	**A_B20**
Atenuação natural+biodiesel	Biodiesel (B100)	**A_B100**
Controle negativo da bioaumentção+bioestimulação	Consórcio e nutrientes, sem combustíveis	**B_CN**
Bioaumentação+bioestimulação	Diesel (B0), consórcio e nutrientes	**B_B0**
Bioaumentação+bioestimulação	Diesel-biodiesel (B20), consórcio e nutrientes	**B_B20**
Bioaumentação+bioestimulação	Biodiesel (B100), consórcio e nutrientes	**B_B100**

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de DGGE para análise de comunidades microbianas é uma ferramenta que permite verificar a estrutura da comunidade bem como, pode revelar as populações microbianas que são dominantes no ambiente. Uma das principais vantagens do DGGE é que esta técnica permite a detecção e análise de espécies não cultiváveis. No entanto, ela também apresenta algumas limitações que podem estar associadas a problemas na extração e amplificação do DNA, no gel desnaturante, presença de produtos de PCR quiméricos, produto de culturas mistas, e a possibilidade de não se diferenciar espécies muito próximas (Taccari et al., 2012; Evans et al., 2004). Em ambientes com grande diversidade microbiana como o solo, a co-migração de fragmentos de DNA de táxons diferentes pode ocorrer (Muyzer & Smalla, 1998; Gafan & Spratt, 2005). Pode ocorrer até mesmo co-migração de fragmentos de DNA de táxons bacterianos muito distantes entre si, dentro de uma mesma banda em um gel de DGGE (Sekiguchi et al., 2001).

O resultado do DGGE demonstrou que somente uma única espécie bacteriana do consórcio pode ter se estabelecido com êxito na estratégia de bioaumentação, que recebeu contaminação por B0, B100, bem como no controle (Figura 1, pontos vermelhos). Além disso, não foram observados indícios da presença efetiva das demais espécies do consórcio nos tratamentos. Pode-se inferir que as bandas dos tratamentos, que apresentaram mesmo padrão de migração de uma banda do consórcio, seja referente a um dos microrganismos adicionados ao tratamento de biorremediação, entretanto para a confirmação deste resultado, as bandas deveriam ser seqüenciadas. Uma série de fatores pode explicar o pouco sucesso dos microrganismos utilizados na bioaumentação, como por exemplo, a competição dos inóculos com os microorganismos autóctones por nutrientes bem como por aceptores de elétrons e a predação por protozoários, podem ser fatores ecológicos importantes que podem interferir negativamente na adaptação no inóculo ao novo ambiente (Mariano et al.2009; El Fantroussi & Agathos, 2005). Adicionalmente, características abióticas intrínsecas do novo ambiente onde o inóculo foi inserido, podem interferir no seu sucesso adaptativo (El Fantroussi & Agathos, 2005).

Pela eletroforese do DGGE, são observados diversos fragmentos de DNA nos diferentes tratamentos, incluindo o controle negativo do tratamento de bioaumentação. Estes fragmentos de DNA podem ser das mesmas espécies bacterianas (Figura 1, pontos azuis). Embora o seqüenciamento também seja necessário. É sabido que a capacidade dos microrganismos indígenas de degradar compostos orgânicos novos no ambiente deriva de sua co-evolução com compostos que ocorrem naturalmente naquele local, que apresentam estruturas moleculares análogas as novas moléculas presentes com a contaminação (Chikere et al., 2011; Fernández-Luquenõ et al., 2011). Além do mais, microrganismos podem responder a uma grande quantidade de condições

estressantes, como a presença repentina de compostos tóxicos como o diesel, através da mudança de seu padrão de expressão gênica (Fernández-Luquenõ et al., 2011). Essas capacidades que microrganismos autóctones podem apresentar podem explicar a adaptabilidade que esses seres vivos apresentam, com a presença dos contaminantes.

