

DANIEL KUMAZAWA MORAIS

**DEGRADAÇÃO DE FENANTRENO EM LATOSSOLO: EFEITO DA
CONCENTRAÇÃO DO CONTAMINANTE E DA ADIÇÃO DE SURFACTINA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

DANIEL KUMAZAWA MORAIS

**DEGRADAÇÃO DE FENANTRENO EM LATOSSOLO: EFEITO DA
CONCENTRAÇÃO DO CONTAMINANTE E DA ADIÇÃO DE SURFACTINA**

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

APROVADA: 26 de julho de 2011.

Prof. Adriano Guimarães Parreira

Prof. Julio César Lima Neves
(Coorientador)

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

À minha mãe (in memoriam) e ao meu pai. Meus exemplos e meus maiores companheiros.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por sempre iluminar meu caminho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, pela orientação e confiança.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, pela co-orientação e sugestões apresentadas.

Ao professor Júlio César Lima Neves, pela co-orientação, por ter participado da banca de defesa desta dissertação, pela compreensão e disponibilidade.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pela co-orientação, apoio e conselhos.

Ao professor Adriano Guimarães Parreira, por ter aceito o convite para participar da banca de defesa desta dissertação.

Ao professor Juraci Alves de Oliveira pela colaboração ao longo de todo o experimento e por todo o suporte do Laboratório de Radioisótopos.

À minha irmã Rafaella, por ter tornado a jornada mais divertida e muito mais fácil, com suas temporadas em Viçosa.

Aos meus irmãos Hideky e Elaine, pela confiança depositada e por todo o carinho.

À Gabriela Ernesta Alberti, que me acompanha desde a graduação e esteve comigo em todos os momentos. Muito obrigado por dividir comigo esta nova etapa.

Aos amigos Péricles, Patrícia, Marcela, Marina, Aline, Karlos, Thyeli, Fernanda, Maike, Fábio, Rita, Gyseli, Lívia, Diana, Victor, Cássia e Luiza, por toda a ajuda, pela ótima convivência no laboratório, por todos os bons momentos que passamos e ainda passaremos.

Aos estagiários Francisko e Júlia, pela dedicação e contribuição a este trabalho.

Aos dois integrantes do “Trio Petro”, que acolheram da forma mais fraterna o “coleguinha” que veio de Cuiabá. Carla e Guilherme, vocês foram nesses 2 anos e sempre serão os maiores amigos que eu fiz em Viçosa, obrigado por terem me ensinado tanto e por tudo que são.

Aos amigos da república Pó de Café, por participarem do meu dia fazendo com que me sentisse em casa. Glauber, Caxambu (Flávio), Leônidas, Welton, Diego, Mateus e Dona Eva.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Microbiologia, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“A imaginação frequentemente nos leva a mundos que nunca existiram. Mas sem ela não podemos ir a lugar algum”.(Carl Sagan)

BIOGRAFIA

DANIEL KUMAZAWA MORAIS, filho de Vladimir Morais e Maria Edina Kumazawa Morais, nasceu em 10 de abril de 1987 em Sinop, Mato Grosso.

Em 12 de março de 2009 graduou-se no curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Mato Grosso.

Em agosto de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, na área de Microbiologia Ambiental, submetendo-se à defesa de dissertação em 26 de julho de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA).....	3
2.2. TOXICIDADE DOS HPA	4
2.3. CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR HPA.....	5
2.4. BIOSURFACTANTES E SEU USO NA BIORREMEDIAÇÃO	6
2.5. SURFACTINA	7
2.6. B-CICLODEXTRINA.....	8
2.7. BIODEGRADAÇÃO DE HPA.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. SOLO.....	11
3.2. PRODUÇÃO DE SURFACTINA.....	12
3.3. SOLUBILIDADE DE FENANTRENO EM MEIO LÍQUIDO ACRESCIDO DE SURFACTINA	12
3.4. DEGRADAÇÃO DO [¹⁴]FENANTRENO EM LATOSSOLO	13
3.4.1. APARATO RESPIROMÉTRICO.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1. SOLUBILIDADE DE FENANTRENO EM MEIO LÍQUIDO ACRESCIDO DE SURFACTINA	15
4.2. DEGRADAÇÃO DE ¹⁴ C- FENANTRENO EM SOLO	16
5. CONCLUSÕES	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

RESUMO

MORAIS, Daniel Kumazawa, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Degradação de fenantreno em latossolo: efeito da concentração do contaminante e da adição de surfactina.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Marisa Vieira de Queiroz, Arnaldo Chaer Borges e Julio César Lima Neves.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) são constituídos exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio e organizados sob forma linear, angular ou agrupada. Diversos HPA ao sofrerem ativação enzimática, tendem a ligar-se ao DNA, causando erros de replicação e mutações. Muitas dessas moléculas são reconhecidas como tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas. Os HPA são compostos recalcitrantes, em razão de sua baixa solubilidade em água e alta sorção ao solo. O uso de biossurfactantes é uma opção geralmente eficaz na remoção de contaminantes orgânicos hidrofóbicos de matrizes complexas, como o solo. A surfactina é um lipopeptídeo sintetizado por *Bacillus subtilis* e possui alta atividade de redução da tensão entre compostos hidrofóbicos e a água. Diferente de uma extração exaustiva, os biossurfactantes agem aumentando a biodisponibilidade do contaminante e facilitam a sua biodegradação. Neste trabalho, foi conduzido um experimento de biodegradação de fenantreno em latossolo argiloso, contaminado com ^{14}C -fenantreno e com 4 concentrações de ^{12}C -fenantreno (1, 10, 40 e 100 $\mu\text{g g}^{-1}$). A biodegradação foi avaliada com a adição dos suplementos surfactina (0,825 mg g^{-1}), extrato de levedura (1,0 mg g^{-1}) e de um inóculo (30 mg g^{-1}), obtido a partir da adição de óleo diesel a composto de resíduo sólido urbano, para enriquecimento de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos. Os frascos foram mantidos a 35 °C por 49 dias. O $^{14}\text{CO}_2$ produzido foi capturado em tubos de cintilação, contendo 2 mL de KOH (1 mol L^{-1}). Os frascos foram substituídos nos dias 8, 18, 25, 32, 37, 44 e 49. Após a troca do frasco no trigésimo segundo dia, foi feita uma segunda aplicação de surfactina (0,230 mg g^{-1}), em todos os tratamentos. A maior atividade de degradação foi alcançada nos primeiros 8 dias de incubação, somente nos tratamentos que receberam o inóculo. Após o oitavo dia, até a nova suplementação com surfactina (32° dia), o aumento da atividade não foi significativo em nenhum dos tratamentos. A atividade voltou a aumentar após a adição suplementar de surfactina, porém, em uma taxa inferior à alcançada nos primeiros 8 dias. Esse resultado foi atribuído à menor concentração da surfactina e a

efeitos de adsorção do fenantreno ao solo. Nas amostras com a maior concentração de fenantreno ($100 \mu\text{g g}^{-1}$) a atividade de degradação não diferiu em função dos tratamentos com e sem surfactina. Esse resultado sugere que a concentração do fenantreno biodisponível, nessa dose, se manteve suficientemente alta para sustentar a atividade de degradação. A suplementação com extrato de levedura resultou em menor atividade de degradação, nos tratamentos com 10, 40 e $100 \mu\text{g g}^{-1}$ de fenantreno. Nos tratamentos com a menor dose de fenantreno ($1 \mu\text{g g}^{-1}$), o extrato de levedura estimulou a degradação do contaminante. Conclui-se que a suplementação com extrato de levedura estimulou a degradação da surfactina, o que resultou em redução da degradação do fenantreno nas maiores concentrações do contaminante. Os resultados do trabalho indicam que a biorremediação de solos contaminados com HPA requer a manutenção de agentes solubilizadores, como a surfactina. Em razão da rápida degradação do biossurfactante no solo, sugere-se que a melhor estratégia seja a inoculação de micro-organismos produtores dessa classe de compostos e a manutenção de condições favoráveis a produção de biossurfactantes *in situ*, ao longo do processo de biorremediação.

ABSTRACT

MORAIS, Daniel Kumazawa, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2011. **Phenanthrene's degradation in latosol: effect of contaminant's concentration and the addition of surfactin.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Marisa Vieira de Queiroz, Arnaldo Chaer Borges and Julio César Lima Neves.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) consist exclusively of carbon and hydrogen atoms arranged in a linear, angular or clustered. Several PAH suffer enzymatic activation and tend to bind to DNA, causing mutations and replication errors. Many of these molecules are known to be toxic, mutagenic and carcinogenic. The PAH are recalcitrant compounds due to its low water solubility and high sorption to soil. The use of biosurfactants has been an option usually effective for removing hydrophobic organic contaminants in complex matrices such as soil. The surfactin is a lipopeptide synthesized by *Bacillus subtilis* and highly effective in reduction of tension between water and hydrophobic compounds. Unlike of an exhaustive extraction, the biosurfactants act by increasing the bioavailability of the contaminant and facilitates its degradation. In this work the experiment of phenanthrene biodegradation was conducted in clayed soils contaminated with ^{14}C -phenanthrene and 4 ^{12}C -phenanthrene concentrations (1, 10, 40 and 100 mg g^{-1}). Biodegradation was evaluated with the addition of supplements: surfactin (0.825 mg g^{-1}), yeast extract (1.0 mg g^{-1}) and an inoculum (30 mg g^{-1}) obtained from the addition of diesel to a compost made of the municipal solid waste, for enrichment of microorganisms degraders of hydrocarbons. The flasks were kept at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 49 days. The $^{14}\text{CO}_2$ produced was captured in scintillation vials containing 2 ml of KOH (1 mol L^{-1}). The bottles were changed on days 8, 18, 25, 32, 37, 44 and 49. After replacing the vials on the thirtieth-second day, was made a second application of surfactin (0.230 mg g^{-1}) in all treatments. The highest degradation activity was achieved in the first 8 days of incubation, only treatments that received the inoculum. After the eighth day until the new surfactin supplementation (32 days), increased activity was not significant in any of the treatments. The activity increased again after the addition of surfactin further, but at a lower rate than achieved in the first 8 days. This result was attributed to the lower concentration of surfactin and the effects of adsorption of phenanthrene to the soil. The degradation activity in samples with the highest concentration of phenanthrene (100 mg g^{-1}) did not differ in the treatments with and without surfactin. This result suggests that the concentration of bioavailable

phenanthrene on this dose remained high enough to sustain the activity of degradation. Supplementation with yeast extract resulted in a lower degradation activity in treatments with 10, 40 and 100 mg g⁻¹ of phenanthrene. In the treatments with the lowest dose of phenanthrene (1 mg g⁻¹), yeast extract stimulated the degradation of the contaminant. It is concluded that supplementation with yeast extract stimulated the degradation of surfactin, which resulted in reducing the degradation of phenanthrene in higher concentrations of the contaminant. The results of the work indicate that the bioremediation of soils contaminated with PAH requires the maintenance of solubilizing agents such as surfactin. Due to the rapid degradation of biosurfactant on the ground, it is suggested that the best strategy is to inoculate microorganisms producers of this class of compounds and the maintenance of favorable conditions to ensure the production of biosurfactants in situ, during the process of bioremediation.

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a contaminação ambiental por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) tem aumentado desde a publicação do trabalho de Morimura et al. (1964), em que os autores reportaram a toxicidade de diferentes HPA sobre células humanas.