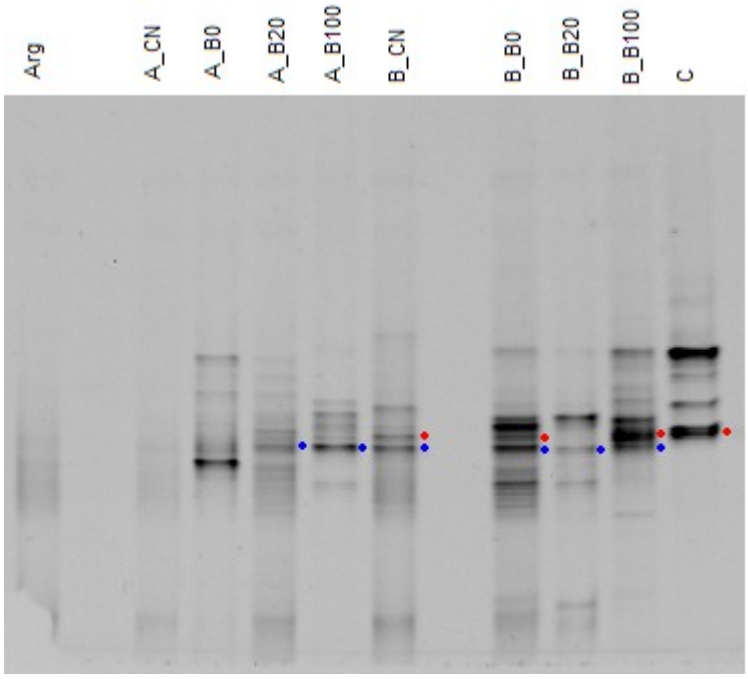

Figura 1. Eletroforese de DNA em gel com gradiente desnaturante (DGGE) de amostras de solo impactado por misturas diesel-biodiesel. Arg: (controle negativo); A_CN: (controle negativo atenuação natural; sem combustivel); A_B0: (atenuação natural B0); A_B20: (atenuação natural B20); A_B100: (atenuação natural B100); B_CN:(controle negativo bioaumentação+ bioestimulação; sem combustível); B_B0:(bioaumentação+bioestimulação B0); B_B-20: (bioaumentação+bioestimulação B20); B_B100: (bioaumentação+bioestimulação B100); e C: (consórcio)

A análise do cladograma demonstrou a formação de um *cluster* entre os tratamentos B_B0 e B_B20, com similaridade em torno de 75%, e também nos tratamentos A_BO e A_B20 com índice de similaridade de 56% (Figura 2). Este resultado justifica-se, porque pode ocorrer seleção de microrganismos que utilizam os hidrocarbonetos do diesel como fonte de carbono, no contexto tipicamente oligotrófico do solo, modificando a estrutura da microbiota, induzindo a formação de comunidades bacterianas semelhantes entre as amostras que contem diesel, isto é, B0 e B20, em ambas as estratégias de biorremediação (Bundy et al., 2002; Evans et al., 2004). A similaridade compartilhada em misturas diesel-biodiesel, que contenham alto teor de diesel, é corroborada por Silva et al. (2012), que demonstraram a formação de um *cluster* exclusivo por comunidades

bacterianas do solo, que apresentam misturas diesel-biodiesel com alto teor de diesel, se distinguindo dos tratamentos controles bem como biodiesel B100. Este mesmo perfil de agrupamento em *clusters* é observado no presente estudo, uma vez o diesel B0 se agrupou a sua mistura com biodiesel em B20, formando *clusters* em ambas as estratégias de biorremediação utilizadas. Silva et al. (2012), também demonstraram o impacto que o biodiesel B100 provoca na estrutura da comunidade bacteriana, com diferenças significativas de comunidades bacterianas contaminadas com misturas diesel-biodiesel, bem como frente ao controle sem contaminação, embora essa divergência clara de B100 não tenha sido observado no presente estudo. Os autores também sugerem que ocorra seleção de grupos bacterianos capazes de degradar biodiesel.

É notável a grande similaridade entre as comunidades bacterianas presentes nos tratamentos B0 e B20 na estratégia de biorremediação por bioaumentação combinada com bioestimulação, formando um cluster com similaridade por volta de 75% entre as amostras, similaridade maior quando comparada aos mesmos tratamentos, que passaram apenas por atenuação natural (Figura 2). A bioestimulação que é a adição de nutrientes no solo pode provocar impactos sobre a microbiota do solo contaminado, induzindo a formação de comunidades microbianas diferenciadas, quando comparada a um solo igualmente contaminado, mas sem a adição de nutrientes (Evans et al.,2004). Em contrapartida, a adição de consórcios, pode não provocar mudanças na estrutura das comunidades microbianas, quando mal sucedidos (Vinãs et al., 2006), e mudanças não muito significativas, quando com relativo sucesso com esta estratégia (Cunliffe & Kertesz, 2006), colocando em duvidas o impacto dos consórcio bacterianos sobre a estrutura da comunidade bacteriana hospedeira. Sugere-se que o impacto do combustível seja o maior fator na modificação da microbiota, seguido pela adição de nutrientes N e P, bem como a interação entre os dois fatores (Margesin et al., 2007). Isso abre a possibilidade de que a adição de nutrientes ao tratamento de biorremediação seja o maior fator pela alta convergência das comunidades bacterianas, compartilhadas por B0 e B20, do que a adição de consórcio bacteriano na mesma estratégia de biorremediação.