Os combustíveis são considerados a maior fonte de contaminação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) por atividade antrópica. O volume total comercializado no Brasil em 2009 foi de 108 milhões de metros cúbicos, sem se considerar o combustível utilizado por embarcações e na aviação. Os HPA estão presentes no petróleo. São produzidos também durante a destilação fracionada e durante a queima em veículos automotivos. Os óleos derivados também possuem alta concentração de HPA após o refino e após a sua utilização como lubrificantes em motores. Estes fatores caracterizam os combustíveis e lubrificantes como grandes fontes de contaminação da atmosfera, do solo e das águas, em razão da deposição atmosférica e da contaminação direta (Haritash e Kaushik, 2009).

A capacidade de diferentes grupos de micro-organismos de degradar HPA tem sido reportada em diversos trabalhos (e.g. Habe e Omori, 2003; Kim et al., 2006; Guo et al., 2010). Os micro-organismos são caracterizados como os principais responsáveis pela eliminação de poluentes orgânicos no ambiente, em função de sua capacidade de biodegradação, que geralmente culmina com a mineralização e integração dos contaminantes orgânicos aos ciclos biogeoquímicos. O uso desses compostos como fonte de carbono e de energia pelos micro-organismos depende de diferentes fatores, como a estrutura da molécula do contaminante, de sua hidrofobicidade e da massa molecular. Características do ambiente também influenciam a degradação desses compostos, a saber: disponibilidade de nutrientes, de aceptores de elétrons, pH, concentração e biodisponibilidade do contaminante, histórico de contaminação da área, além da presença de micro-organismos autóctones capazes de degradar os compostos (Zhang et al, 2006; Miranda, 2008).

Para que os micro-organismos consigam utilizar os HPA como fonte de carbono e energia, é necessário que produzam enzimas responsáveis pela transformação dessas moléculas complexas em intermediários comuns de suas rotas metabólicas. Várias rotas de degradação de HPA já foram descritas em diferentes micro-organismos, sendo as mais bem caracterizadas as do metabolismo aeróbio encontradas em bactérias. A primeira reação é geralmente a oxigenação do HPA por uma dioxigenase hidroxilante de anéis aromáticos

(RHD) intracelular, que tem a função de reconhecer o HPA e adicionar dois átomos de oxigênio à molécula. Essa reação torna a molécula instável, como resultado da mudança da ressonância do anel (Habe e Omori, 2003; Bamforth e Singleton, 2005). A presença de enzimas RHD já foi constatada em muitas bactérias (Lloyd-Jones et al., 1999; Laurie e Lloyd-Jones, 2000; Khan et al., 2001; Kim et al., 2006), sendo que diferentes genes codificam enzimas similares em bactérias Gram positivas e Gram negativas. Essa diferença filogenética deve ser levada em consideração, ao se avaliar o potencial de degradação de HPA de uma determinada comunidade microbiana.

Os HPA são compostos bastante recalcitrantes, em razão de sua baixa solubilidade em água e alta sorção pelo solo. O uso de biossurfactantes é descrito na literatura como uma forma de se aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de contaminantes orgânicos hidrofóbicos, dadas a sua característica anfifílica, a capacidade de reduzir a tensão interfacial entre as moléculas do contaminante e a fase aquosa e de aumentar a emulsificação de hidrocarbonetos (Mulligan, 2005; Tecon e Van der Meer, 2010). A biodisponibilidade dos HPA tem sido avaliada por meio da porção disponível para degradação por micro-organismos, podendo ser mensurada pela fração biodegradada, pela expressão de genes responsáveis pelo catabolismo ou por meio de biorrepórteres (Sayler et al., 2001; Marlowe et al., 2002; Tecon e Van der Meer, 2010). A detecção e o monitoramento da expressão gênica de bactérias tem se tornado uma ferramenta importante para se compreender melhor a diversidade e o papel de muitas populações bacterianas em diferentes processos de importância ecológica e ambiental. Marlowe e colaboradores (2002) utilizaram a expressão do gene *nahAc* (gene responsável por codificar a subunidade α da RHD em *Pseudomonas*), durante a degradação de fenantreno na presença de diferentes surfactantes. Os autores constataram o aumento da expressão deste gene na presença dos surfactantes, o qual se relacionou com o aumento da solubilidade do fenantreno.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a cinética de degradação de fenantreno em solo argiloso, em diferentes concentrações, em resposta à adição de surfactina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)

Os HPA são hidrocarbonetos com dois ou mais anéis benzênicos fundidos (conjugados). São constituídos exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio e organizados sob forma linear, angular ou agrupada (figura 1). Dada a possibilidade de fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, há atualmente mais de 100 HPA reconhecidos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Apesar disso, somente 16 HPA são considerados prioritários em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica (figura 1) (Meire et al., 2007). Os HPA ocorrem como compostos sólidos incolores, branco-pálido ou amarelos, com baixa solubilidade em água, alto ponto de fusão e ebulição e baixa pressão de vapor. Com o aumento da massa molecular, sua solubilidade em água e a pressão de vapor diminuem, enquanto que os pontos de fusão e ebulição aumentam. Possuem características lipofílicas, sendo classificados como moderadamente a altamente lipossolúveis, e apresentam coeficientes de partição octanol-água ($\log K_{oa}$) que variam entre 3,37 e 6,75 (Meire et al., 2007; Haritash e Kaushik, 2009).

Os HPA podem ser classificados, quanto à origem, de três formas: petrogênicos, caracterizando os HPA presentes no petróleo; biogênicos, quando sintetizados por animais, plantas e micro-organismos; e pirogênicos, quando são formados durante a decomposição térmica de moléculas orgânicas, que sofrem processos subsequentes de recombinação (Wilcke et al., 2003).

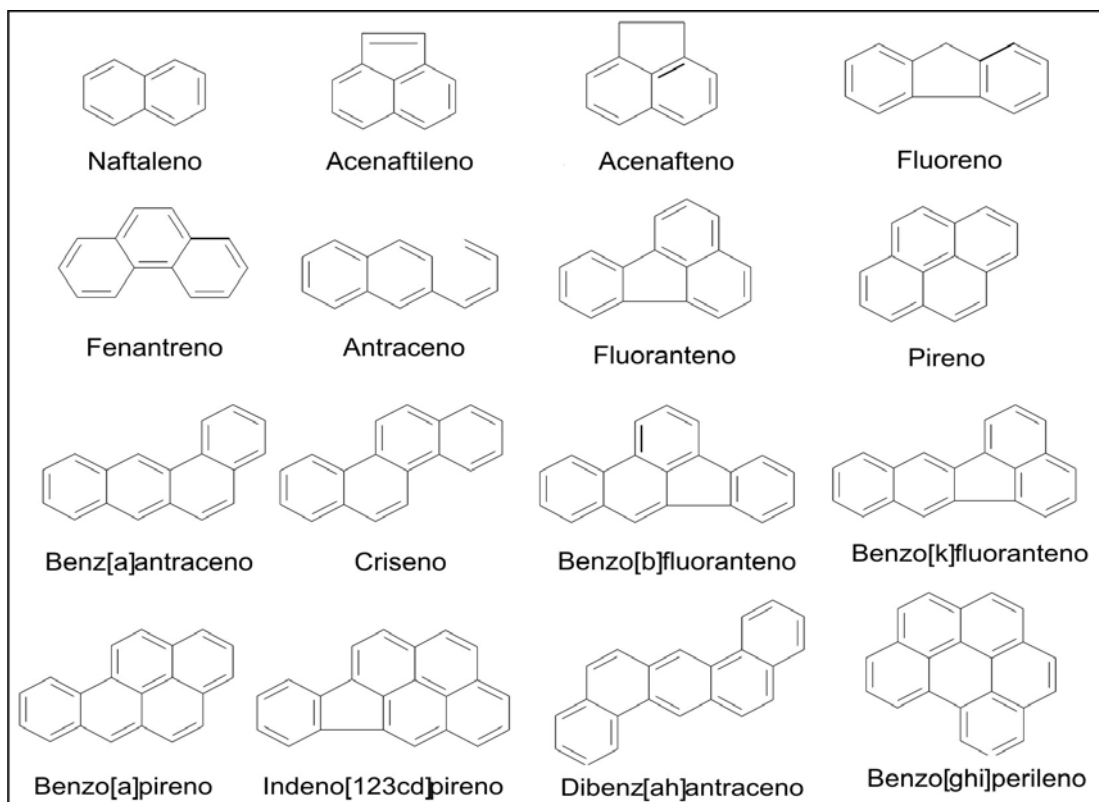


Figura 1- Estrutura química dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) considerados pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA) como prioritários em estudos ambientais (Meire et al., 2007).

As características lipossolúveis e a rápida absorção dos HPA pelo pulmão, pele e intestinos de animais experimentais, sugere que o tecido adiposo e diferentes glândulas, por suas características físicas e químicas, são depósitos em potencial de estocagem dos HPA. No entanto, o acúmulo de HPA nesses locais não é observado, fato atribuído à rápida degradação dos mesmos por processos metabólicos (Modica et al., 1983).

2.2. TOXICIDADE DOS HPA

Embora as células animais sejam capazes de metabolizar os HPA, estes são apenas parcialmente degradados, gerando, frequentemente, produtos ainda mais tóxicos que o próprio HPA. Os metabólitos formados a partir destes compostos tornam-se reativos a grupos nucleofílicos presentes em macromoléculas celulares, e sua carcinogenicidade é justificada pela formação de adutos de DNA, que podem originar erros de replicação e, conseqüentemente, dando origem a mutações, que em regiões específicas do DNA induzem o surgimento de tumores. Esses compostos são ativados pela enzima citocromoP450 que

catalisa a oxidação do HPA. Essa reação leva à formação de diol-epóxidos, que se ligam covalentemente a bases nitrogenadas da dupla fita do DNA. Esta é a reação mais aceita para bioativação de HPA, tendo como exemplo predominante o benzo(a)pireno-7,8-diol-9,10-epóxido, que possui alto poder de se ligar ao grupo 2-amino da guanina (figura 2) (Hall et al., 1989).

A maior tendência à carcinogenicidade do benzo(a)pireno-7,8-diol-9,10-epóxido é explicada pela teoria da região de baía (figura 2). A região de baía presente nessa molécula é uma região mais reativa e foi relacionada com a formação de câncer, pela primeira vez, quando observou-se uma redução acentuada na formação de tumores quando o HPA era aplicado em animais de laboratório contendo grupos alquil ou com um halogênio como substituintes na região de baía (Jerina et al. 1978).

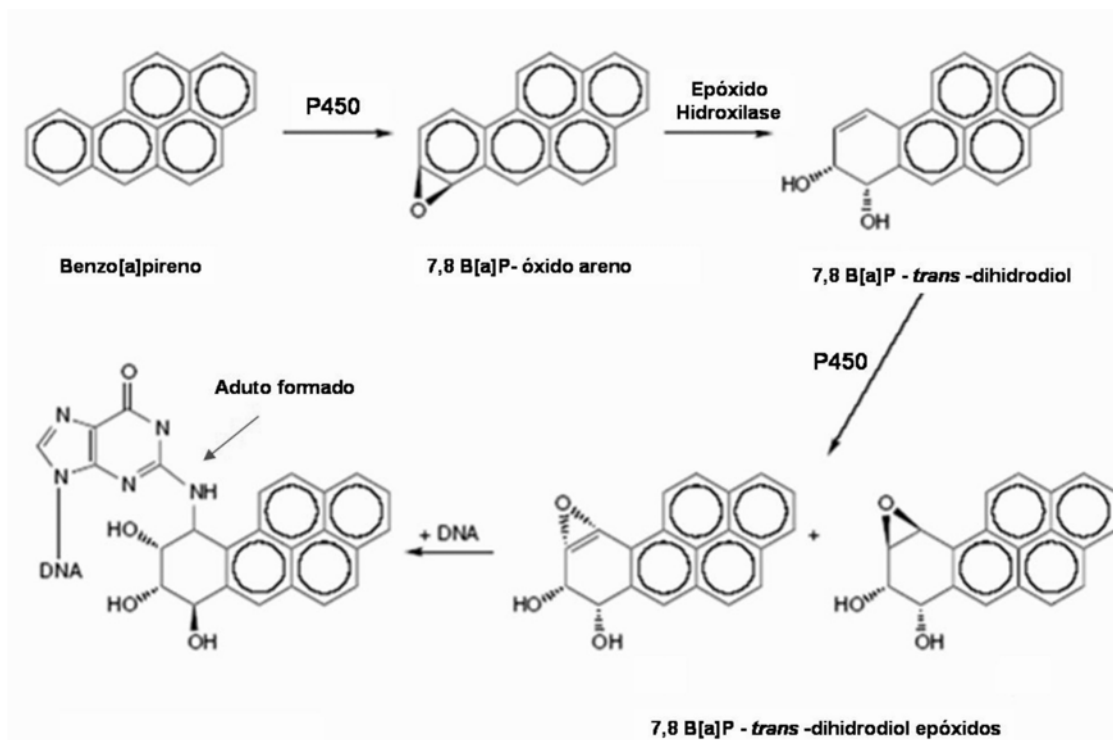


Figura 2. Formação de aduto de base após atividade do citocromo P450 sobre o benzo(a)pireno (Jerina et al. 1978).

2.3. CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR HPA

Todo material, ao entrar em contato com o solo, sofre interações de micro escala e macro escala. Interações de micro escala resultam na distribuição do contaminante no solo. O

contaminante pode estar distribuído na forma de gás nos interstícios do solo, dissolvido na água entre os poros ou em associação com partículas do solo, ou, ainda, na forma de produto livre. Na macro escala, o material pode ser transformado por processos bióticos ou abióticos e transportado através do solo. Pode, também, deixar o solo para entrar na atmosfera por volatilização, ou pode ser lixiviado e resultar em uma contaminação da água subterrânea.

A ampla distribuição dos HPA nos diferentes ambientes se deve às formas como são produzidos. Sua ubiquidade e alta toxicidade justificam esforços e pesquisas que têm por objetivo a eliminação destes compostos de ambientes contaminados. O solo é tido como o principal depósito dessas substâncias, em decorrência do acúmulo por deposição atmosférica, retenção dos HPA carreados pela água, contaminações acidentais e pelo descarte inadequado de rejeitos industriais (Miranda, 2008). A natureza das moléculas de HPA, que conferem elevada interação com moléculas orgânicas e partículas minerais do solo, além da baixa solubilidade em água, dificulta a sua utilização por micro-organismos e promovem o seu acúmulo na fase sólida do ambiente terrestre (Johnsen et al., 2005; Silva et al., 2009).

Para solucionar problemas de contaminação por HPA, podem ser utilizados métodos de tratamento convencionais baseados na remoção, degradação ou isolamento do poluente. Os métodos convencionais, além de caros, muitas vezes acabam apenas mudando o contaminante de ambiente. Uma alternativa para o tratamento de solos contaminados com HPA é a biorremediação, cujo foco é a transformação dos contaminantes. Por outro lado, a biorremediação é uma ferramenta capaz de transformar os compostos nocivos em formas menos tóxicas, com menor aporte de produtos químicos, energia e em menor tempo (Providenti et al., 1993; Ward et al., 2003).

2.4. BIOSURFACTANTES E SEU USO NA BIORREMEDIAÇÃO

No caso de solos e águas subterrâneas contaminadas por hidrocarbonetos, há cada vez maior interesse na utilização de biorremediação *in situ*. Porém, a biodegradação nesses ambientes pode não ocorrer como o esperado, por depender de diversos fatores como a disponibilidade de oxigênio, de nutrientes e a biodisponibilidade do poluente em questão, que, no caso dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, é geralmente baixa, em razão da sua baixa solubilidade em água (Jacques et al., 2007). Dessa maneira, tem-se pesquisado a alternativa de se adicionar ao material contaminado um agente que aumente a solubilidade dos contaminantes, incrementando sua biodisponibilidade para a biodegradação por micro-

organismos (Wang et al., 1998). Esses agentes podem ser sintéticos ou de origem biológica (biossurfactantes), que são compostos que possuem uma grande atividade emulsificadora e reduzem a tensão superficial da água e a tensão interfacial entre os compostos hidrofóbicos e a água (Rodrigues et al., 2006).

Os biossurfactantes, comparativamente aos surfactantes sintéticos, são mais eficientes em reduzir a tensão superficial e interfacial, além de possuírem uma maior biodegradabilidade e, assim, não causar impactos adicionais no meio ambiente (Ron e Rosenberg, 2002; Lima et al., 2011). Os biossurfactantes podem ser classificados em dois tipos: os de baixo peso molecular e os de alto peso molecular. Dentre os biossurfactantes de baixo peso molecular, incluem-se, por exemplo, os glicolipídeos, constituídos por carboidratos ligados a uma cadeia de ácido graxo alifático, e os lipopeptídeos (Banat, 1993). Como exemplo, pode-se citar o ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (Rodrigues et al., 2006) e a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis* (Mulligan, 2005). Os biossurfactantes com alto peso molecular são constituídos de polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou uma mistura complexa desses compostos (Banat, 1993).

2.5. SURFACTINA

A surfactina é um biossurfactante, produzido por várias cepas da espécie *Bacillus subtilis* a partir de compostos orgânicos. Sua isoforma mais comum é encontrada como um lipopeptídeo, composto por uma extremidade polar contendo 7 aminoácidos e uma porção composta por ácido graxo. Os aminoácidos podem variar dependendo da isoforma de surfactina produzida, assim como o tamanho da cadeia de ácido graxo. Essas variações dependem das condições de cultivo do micro-organismo e das fontes nutricionais utilizadas (Mulligan, 2005). As diferentes isoformas conferem a molécula variação na resistência a temperaturas elevadas, atividade superficial, quelação de metais, concentração micelar crítica (CMC) e atividade hemolítica.

É um biossurfactante bastante conhecido por reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m em concentrações inferiores a 50 µM. Apresenta valores de CMC menores que surfactantes sintéticos, por se tratar de um biossurfactante possui baixo custo de produção e alta biodegradabilidade, não se tornando um poluente (Barros et al., 2007; Lima et al., 2011).

2.6. B-CICLODEXTRINA

As ciclodextrinas (CD) são compostas por moléculas de D-glicopiranosose unidas de forma cíclica. O número de moléculas de glicose unidas – 6, 7 ou 8 - caracteriza as α -ciclodextrinas, β -ciclodextrinas (figura 3) e γ -ciclodextrinas. Por possuírem grupos hidroxila voltados para o lado externo da molécula e pela longa cadeia carbônica formada, as ciclodextrinas são bastante solúveis em água e possuem o interior da molécula apolar, o que facilita a formação de complexos de inclusão, aumentando a solubilidade de compostos apolares em água. Por uma via enzimática, podem-se adicionar grupos hidroxipropil ao centro das ciclodextrinas, aumentando a característica apolar dessa região, formando as hidroxipropil- β -ciclodextrinas, e assim aumentando a atividade solubilizadora dessas moléculas (Yang et al., 2008).

As ciclodextrinas são bastante empregadas no setor farmacêutico para aumentar a biodisponibilidade de certos medicamentos, aumentando a eficiência de doses menores. São utilizadas também na área de biorremediação, aumentando da mesma forma a biodisponibilidade de contaminantes orgânicos e facilitando sua degradação por microorganismos do ambiente. Podem ser utilizadas também para facilitar a remoção de contaminantes (Bardi et al., 2000; Papadopoulos et al., 2007).

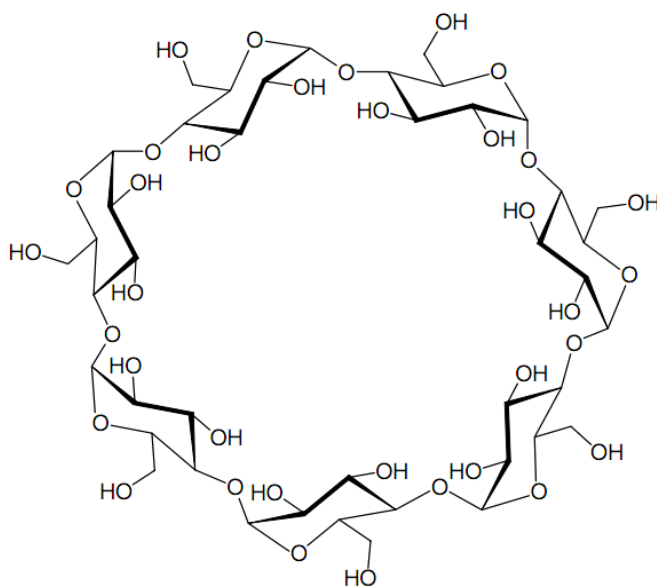


Figura 3 – Estrutura química da β -ciclodextrina.

2.7. BIODEGRADAÇÃO DE HPA

Diversos autores descrevem os micro-organismos como os principais responsáveis pela degradação dos HPA em solo, embora essas substâncias sejam também susceptíveis a processos como a fotólise e a degradação química em menor escala (Ambrosoli et al., 2005; Johnsen et al., 2005; Haritash e Kaushik, 2009). Sob condições aeróbias, a degradação bacteriana de HPA tem início com a adição de duas moléculas de oxigênio molecular a um dos anéis aromáticos pelo sistema enzimático de dioxigenases. Dioxigenases de anéis aromáticos (RHD) são enzimas multicomponentes que consistem de uma cadeia transportadora de elétrons contendo uma ferredoxina, uma redutase e uma dioxigenase terminal. A dioxigenase é composta por duas subunidades. A subunidade alfa é o componente catalítico e contém duas regiões conservadas: o centro Rieske [$\text{Fe}_2\text{-S}_2$] e o domínio catalítico mononuclear de ferro. O cluster Rieske recebe elétrons da ferredoxina e os transfere para o domínio mononuclear de ferro, para que então ocorra a catálise (Habe e Omori, 2003; Ni'Chadhain et al., 2006). A degradação dos HPA pode ocorrer também por uma via anaeróbia, em que uma das enzimas-chaves, responsável pela desestabilização do anel, é a benzilsuccinatosintase, que catalisa a adição de uma molécula de fumarato a uma molécula de benzeno, levando à formação de benzilsuccinato. Dessa forma, após uma série de reações de β -oxidação, o benzilsuccinato é transformado em benzil-CoA, que é o intermediário central na via anaeróbia de degradação dos hidrocarbonetos. A enzima benzilsuccinato sintase participa ainda no metabolismo anaeróbio de tolueno, xilenos, alquilnaftalenos e outros hidrocarbonetos aromáticos (Van Hamme et al., 2002).

Moody e colaboradores (2001) identificaram a rota metabólica utilizada por bactérias do gênero *Micobacterium* sp. isoladas de ambiente estuarino contaminado por óleo, para degradar fenantreno. Os isolados foram capazes de degradar 90% do fenantreno em meio de cultura, contendo $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, após 14 dias de incubação. Entre 4 e 8 horas de incubação foi identificada a formação de cis-3,4-dihidroxi-3,4-dihidroxifenantreno e cis-9,10-dihidroxi-9,10-dihidroxifenantreno. Esses metabólitos foram degradados completamente com 32 horas de incubação. Houve, também, a formação de ácido 2,2-difenílico com 8 horas, o qual foi degradado em 96 horas. Outros produtos da degradação dos anéis foram o ácido ftálico e o ácido 1-hidroxinaftol (figura 4).