Observam-se bandas mais destacadas entre os tratamentos de bioaumentação combinado com bioestimulação, quando comparados aos tratamentos de atenuação natural, sugerindo que houve uma maior atividade microbiana no tratamento combinado de bioaumentação e bioestimulação. Essa diferença é marcante nos tratamentos que receberam diesel (B0) e biodiesel (B100), evidenciando o possível impacto da estratégia de bioestimulação sobre a atividade da microbiota. El Fantroussi & Agathos, 2005, sugerem que a adição de nutrientes em uma estratégia combinada de bioaumentação com bioestimulação, pode induzir a maior atividade tanto dos microrganismos autóctones, quanto do inóculo exógeno.

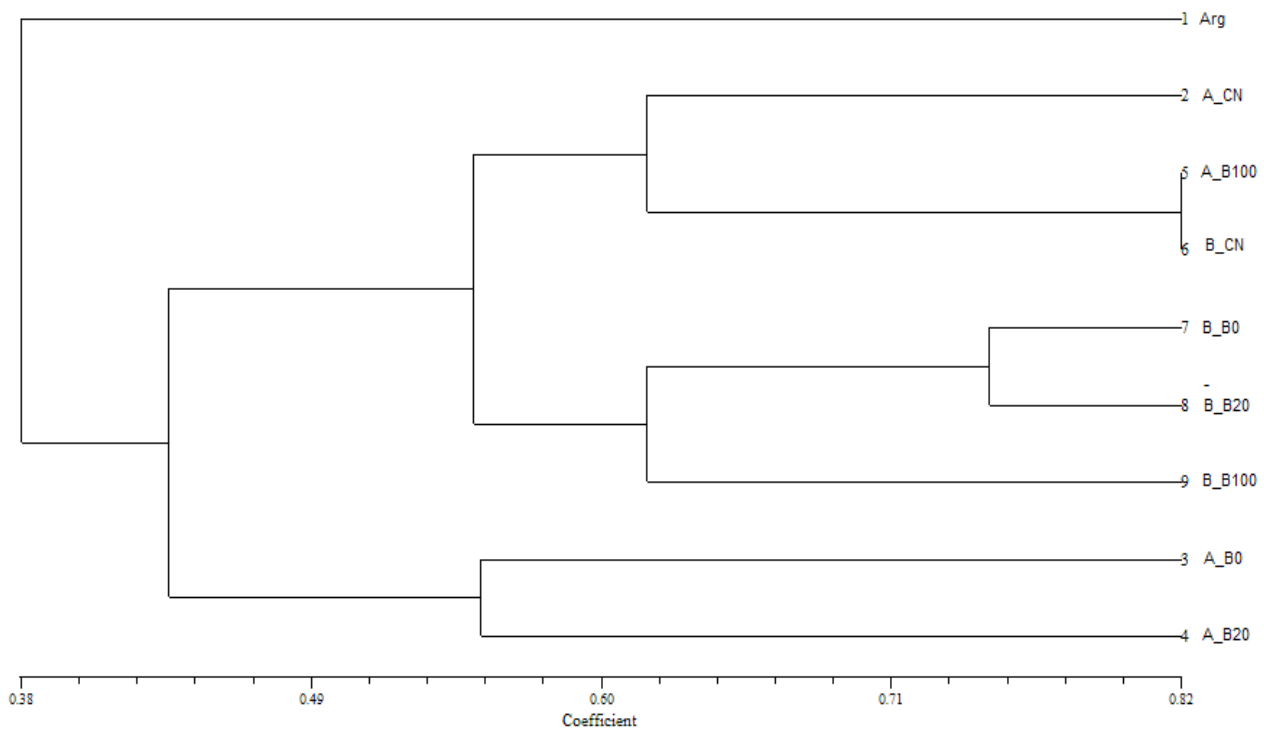

Figura 2. Cladograma demonstrando as relações de similaridade entre os tratamentos de atenuação natural e os tratamentos de bioaumentação acompanhado por bioestimulação. 1: Arg (controle negativo); 2: A_CN (controle negativo atenuação natural; sem combustível); 3: A_B0: (atenuação natural B0); 4: A_B20 (atenuação natural B20); 5: A_B100 (atenuação natural B100); 6: B_CN (controle negativo bioaumentação+bioestimulação; sem combustível); 7: B_B0 (bioaumentação+bioestimulação B0); 8: B_B20 (bioaumentação+bioestimulação B20); 9: B_B100 (bioaumentação+bioestimulação B100).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram indícios dos impactos do diesel, biodiesel e misturas diesel-biodiesel, sobre as comunidades microbianas do solo. Se nota o impacto que o diesel-mineral apresenta sobre as comunidades microbianas de solos sem histórico de contaminação, induzindo a formação de *clusters* nos tratamentos, que apresentam este combustível, em ambas às estratégias de biorremediação apresentadas. É notável a possível alta convergência das comunidades contaminadas com diesel nos tratamentos que receberam o tratamento combinado de bioaumentação com bioestimulação, frente a estratégia de atenuação natural, evidenciando um possível alto impacto na estrutura da microbiota, provocada pela estratégia de bioestimulação. Nota-se também o pouco sucesso do consórcio bacteriano, com apenas uma espécie apresentando possível sucesso significativo na estratégia de bioaumentação combinada com bioestimulação, nos tratamentos que receberam B0 ou B100.

RERÊNCIAS

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis; Resolução ANP nº 7, de 19.3.2008 - DOU 20.3.2008

Bento, F.M.; Camargo, F.A.O.; Okeke, B.C.; Frankenberger, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural atenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresource Technology, v.95, n°9, 1049-1055, 2005.

Bundy, J.G.; Paton, G.I.; Campbell, C.D. Microbial communities in difeferent soil types do not converge after diesel contam

Chikere, B.C.; Surridge, J.K.; Cloete, T.E.; Okpokwasili, G.C. Phylogenetic diversity of dominant bacterial communities during bioremediation of crude oil-polluted soi. Revista Ambiente e Água: An interdiciplinary Journal of Applied Science, v.6, n°2,2011.

Cunliffe, M.; Kertesz,M.A. Effect of *Sphingobium yanoikuyae* B1 inoculation on bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a aged and freshly PAH-contaminated soils. Environmental Pollution. v.144, 228- 237, 2006.

Cunningham, C.J.; Philip, J.C. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. Land Contamination & Reclamation, 8 (4), 2000.

Demirbas, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. Energy Policy,v.35 , 4661–4670, 2007

El Fantroussi, S. ; Agathos, S. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? Current opinion in Microbiology, v.8,268-275, 2005.

Evans, F.F.; Rosato, A.S.; Sebastián, G.V.; Casela, R.; Machado, P.L.O.A.; Holström, C.; Kjelleberg, S.; Van Elsas, J.D.; Seldin, L.; Impacto f oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial comunities in soil microcosmos. FEMS Microbiology Ecology,v. 49, 295-395, 2004

Fernandez-Luqueño, F. Valenzuela-Encinas, C.; Marsch, R.; Martinez;-Suarez, C.;- Vazquez;-Nuñes, E.; Dendooven, L. Microbial Communities to mitigate contamination of PAHs in soil-possibilities and challenges: a review. Environment Science Pollutant Research, v.18,12-30, 2011

Ferreira, L.S.; dos Santos, A.M.; de Souza, G.R.; Polito, W.l; módolo, L.D. Analise or cromatografia de BTEX nas emissões de motores de cobmustão interna, alimentado por diesel e mistura diesel-biodiesel (B10). Química Nova, v. 31, n°3, 2008

Gafan, G.P.; Spratt, D.A. Denaturating gradient electrophoresis gel expansion (DGGEGE)- An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. FEMS Microbiology Letters, v.253, 303-307, 2005

Gallego, J.L.R.; Loredo,J.; Llamas, J.F.; Vázquez, F.; Sanches, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils:Evaluation of potential in situ techniques by studing of bacterial degradation. Biodegradation, v.12, n°5,325-332, 2005