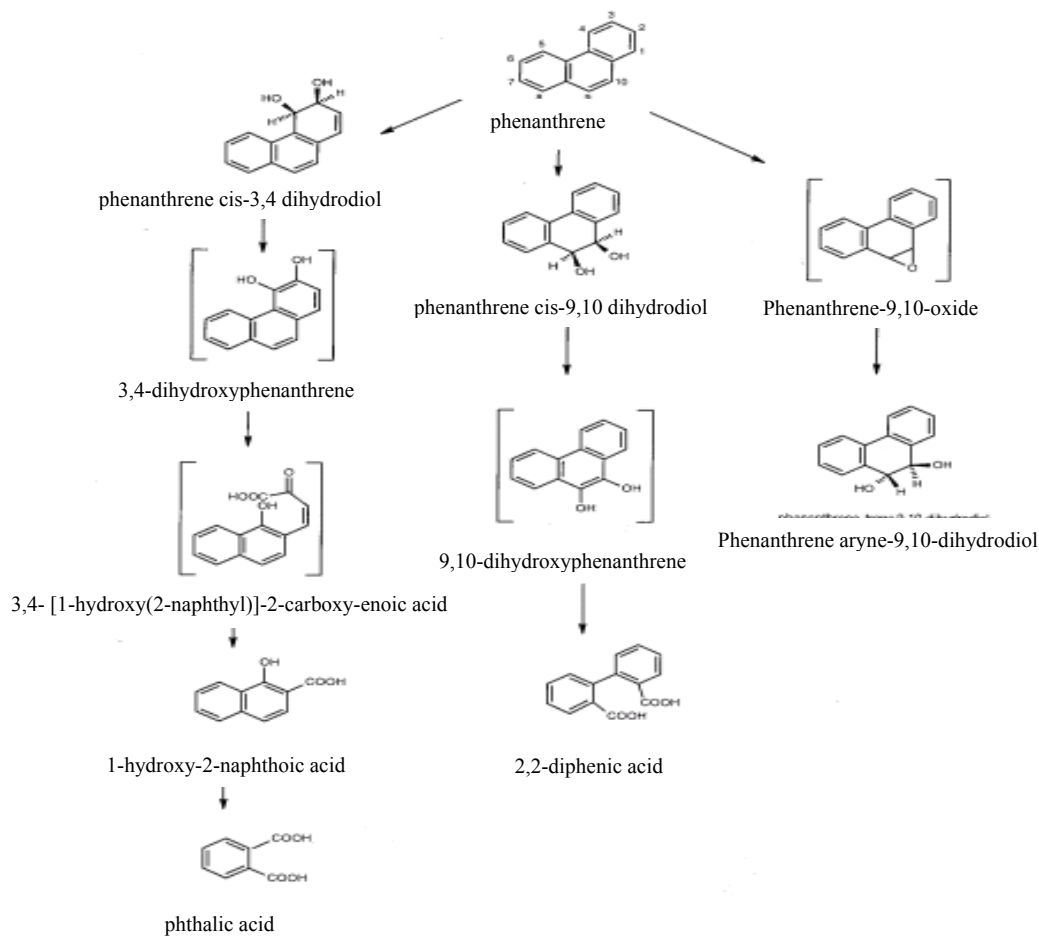


Figura 4 - Via metabólica de degradação de fenantreno (Moody et al., 2001).

Diferentes estudos sobre a degradação de HPA têm como foco os genes correspondentes à subunidade alfa de dioxigenases para diferentes HPA (PAH-RHD α). Os resultados desses estudos têm propiciado a avaliação da capacidade degradadora de diferentes espécies, assim como a elucidação de detalhes sobre as vias de degradação dos HPA. A dioxigenase para HPA mais estudada é a naftaleno 1,2 dioxigenase de *Pseudomonas putida*, em que a subunidade alfa é codificada pelo gene *nahAc* (Kauppi et al., 1998). Muitas bactérias Gram negativas possuem genes PAH-RHD α que codificam para enzimas similares, apesar de possuírem nomes diferentes em razão dos diferentes substratos envolvidos nos estudos. Desta forma, os genes *nahAc*, *nahA3*, *nagAc*, *ndoB*, *ndoC2*, *pahAc*, *pahA3*, *phnAc*, *phnA1*, *bphAc*, *bphA1*, *dntAc* e *arhA1* formam um grupo monofilético entre as Gram negativas. Dentre as bactérias Gram positivas, os genes que codificam as enzimas PAH-RHD são outros, a saber: *narAa*, *phdA*, *pdoA2*, *nidA*, *pdoA1*, *nidA3* e *fadA1* e *pdoB* (Habe e Omori, 2003; Guo et al., 2010).

Cébron e colaboradores (2008) desenvolveram dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores para quantificar os genes que codificam as enzimas PAH-RHD α de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Para isso, utilizaram a sequência de aminoácidos correspondente às enzimas de degradação descritas nos diferentes micro-organismos. Utilizando o *software* CODEHOP (Consensus DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer), os autores compararam as sequências de aminoácidos relacionadas às enzimas de degradação de HPA e encontraram regiões conservadas, com as quais definiram a sequência de uma série de oligonucleotídeos. A partir dessa informação, foram construídos os oligonucleotídeos degenerados. Os oligonucleotídeos degenerados CODEHOP possuem como alvo uma sequência de aminoácidos motivo em um bloco de aminoácidos conservado entre os membros de uma família de proteínas (Rose et al., 2003). Essa estratégia permite avaliar se uma comunidade microbiana possui capacidade potencial para degradar HPA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SOLO

Foi utilizado um Latossolo Vermelho-Amarelo argiloso distrófico, coletado de camada subsuperficial de 40 a 60 centímetros inserido em horizonte B de área militar no município de Viçosa, MG, denominado “Tiro de Guerra”, sob domínio de Mata Atlântica (Tabela 1).

Tabela 1 - Características químicas e físicas.

pH/H ₂ O	P	K	Na	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	MO	P-rem	Areia	Silte	Argila
	mg/dm ³			cmolc/dm ³				dag/kg	mg/L	%	%	%
5,05	1,5	5	-	0,15	0,02	0	2,21	0,9	4,9	9	4	74

A caracterização física e química foi realizada pelo Laboratório de Análises de Solo da Universidade Federal de Viçosa, segundo manual de métodos de análise de solo constantes em Embrapa (1997).

Foi realizada correção do pH do solo, com CaCO_3 e MgCO_3 (1:0,21 p/p). O solo recebeu também a aplicação de N, P e K, nas doses (mg dm^{-3}): 100, 150 e 120, nas formas de NH_4NO_3 , K_2HPO_4 e Na_2PO_4 . O teor de água foi mantido em 65% da capacidade máxima de retenção.

3.2. PRODUÇÃO DE SURFACTINA

Para produção de surfactina, foi utilizada a cepa de *Bacillus subtilis* LBBMA RI 4914 cultivada em meio mineral (MM) com a seguinte composição (g L^{-1}): Sacarose (20), K_2HPO_4 (13,9), KH_2PO_4 (2,7), EDTA (0,5), MgSO_4 (3,0), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5), NaCl (1,0), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,01), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01), NaSeO_4 (0,01), $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01), NiCl_2 (0,02).

O inóculo foi preparado inoculando-se uma colônia, obtida do cultivo em ágar nutriente por 24 horas a 30°C , em 50 mL de MM. O frasco (125 mL) foi incubado por 18 horas a 30°C e agitação de 200 rpm. A cultura foi inoculada (10 mL L^{-1}) em 1 litro do MM, contido em frasco erlenmeyer de 3 litros. A cultura foi incubada por 7 dias, a 30°C e agitação de 200 rpm.

Após o crescimento as células foram removidas por centrifugação a 4°C e 10.000 G por 15 minutos. O sobrenadante foi tratado com HCl até pH 2,0 e mantido a 4°C “overnight”. A solução foi novamente centrifugada por 15 minutos e o pélete dissolvido em solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O pH da solução foi então corrigido para 7,0 com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A atividade de surfactina nessa solução (200 mL) foi equivalente a $4,62 \text{ gL}^{-1}$.

3.3. SOLUBILIDADE DE FENANTRENO EM MEIO LÍQUIDO ACRESCIDO DE SURFACTINA

O efeito da surfactina sobre a solubilidade do fenantreno foi avaliado em meio líquido, e os resultados foram comparados aos obtidos com o agente solubilizador comercial β -ciclodextrina (CAVAMAX[®], W7)

O fenantreno foi dissolvido em acetona (50 mg L^{-1}) e adicionado (5 mL) a tubos de ensaio de borossilicato. Os tubos foram deixados em capela de exaustão, para evaporação da acetona. Em seguida, foram adicionados 10 mL de soluções de surfactina ou de β -ciclodextrina. As concentrações de surfactina foram definidas em relação à concentração

micelar crítica (CMC): 0,5x, 1x, 5x e 10x a CMC. As concentrações de β -ciclodextrina (solubilidade máxima em água a 22°C de 18g L⁻¹) foram de 1,8, 9, 18 e 27g L⁻¹. Os tubos foram deixados sob agitação de 100 rpm, durante 24 horas. Após centrifugação (12000 G, por 3 minutos), uma alíquota de 1 mL foi coletada, para análise da concentração de fenantreno, empregando-se cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Marlowe et al., 2002).

3.4. DEGRADAÇÃO DO [¹⁴]FENANTRENO EM LATOSSOLO

As unidades experimentais foram compostas de frascos de borossilicato de 100 mL, contendo 10 g de solo seco. O solo recebeu inóculo (30 mg g⁻¹) de composto de resíduo sólido urbano, previamente contaminado com óleo diesel (20 mL kg⁻¹) e incubado por 22 dias em temperatura ambiente. Os tratamentos consistiram da aplicação de ¹⁴C-fenantreno contendo 0,09 μ Ci, (200.000 contagens por minuto (CPM)) nas concentrações de 1, 10, 40 e 100 μ g g⁻¹ de ¹²C-fenantreno. Além do efeito da concentração de fenantreno, foi avaliado o efeito da suplementação do solo com extrato de levedura (1 mg g⁻¹) e com surfactina (0,825 mg g⁻¹) sobre a taxa de degradação do composto. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 4 x 4 (quatro concentrações de ¹⁴C-fenantreno e quatro suplementos), com 3 repetições. Os suplementos foram: (i) inóculo, surfactina e extrato de levedura; (ii) inóculo e extrato de levedura; (iii) inóculo e surfactina e (iv) surfactina e extrato de levedura.

3.4.1. APARATO RESPIROMÉTRICO

Os experimentos de degradação do [¹⁴C] fenantreno foram conduzidos em um sistema respirométrico semelhante ao utilizado por Reid e colaboradores (2001). O sistema é composto de um frasco de borossilicato de cerca de 150 mL, contendo um frasco de cintilação líquida para coleta do CO₂ por uma solução de KOH (2 mL, 1 mol L⁻¹) (Figura 5).



Figura 5 - Aparato respirométrico utilizado para avaliação da degradação do ^{14}C -fenantreno. Foram utilizados 10 gramas de solo seco, contaminado com ^{14}C -fenantrenonas concentrações de 1, 10, 40 e 100 $\mu\text{g g}^{-1}$. O $^{14}\text{CO}_2$ liberado foi capturado em 2 mL de uma solução de KOH a 1 mol L^{-1} , contida em um frasco de cintilação líquida.

Os frascos foram mantidos em câmaras B.O.D. a 35 °C por 49 dias e as armadilhas de CO_2 foram trocadas nos dias: 8, 18, 25, 32, 37, 44 e 49. Após a troca do tubo de cintilação no 32º dia, foi feita uma nova suplementação com 500 μL de surfactina a uma concentração de 4,62 g L^{-1} , equivalente a 0,23 mg g^{-1} de solo.

A radioatividade emitida pelo $^{14}\text{CO}_2$ contido nos frascos de cintilação foi avaliada em um contador de cintilação líquida (LS 6800, Beckman, EUA), após adição de 2 mL de coquetel de cintilação (PerkinElmer[®], UltimaGold[™]).

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) no arranjo de parcelas subdivididas, no delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições. Os 4 conjuntos de suplementos adicionados ao solo e as 4 concentrações de fenantreno, em arranjo fatorial, constituíram os tratamentos da parcela e as 7 épocas de avaliação constituíram as sub-parcelas. Para cada combinação “suplemento x concentração de fenantreno”, ajustaram-se equações de regressão linear simples para o $^{14}\text{CO}_2$ acumulado em função do tempo, sendo os coeficientes das equações testados com base no quadrado médio do resíduo da ANOVA pelo teste F até 10% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SOLUBILIDADE DE FENANTRENO EM MEIO LÍQUIDO ACRESCIDO DE SURFACTINA

A adição de surfactina ou de β -ciclodextrina resultou em aumento da solubilidade do fenantreno em água (figura 6). A concentração de fenantreno em água cresceu linearmente com o aumento da concentração de surfactina. A adição de β -ciclodextrina teve efeito similar.

A adição de β -ciclodextrina em concentração acima da correspondente à sua solubilidade máxima teve pouco efeito sobre a solubilidade do fenantreno, comparativamente ao valor obtido com a concentração de saturação. A concentração de fenantreno passou de $4\mu\text{g L}^{-1}$, para $180\mu\text{g L}^{-1}$, em presença de surfactina correspondente a 10 vezes a sua CMC (130 mg L^{-1}). Em presença de β -ciclodextrina (18 g L^{-1} , correspondente à solubilidade máxima a 22°C), a concentração de fenantreno chegou a $4,3\text{ mg L}^{-1}$.

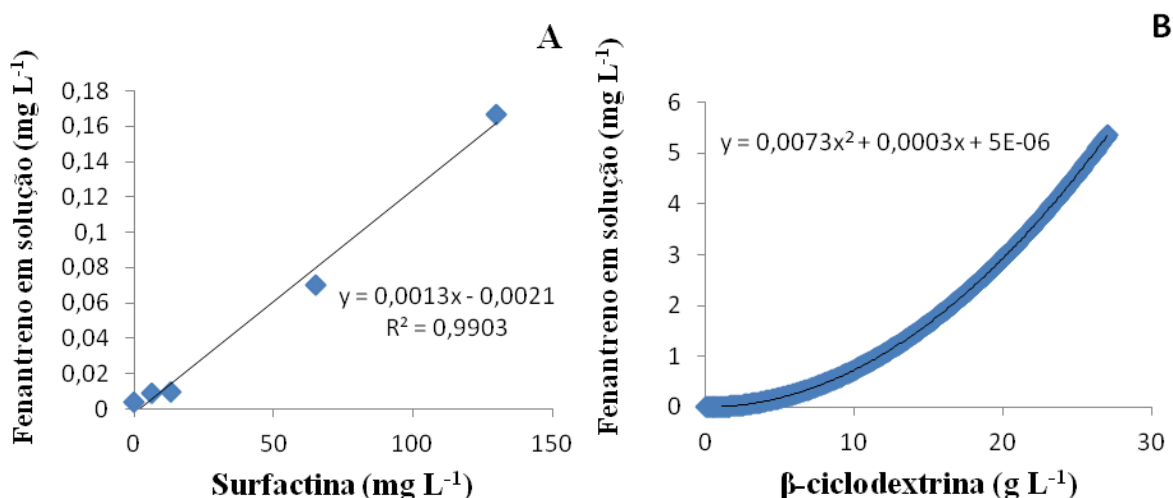


Figura 6 - Efeito da adição de surfactina (A) ou de β -ciclodextrina (B) sobre a solubilidade de fenantreno em água. O estudo foi conduzido em tubos de borossilicato, contendo $250\mu\text{g}$ de fenantreno. As soluções dos agentes solubilizadores (surfactina e β -ciclodextrina) foram adicionadas (10 mL) e os tubos foram mantidos em agitação (100 rpm) por 24 horas , antes da análise da concentração de fenantreno na fase aquosa.

Os dados obtidos foram utilizados para se calcular a concentração de surfactina na água adicionada ao solo ($3,3\text{ g L}^{-1}$), equivalente à concentração de saturação de β -ciclodextrina (18 g L^{-1}).

4.2. DEGRADAÇÃO DE ^{14}C - FENANTRENO EM SOLO

A maior atividade de degradação do fenantreno ocorreu nos oito primeiros dias de incubação (Figura 7, gráficos A, B e C.), em todos os tratamentos inoculados. No solo não-inoculado, a degradação foi praticamente nula (figura 7, D). A degradação nos demais tratamentos, entre o oitavo e o trigésimo segundo dia, não diferiu do tratamento não inoculado, indicando redução na biodisponibilidade do contaminante com o tempo de contato

com o solo. A baixa degradação do fenantreno no tratamento não inoculado, incluindo a avaliada nos primeiros oito dias, permite concluir que a microbiota autóctone desse solo não possui rotas de degradação do composto, resultado que sustenta a necessidade de inoculação de ambientes sem histórico de contaminação com HPA, em caso de acidentes envolvendo esse tipo de contaminante.

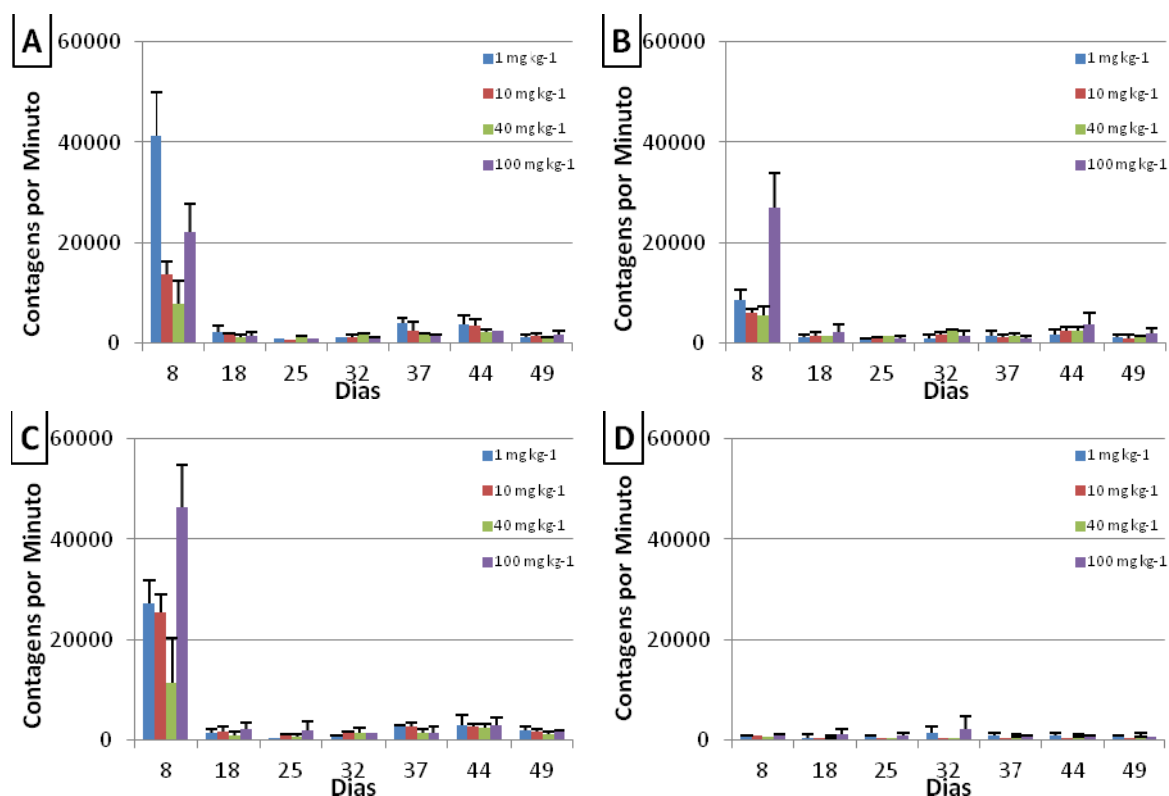


Figura 7 – Degradação de ^{14}C -fenantreno em um latossolo argiloso, em resposta aos tratamentos: A: Surfactina + Extrato de levedura + Inóculo; B: Inóculo + Extrato de levedura; C: Surfactina + Inóculo; D: Surfactina + Extrato de levedura. Surfactina: $0,825 \text{ mg g}^{-1}$; Inóculo: composto de resíduo sólido urbano enriquecido com micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos 30 mg g^{-1} ; extrato de levedura: 1 mg g^{-1} . O solo contaminado com diferentes concentrações de fenantreno foi incubado a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, no escuro, por 49 dias. A quantidade total de ^{14}C -fenantreno adicionada ao solo foi equivalente a $0,09 \text{ } \mu\text{Ci}$ (200.000 contagens por minuto (CPM)), nas 4 concentrações de fenantreno ($1, 10, 40$ e $100 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$).

Surfactina foi novamente adicionada ($0,230 \text{ mg g}^{-1}$) aos 32 dias de incubação, a todos os tratamentos.

Foram criados dois conjuntos de dados. Não houve diferença significativa entre os valores de $^{14}\text{CO}_2$ acumulado do oitavo ao trigésimo segundo dia, em quaisquer dos tratamentos. Portanto, a cinética de degradação do fenantreno, nessa fase, pode ser expressa como uma reta com inclinação igual a 0 (Figuras 8 a 10).