Lapinskien, A.; Martinkus, P.; Rebzdaite, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. Environmental Pollution, v.142,432-437, 2006

Margesin, R.; Hämmerle, M.; Tschenko, D. Microbial Activity and Community composition during Bioremediation of Diesel-Oil Contaminated soil: Effects of Hidrocarbon Concentration, Fertilization and incubation Time. Microbial Ecology, v.53, n°2, 259- 269, 2007

Mariano, A.P; de Angelis, D. F.; Pirôllo, M.P.S.; Bonotto, D.M.I. Investigation about the efficiency of the bioaugmentation technique when aplplied to diesel oil contaminated soils. Brazilian Archives of Biology and Technology- An International Journal, v.52, n°5, 1297-1312, 2009

Meyer, D.D. Avaliação da biodegrabilidade de misturas de diesel e de biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias. Dissertção(Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011

Mulligan, C. N.;, Yong, R.N. Natural attenuation of contaminated soils. Environment International v.30,587– 601, 2004

Muyzer, G.; Smalla, K.; Application of denaturating gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek. v.73, 127-141, 1998

Osaki, M.; Batalha, M.O.Produção de Biodiesel de Óleo Vegetal no Brasil: Realidade e Desafio, Organizações Rurais & Agroindustriais, Lavras, v. 13, n. 2, p. 227-242, 2011

Øvreas, L., Forney, L. Dae, F.L., Torsvik., V.Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Sælenvannet, as determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified gene fragment coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiolology,v.63,3367-3373, 1997

Peterson,C. L.; Möller, G. Biodegradability, BOD5, COD and toxicity of biodiesel fuels. 2004. Disponivel em: http://www.uidaho.edu/bioenergy/. BiodieselEd/publication/04.pdf;- acessado em 18/04/2012

Ramos, L.P.; Kucek, K.T. ;Domingos, A. K. Wilhelm, H.M.; Biodiesel- Um projeto de sustentabilidade economiaca, sócio-ambiental para o Brasil. Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. Edição n°31,2000

Rathmann, R.; Benedetti, O.; Plá, J.A.; Pádula, A.D. Biodiesel: Uma Alternativa Estratégica na Matriz Energética Brasileira? 2007
Disponível em: http://www.fae.edu/publicacoes/pdf/iiseminario/sistemas/sistemas_03.pdf- acessado em 12/04/2012

Resolução CNPE nº 6, de 16.9.2009 - DOU 26.10.2009

Sallet, C.L.; Alvim, A.M. Biocombustíveis: uma análise da evolução do biodiesel no Brasil, Economia & Tecnologia - Ano 07, v. 25 - Abril/Junho de 2011

Sekiguchi, H.; Tomioka, N.; Nakahara, T.; Uchiyama, H. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturating gradient gel eletrophoresis analysis. Biotecnology Letters, v.23, 1205-1208, 2001

Shahid, E.M.; Jamal,Y. A review of biodiesel as vehicular fuel. Review Sustain Energy Rev.2007

Silva, G.S.; Marques, E.L.S.; Dias, J.C.T. Lobo, I.P.; Gross, E.; Brendel, M.; da Cruz, R.S.; Resende, R.P. Biodegrability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. Aplied Soil Ecology, v.55, 27-35, 2012

Silva, K.J.; Armas, R.D.; Minicurso:Bases teóricas e protocolo da técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010. Disponível em: http://pt.scribd.com/doc/86594414/Apostila-DGGE- acesso em 23/06/2012

Taccari, M.; Milanovic, V.; Cometini, F.; Casucci , C.; Ciani, . Effects of bioestimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. International Biodeterioration and Biodegradation, v.66,39-46, 2012

Vinãs, M.; Sabaté, J.; Espuny, M.J.; Solanas, A. M. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydroccarbon Degradation during Creosote Contaminated Soil. Applied and Environmental Microbiology, v.71, n°11, 7008-7018, 2005

Anexo1- Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas: Instruções para autores

Normas para Publicação

A revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas aceita trabalhos não submetidos a outros periódicos, na forma de Artigo Científico, Artigo de Revisão e Comunicação Curta. Os trabalhos devem ser relacionados com as áreas de Ciências Biológicas, Engenharia Agronômica e Zootecnia. Trabalhos na área de ensino voltados para estas três áreas do conhecimento também são aceitos para publicação.