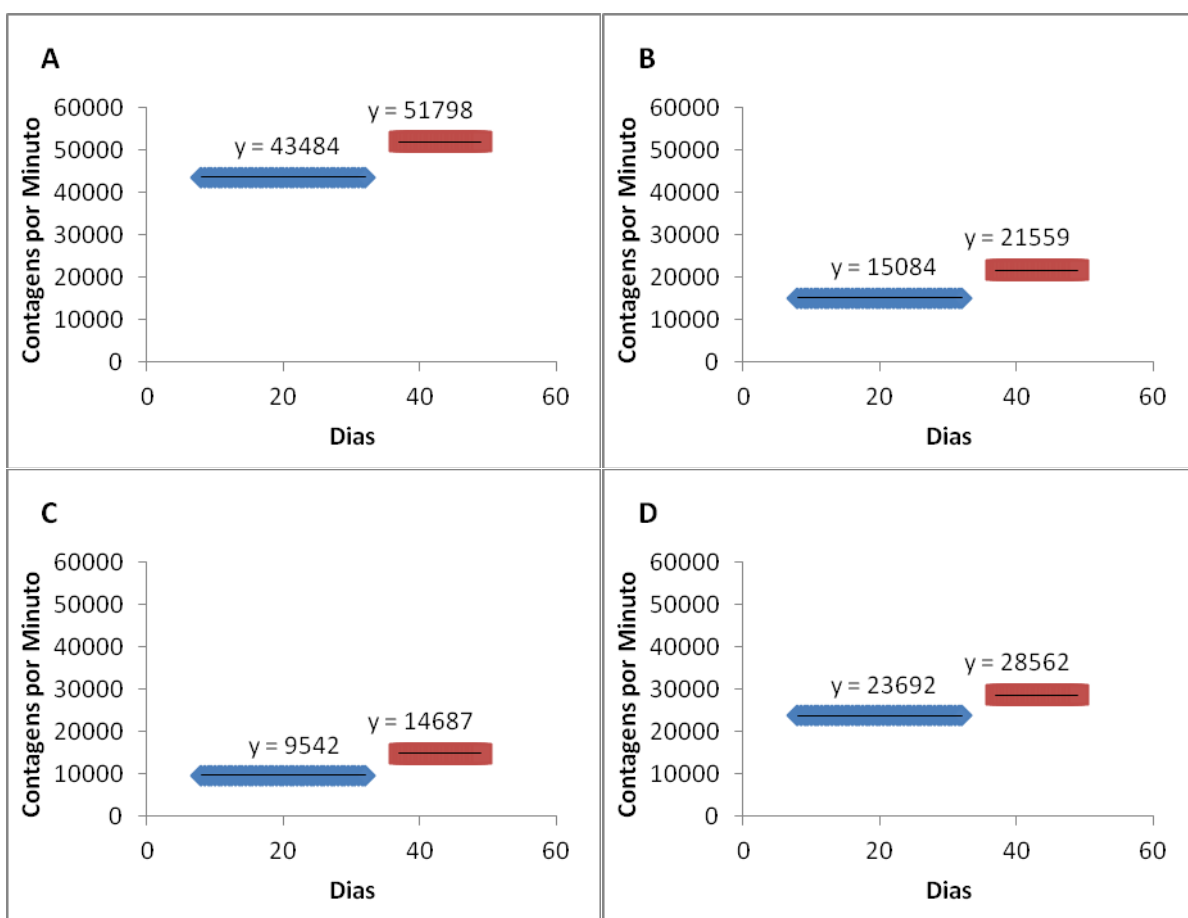


Figura 8 – Atividade de $^{14}\text{CO}_2$ proveniente de degradação de fenantreno em um latossolo antes (dias 8 a 32) e depois (dias 37 a 49) da segunda aplicação de surfactina ($0,230 \text{ mg g}^{-1}$). O solo (10 g) foi suplementado com surfactina ($0,825 \text{ mg g}^{-1}$), extrato de levedura (1 mg g^{-1}) e inoculado com composto de resíduo sólido urbano (30 mg g^{-1}) enriquecido com microorganismos degradadores de hidrocarbonetos. O solo foi incubado a 35°C , durante 49 dias. A quantidade total de ^{14}C -fenantreno adicionada ao solo foi equivalente a $0,09 \mu\text{Ci}$ (200.000 contagens por minuto (CPM)), nas concentrações de fenantreno $1, 10, 40$ e $100 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, gráficos A, B, C e D.

A nova aplicação de surfactina, aos 32 dias do início da incubação do solo, resultou em aumento significativo da cinética de degradação do fenantreno, em todos os tratamentos inoculados (Figuras 8 a 10). Não houve resposta à nova aplicação da surfactina no solo não-inoculado (Figura 11), reforçando a afirmação da ausência de vias de degradação de fenantreno na microbiota autóctone do solo utilizado.

Lima et al. (2011) estudaram a biodegradabilidade de biossurfactantes em solo argiloso. Constataram que aproximadamente 70% de um biossurfactante (lipopeptídeo) produzido por *Bacillus subtilis* foi degradado após sete dias de incubação. Os resultados deste trabalho, juntamente com os dados de degradação de biossurfactantes obtidos pelos autores citados, indicam que a surfactina adicionada no início do experimento (tratamentos A e C, figura 7) tenha sido degradada nos primeiros dias de incubação, reduzindo a biodisponibilidade do fenantreno e, conseqüentemente, a sua biodegradação entre o oitavo e o trigésimo segundo dia (Figura 7).

A atividade de biodegradação do fenantreno, após a segunda aplicação da surfactina, foi inferior à detectada nos primeiros oito dias de incubação (Figura 7 a 10). O resultado foi atribuído à menor quantidade de surfactina adicionada na segunda aplicação e ao comportamento do fenantreno em solo. Luthy et al. (2007) e Rhodes et al. (2010) descrevem que a dessorção de HPA em solos, após a aplicação de surfactantes sintéticos ou de biossurfactantes, apresenta um perfil bifásico, que consiste em uma fase rápida de dessorção, seguida de uma fase muito lenta de liberação. Este comportamento é característico em todos os tratamentos que receberam inoculação (Figura 7). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram ainda que a presença da surfactina na fase inicial de interação do fenantreno com o solo é capaz de manter uma elevada biodisponibilidade do contaminante, suficiente para garantir a rápida degradação do mesmo. Contudo, a aplicação do biossurfactante numa fase mais avançada da interação contaminante-solo tem pouco efeito sobre a biodisponibilidade do composto. O fenômeno de “envelhecimento” de contaminantes orgânicos em solos é bem relatado na literatura (Alexander, 1995; Hwang e Cutright, 2002; Ncibi e Mahjoub, 2007), embora o processo não seja completamente esclarecido. Aparentemente, com o aumento do tempo de contato, as moléculas de contaminantes hidrofóbicos sofrem o processo de difusão para micro e nanoporos do solo. Os processos de adsorção e dessorção de contaminantes no solo ocorrem segundo um perfil bifásico, de movimento inicial rápido de adsorção e um período longo de tempo, em que esse processo ocorre de maneira mais lenta. O mesmo ocorre no processo de dessorção (Alexander, 1995; Luthy et al., 2007; Rhodes et al., 2010). A rápida

adsorção ou dessorção inicial ocorre em razão da interação entre a superfície das partículas do solo e as moléculas do contaminante. As etapas de adsorção ou dessorção lenta dependem da difusão do contaminante para sítios mais profundos das partículas do solo. Os fenômenos lentos envolvem uma interação intra-partícula e dependem da rede de nanoporos do solo e da solubilidade do contaminante em água (Alexander, 1995). Portanto, a interação não se limita à superfície das partículas do solo. Após a adsorção inicial, o contaminante continua se difundindo para o interior das partículas e, com o passar do tempo, se torna ainda menos biodisponível (Alexander, 1995).

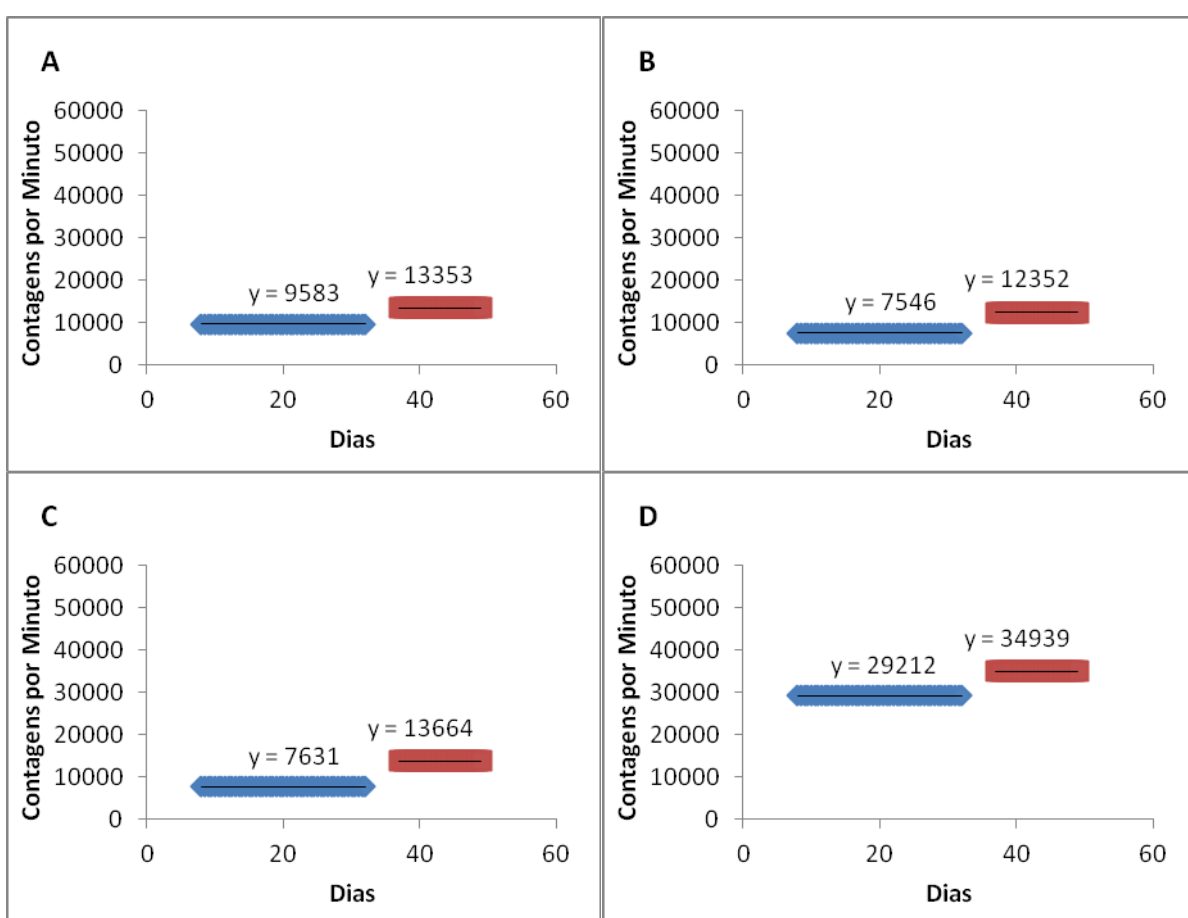


Figura 9- Atividade de $^{14}\text{CO}_2$ proveniente de degradação de fenantreno em um latossolo antes (dias 8 a 32) e depois (dias 37 a 49) da segunda aplicação de surfactina ($0,230 \text{ mg g}^{-1}$). O solo (10 g) foi suplementado com extrato de levedura (1 mg g^{-1}) e inoculado com composto de resíduo sólido urbano (30 mg g^{-1}) enriquecido com micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, e incubado a 35°C , durante 49 dias. A quantidade total de ^{14}C -fenantreno adicionada ao solo foi equivalente a $0,09 \mu\text{Ci}$ (200.000 contagens por minuto (CPM)), nas concentrações de fenantreno $1, 10, 40$ e $100 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, gráficos A, B, C e D.

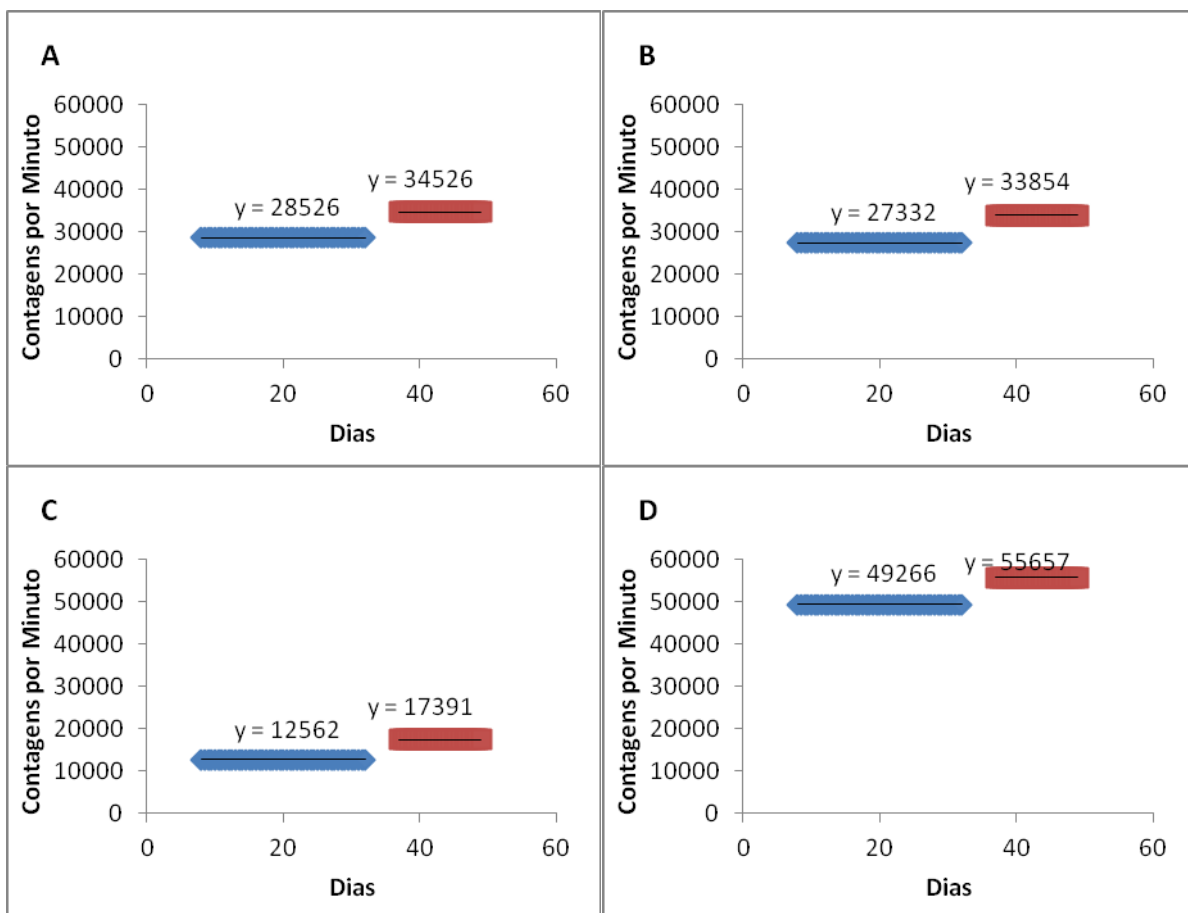


Figura 10 - Atividade de $^{14}\text{CO}_2$ proveniente de degradação de fenantreno em um latossolo antes (dias 8 a 32) e depois (dias 37 a 49) da segunda aplicação de surfactina ($0,230 \text{ mg g}^{-1}$). O solo (10 g) foi suplementado com surfactina ($0,825 \text{ mg g}^{-1}$) e inoculado com composto de resíduo sólido urbano (30 mg g^{-1}) enriquecido com micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, e incubado a 35°C , durante 49 dias. A quantidade total de ^{14}C -fenantreno adicionada ao solo foi equivalente a $0,09 \mu\text{Ci}$ (200.000 contagens por minuto (CPM)), nas concentrações de fenantreno $1, 10, 40$ e $100 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, gráficos A, B, C e D.

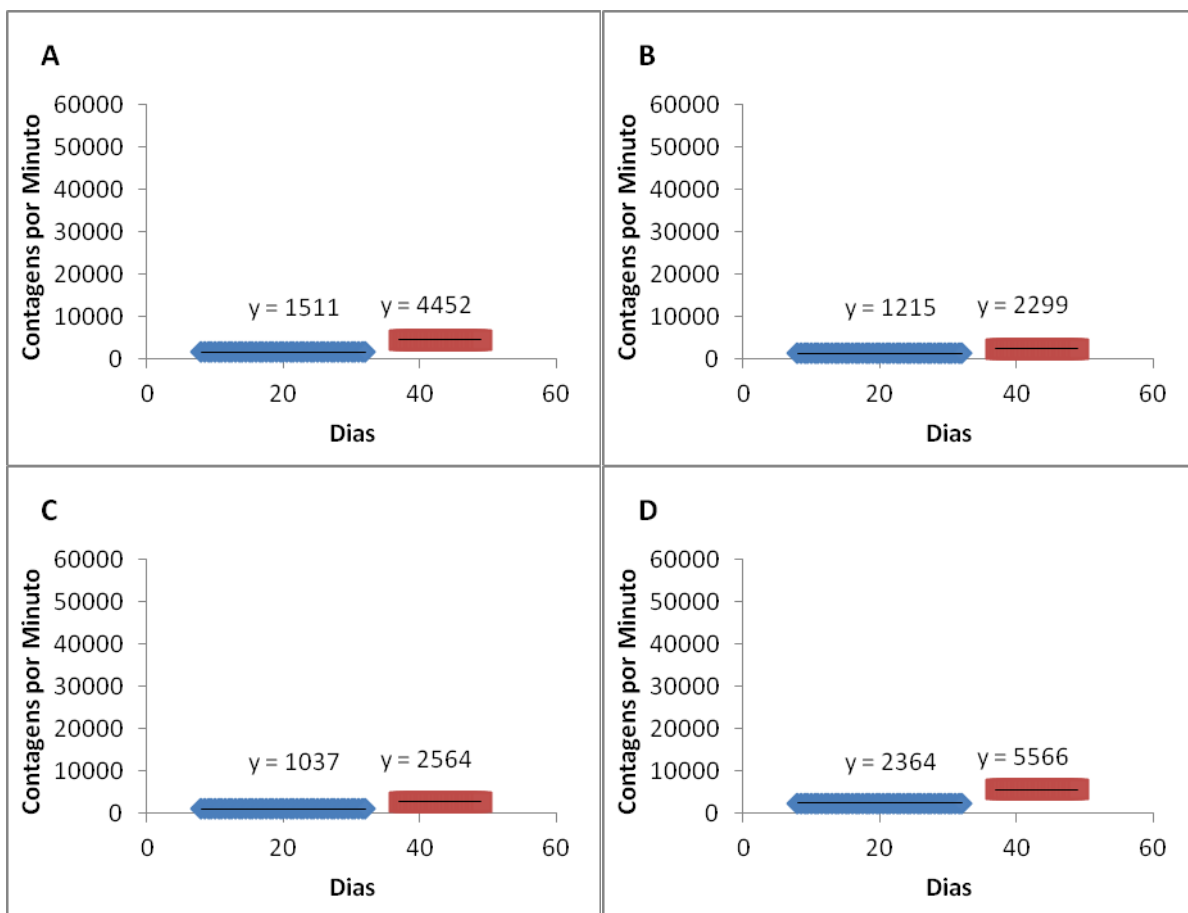


Figura 11 - Atividade de $^{14}\text{CO}_2$ proveniente de degradação de fenantreno em um latossolo antes (dias 8 a 32) e depois (dias 37 a 49) da segunda aplicação de surfactina ($0,230 \text{ mg g}^{-1}$). O solo (10 g) foi suplementado com surfactina ($0,825 \text{ mg g}^{-1}$) e extrato de levedura (1 mg g^{-1}) e incubado a 35°C , durante 49 dias. A quantidade total de ^{14}C -fenantreno adicionada ao solo foi equivalente a $0,09 \mu\text{Ci}$ (200.000 contagens por minuto (CPM)), nas 4 concentrações de fenantreno ($1, 10, 40$ e $100 \mu\text{g g}^{-1}$). Surfactina foi novamente adicionada ($0,230 \text{ mg g}^{-1}$) aos 32 dias de incubação.

Os maiores valores de $^{14}\text{CO}_2$ acumulado foram obtidos nos tratamentos inoculados em que houve adição de surfactina (tabela 2), nas duas menores concentrações de fenantreno avaliadas (1 e $10 \mu\text{g g}^{-1}$). Os resultados foram atribuídos ao aumento da solubilidade do fenantreno em presença do biossurfactante (Figura 5). Nas maiores concentrações de fenantreno (40 e $100 \mu\text{g g}^{-1}$), não houve efeito da adição da surfactina (Tabela 2).

O efeito do extrato de levedura foi dependente da concentração de fenantreno adicionado ao solo. Na menor concentração de fenantreno ($1 \mu\text{g g}^{-1}$), a adição do extrato de levedura estimulou a degradação do contaminante (tratamentos A vs C, Tabela 2). Nos tratamentos contendo maior concentração de fenantreno (10 e $100 \mu\text{g g}^{-1}$), a adição do extrato de levedura inibiu a degradação do fenantreno. A causa dessa inibição não é conhecida. Era

esperado efeito oposto, uma vez que o extrato de levedura, como fonte de vitaminas e de aminoácidos, é amplamente utilizado em meios de cultivo para estimular o crescimento microbiano. Herwijnen e colaboradores (2006) obtiveram de 96 a 100% de degradação de fenantreno em meio líquido, suplementando o meio de cultura com fontes de carbono prontamente utilizáveis, como extrato de levedura. Não há relatos sobre o efeito do extrato de levedura no aumento ou redução da biodisponibilidade de contaminantes hidrofóbicos em solos. A maior atividade de biodegradação obtida no tratamento sem extrato de levedura (tratamento C), nas maiores doses de fenantreno, pode indicar que a presença do extrato de levedura tenha acelerado a biodegradação da surfactina, com conseqüente redução da biodisponibilidade do fenantreno. Essa suposição é reforçada pela comparação da atividade de degradação do fenantreno nos tratamentos A e B, nas maiores doses do contaminante (40 e 100 $\mu\text{g g}^{-1}$). Esses tratamentos diferem quanto à presença (A) ou ausência (B) de surfactina, e a atividade de degradação não diferiu entre os mesmos (Tabela 2), indicando ter havido redução da concentração de surfactina no tratamento A. Esse efeito, nas menores doses (1 e 10 $\mu\text{g g}^{-1}$), não é observado, porque a concentração de surfactina remanescente (em A) parece ter sido suficiente para manter o ^{14}C -fenantreno biodisponível para biodegradação. Ressalta-se que a atividade de ^{14}C -fenantreno em todas as doses foi idêntica (0,09 μCi , ou 200.000 cpm), mas não a concentração total de fenantreno adicionado (1 a 100 $\mu\text{g g}^{-1}$). Ainda, comparando-se os tratamentos A e C, na menor dose de fenantreno (1 $\mu\text{g g}^{-1}$), observa-se maior atividade em A. O resultado se inverte a partir de 10 $\mu\text{g g}^{-1}$, indicando que, na menor dose, a concentração residual de surfactina foi ainda suficientemente alta para manter o ^{14}C -fenantreno biodisponível, uma vez que havia menor concentração de moléculas de ^{12}C -fenantreno para interagir com o biossurfactante. Com o aumento da dose de ^{12}C -fenantreno, sem alteração da quantidade de ^{14}C -fenantreno, essa concentração residual de surfactina no tratamento A, que recebeu extrato de levedura, foi saturada pelas moléculas de ^{12}C -fenantreno, com conseqüente redução da biodisponibilidade do ^{14}C -fenantreno. Disso se depreende que a adição de compostos, como o extrato de levedura, capazes de estimular o crescimento e a atividade catabólica de populações microbianas, pode ter efeito negativo sobre a biodegradação de contaminantes hidrofóbicos, no caso de também acelerarem a biodegradação de agentes solubilizadores, como os biossurfactantes. Os dados mostram a complexidade das interações entre os fatores do ambiente que determinam a atividade de comunidades microbianas do solo. Demonstra-se, também, a dificuldade de se estabelecer um procedimento padrão para a biorremediação de solos contaminados com essa classe de

contaminantes, em relação à escolha de aditivos que visem estimular a atividade de biodegradação.