Submissão

Os trabalhos devem ser encaminhados por via eletrônica para: tropica.cab@gmail.com

O e-mail que encaminha o artigo para publicação deve conter:

* Título do trabalho.

* Nome completo e e-mail do(s) autor(es).

* Formação acadêmica e grau acadêmico do(s) autor (es).

* Indicação do autor correspondente.

* Acima de quatro autores, informar a contribuição de cada um no trabalho.

* Indicação da área técnica do trabalho (Ciências Biológicas, Agronomia e Zootecnia).

* O nome do arquivo que contém o artigo não deve conter espaços nem acentos e deve ter o seguinte formato: NomeDoTrabalho_areaDeConhecimento_tipoDeTrabalho..

Deve-se se usar bio, para área de biologia; agro para agronomia; zoo para zootecnia; art se o trabalho for artigo; CC se for comunicação curta; RE se for artigo de revisão. Por exemplo: EstudoBorboletas_bio_art.

Os trabalhos podem ser redigidos em Português, Inglês e Espanhol. Quando enviado na língua portuguesa, o resumo deve ser redigido em português e inglês. Quando enviado na língua espanhola e inglesa, o resumo deve ser redigido na língua cujo trabalho foi submetido e em português.

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras). O texto deve ser digitado no editor de texto Word, espaçamento 1,5 entre linhas, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, margens de 2,0 cm, com páginas numeradas.

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

Título, autoria, Resumo, Palavras chave, Título em inglês, Abstract, Key words, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos (opcional), Referências. Os endereços institucionais e eletrônicos dos autores devem vir no rodapé da primeira página e devem estar agrupados por instituição.

Título

* Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.

* Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.

* Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.

* As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

* Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

Nomes dos autores

* Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e".

* O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, correspondente à respectiva chamada de endereço do autor no rodapé da página.

Endereço dos autores

* São apresentados no rodapé da primeira página do artigo, indicado pelo número em algarismo arábico correspondentes aos dos autores e devem conter o endereço postal completo das instituições e os endereços eletrônicos dos autores.

* Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.

* Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

* O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, fonte tamanho 10, alinhamento à esquerda da página e separado do texto por travessão.

* Deve ser redigido em parágrafo único e com fonte tamanho 10.

* Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.

* Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos empregados na pesquisa, os resultados e a conclusão.

* Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.

* O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Palavras chave

* A expressão Palavras chave deve ser seguida de dois-pontos, alinhada à esquerda da página, grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial e fonte tamanho 10.

* Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.

* Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.

* Não devem conter palavras que componham o título.

* Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

Introdução

* A palavra Introdução deve ser alinhada à esquerda da página, grafada com letras maiúsculas e em negrito e com espaçamento de 6 pt antes e depois.

* Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.

* O último parágrafo deve expressar o objetivo, de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

* A expressão Material e Métodos deve ser alinhada à esquerda da página, grafada com letras maiúsculas e em negrito e com espaçamento de 6 pt antes e depois.

* Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.

* Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.

* Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.

* Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.

* Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.

* Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.

* Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

* Pode conter tabelas e figuras.

Resultados e Discussão

* A expressão Resultados e Discussão deve ser alinhada à esquerda da página, grafada com letras maiúsculas e em negrito, e com espaçamento de 6 pt antes e depois.

* Deve ocupar quatro páginas, no máximo.

* Os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.

* As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.

* Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos frente aos apresentados por outros autores.

* Dados não apresentados não podem ser discutidos.

* Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.

* Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.

* As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

* O termo Conclusões deve ser alinhado esquerda da página, grafado com letras maiúsculas e em negrito e com espaçamento de 6 pt antes e depois.

* Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo, e elaboradas com base no objetivo do trabalho.

* Não podem consistir no resumo dos resultados.

* Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.

* Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

* A palavra Agradecimentos deve ser alinhada à esquerda da página, grafada com letras maiúsculas e em negrito, e com espaçamento de 6 pt antes e depois.

* Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).

* Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

* A palavra Referências deve ser alinhada à esquerda da página, grafada com letras maiúsculas e em negrito e com espaçamento de 6 pt antes e depois.

* Devem ser normalizadas de acordo com as normas vigentes da ABNT.

* Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.

* Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.

* Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.

* Devem com

ter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.

* Todas as referências devem registrar uma data de publicação.

* Devem ser listadas nas referências apenas fontes citadas pelo autor.

* Devem ser trinta, no máximo.

* Acima de seis autores é facultativo o uso de et al.