Tabela 2 – Degradação de ^{14}C -fenantreno em solo argiloso, durante 32 dias de incubação, em presença do biossurfactante surfactina, inóculo e extrato de levedura

Tratamentos*	----- Concentração de fenantreno ($\mu\text{g g}^{-1}$) -----			
	1	10	40	100
	----- $^{14}\text{CO}_2$ (cpm) -----			
A	43.484 (± 12.158)	15.084 (± 2.539)	9.542 (± 4.246)	23.692 (± 9.564)
B	9.583 (± 2.504)	7.546 (± 2.653)	7.631 (± 1.910)	29.212 (± 6.991)
C	28.526 (± 5.240)	27.332 (± 6.365)	12.562 (± 4.482)	49.266 (± 9.166)
D	1.511 (± 620)	1.215 (± 383)	1.037 (± 363)	2.364 (± 850)

* A: Surfactina + Extrato de levedura + Inóculo; B: Inóculo + Extrato de levedura; C: Surfactina + Inóculo; D: Surfactina + Extrato de levedura. Surfactina: $0,825 \text{ mg g}^{-1}$; Inóculo: 30 mg g^{-1} ; extrato de levedura: 1 mg g^{-1} . Os dados representam a média da atividade acumulada emitida entre o oitavo e o trigésimo segundo dia de incubação. Os números entre parênteses representam o desvio-padrão da média de 3 repetições. A quantidade total de ^{14}C -fenantreno adicionada ao solo foi equivalente a $0,09 \mu\text{Ci}$ (200.000 contagens por minuto (CPM)), nas 4 concentrações de fenantreno ($1, 10, 40$ e $100 \mu\text{g g}^{-1}$).

Nos tratamentos que receberam o inóculo microbiano (A, B e C), houve redução da biodegradação com o aumento da concentração de fenantreno adicionado ao solo, até $40 \mu\text{g g}^{-1}$. Esse resultado poderia indicar um efeito inibitório do fenantreno, nas maiores concentrações, sobre as populações microbianas envolvidas em sua biodegradação. Todavia, isso não é sustentado pelo aumento da atividade de biodegradação verificada na maior dose do contaminante ($100 \mu\text{g g}^{-1}$). Especula-se que, na menor concentração ($1 \mu\text{g g}^{-1}$), as moléculas de fenantreno estavam mais biodisponíveis, possivelmente recobrando apenas as partículas de solo. Com o aumento da concentração (10 e $40 \mu\text{g g}^{-1}$), as moléculas de fenantreno, após saturarem os sítios de adsorção do solo, possivelmente passaram a formar camadas múltiplas, onde predominam as interações entre as moléculas do próprio contaminante. Esse tipo de interação é mais forte do que entre as moléculas de fenantreno e os sítios de adsorção do solo (Luthy et al, 2007 apud Guerin e Jones, 1988). A maior interação fenantreno-fenantreno causa redução da sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, da

biodegradação (Tabela 2). Na maior concentração de fenantreno ($100 \mu\text{g g}^{-1}$), houve aumento da degradação, em todos os tratamentos que receberam o inóculo (Tabela 2). O resultado indica que, nessa concentração, o efeito de partição do contaminante para a solução do solo foi suficiente para manter uma concentração capaz de promover uma alta degradação. Os resultados sustentam a importância dos fenômenos de sorção sobre a degradação de contaminantes em solos, conforme também discutido por Weber Jr. et al. (1999) e por Luthy et al. (2007).

5. CONCLUSÕES

A surfactina é mais eficiente do que a β -ciclodextrina em aumentar a solubilidade de fenantreno em água.

A presença de surfactina em solo estimula a biodegradação de fenantreno.

A suplementação do solo com extrato de levedura pode ter um efeito antagônico sobre a biorremediação mediada pela ação de um biossurfactante. A natureza orgânica e solúvel dos biossurfactantes os torna ao mesmo tempo bons solubilizadores e facilmente degradáveis pelos micro-organismos. Produtos que estimulam o crescimento microbiano podem acelerar a biodegradação dos biossurfactantes, reduzindo sua concentração e reduzindo ou anulando sua ação solubilizadora de contaminantes hidrofóbicos.

Em condições de alta concentração de fenantreno, a suplementação com surfactina não tem efeito significativo sobre a degradação de fenantreno.

A surfactina se mostrou um produto eficiente para aumentar a velocidade do processo de dessorção de contaminantes orgânicos hidrofóbicos do solo, estimulando sua biodegradação, quando associada a um inoculante enriquecido com populações microbianas aptas a degradarem essa classe de contaminantes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, M. How toxic are toxic chemicals in soil? **Environmental Science and Technology**, v. 29 n. 11 p. 2713-2717. 1995.

Ambrosoli, R. Petruzzelli, L, Minati, J. L. Marsan, F. A. Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions. **Chemosphere**, v. 60 n. 9 p. 1231–1236. 2005.

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

Banat, I. M.; The isolation of a thermophilic biosurfactant-producing *Bacillus* species. **Biotechnological Letters**, v. 6 n. 15 p. 591-594. 1993.

Bardi, L.; Mattei, A.; Steffan, S.; Marzona, M. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 27 p. 709-713. 2000.

Barros, F. F. C.; Quadros, C. P.; Maróstica, M. M. J.; Pastore, G. M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30 n. 2 p. 409-414. 2007.

Cébron, A.; Norini, M. P.; Beguiristain, T.; Leyval, C. Real-Time PCR quantification of HPA-ring hydroxylating dioxygenase (HPA-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 73 p. 148–159. 2008.

Guerin, W. F.; Jones, G. E. Two-stage mineralization of phenanthrene by estuarine enrichment cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54 n. 4 p. 929-936. 1988.

Guo, C.; Dang, Z.; Wong, Y.; Tam, N. F. Biodegradation ability and dioxygenase genes of PAH-degrading *Sphingomonas* and *Mycobacterium* strains isolated from mangrove sediments. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 64 n. 6 p. 1 - 8. 2010.

Habe, H.; Omori, T.; Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.67 p. 225-243. 2003.

Hall, M.; Forrester, L. M.; Parker, D. K.; Grover, P. L.; Wolf, C. R. Relative contribution of various forms of cytochrome P450 to the metabolism of benzo[a]pyrene by human liver microsomes. **Carcinogenesis**, v. 10 p. 1815-1821. 1989.

Haritash, A. K.; Kaushik, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169 p. 1-15. 2009.

Herwijnen, R. V.; Joffe, B.; Ryngaert, A.; Hausner, M.; Springael, D.; Govers, H. A. J.; Wuertz, S. Parsons, J. R. Effect of bioaugmentation and supplementary carbon sources on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a soil-derived culture. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 55 p. 122-135. 2006.

Hwang, S.; Cutright T. J. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. **Chemosphere**, v. 47 n. 9 p. 891-899. 2002.

Jacques, R. J. S.; Bento, F. M.; Antonioli, Z. I.; Camargo, F. A. de O. Biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37 n. 4 p. 1192-1201. 2007.

Jerina, D. M.; Thakker, D. R.; Yagi, H. Carcinogenicity of benzo(a)pyrene derivatives: the bay region theory. **Pure and Applied Chemistry**, v. 50 p. 1033-1044. 1978.

Johnsen, A. R.; Wick, L. Y.; Harms, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, v. 133 p. 71-84. 2005.

Kauppi, B.; Lee, K.; Carredano, E.; Parales, R.; Gibson, D.; Eklund, H.; Ramaswamy, S. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase naphthalene 1,2-dioxygenase. **Structure**, v. 6 p. 571-586. 1998.

Kim, S. J.; Kweon, O.; Freeman, J. P.; Jones, R. C.; Adjei, M. D.; Jhoo, J. W.; Edmondson, R. D.; Cerniglia, C. E. Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. **Applied Environmental Microbiology**. v. 72. p. 1045-1054. 2006.

Khan, A. A.; Wang, R. F.; Cao, W. W.; Doerge, D. R.; Wennerstrom, D.; Cerniglia, C. E. 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67 p. 3577-3585. 2001.

Laurie, A. D.; Lloyd-Jones, G. Quantification of phnAc and nahA contaminated New Zealand soils by competitive PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66 p. 1814-1817. 2000.

Lima, T. M. S.; Procópio, L. C.; Brandão, F. D.; Carvalho, A. M. X.; Tótola, M. R.; Borges, A. C. Biodegradability of bacterial surfactants. **Biodegradation**, v. 22 p. 585-592. 2011.

Lloyd-Jones, G.; Laurie, A.D.; Hunter, D.W.F. Fraser, R. Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29. p. 69-79. 1999.

Luthy, R. G.; Atkin, G. R.; Brusseau, M.; Cunningham, S. D.; Gschwend, P. M.; Pignatello, J. J.; Reinhard, M.; Traina, S. J.; Weber, W. J. J.; Westall, J. C.; Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. **Environmental Science and Technology**, v. 31 p. 3341-3347.

Marlowe, E. M.; Wang, J. M.; Pepper I. L.; Maier R. M. Application of a Reverse Transcription-PCR assay to monitor regulation of the catabolic *nahAc* gene during phenanthrene degradation. **Biodegradation**, v. 13p. 251–260. 2002.

Meire, R. O.; Azeredo, A.; Torres, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11 n. 2 p. 188-201. 2007.

MIRANDA, Vando José Medeiros. **Degradação de naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno em solos e sedimentos de ambientes costeiros, oceânicos e antárticos**. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2008. 53p.

Moody, J. D.; Freeman, J. P.; Dorege, D. R.; Carl, C. E. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Micobacterium* sp. strain PYR-1. **Applied and Environmental Microbiology**, abril, p. 1476-1483. 2001.

Modica, R.; Fiume, M.; Guaitani, A. & Bartosek, I. Comparative kinetics of benz(a)anthracene, chrysene and triphenylene in rats after oral administration. I. Study with single compounds. **Toxicology Letters**, v. 18.p. 103-109. 1983.

Morimura, Y.; Kotin, P.; Falk, H. L. Photodynamic toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in tissue culture. **Cancer Research**, v. 24 p. 1249-1256. 1964.

Mulligan, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133 p. 183–198. 2005.

Ncibi, M. C.; Mahjoub, B.; Gourdon, R. Effects of aging on the extractability of naphthalene and phenanthrene from Mediterranean soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 146 n. 1-2 p. 378-384. 2007.

Ni`Chadhain, S. N.; Sean N.; Pesce, K. V.; Kukor, J. J.; Zylstra, G. J. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72 p. 4078–4087. 2006.

Papadopoulos, A.; Reid, B. J.; Semple, K. T.; Prediction of microbial accessibility of Carbon-14-phenanthrene in soil in the presence o pyrene or benzo[a]pyrene using an aqueous cyclodextrin extraction technique. **Journal of Environmental Quality**, v. 36 p. 1385-1392. 2007.

Providenti, M. A.; Lee, H.; Trevors J. T. Selected factors limiting the microbialdegradation of recalcitrant compounds. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 12.p. 379–395. 1993.

Reid, J. B.; Macleod, J. A.C.; Lee, P. H.; Morris, A. W. J.; Stokes, J. D.; Semple, K. T. A simple ¹⁴C-respirometric method for assessing microbial catabolic potential and contaminant bioavailability. **FEMS Microbiology Letters**, v. 196 p. 141-146. 2001.

Rhodes, A. H.; McAllister, L. E.; Semple. K. T. Linking desorption kinetics to phenanthrene biodegradation in soil. **Environmental Pollution**, v. 158 p. 1348-1353. 2010.

Rodrigues, L.; Banat, I. M.; Teixeira, J.; Oliveira, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57 p. 609-618. 2006.

Ron, E. Z.; Rosenberg, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13 p. 249-252. 2002.

Rose, T. M.; Henikoff, G. J; Henikoff S. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. **Nucleic Acids Research**, v. 31 n. 13 p. 3763-3766. 2003.

Sayler, G. S.; Fleming, J. T.; Nivens, D. E. Gene expression monitoring in soils by mRNA analysis and gene lux fusions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12 p. 455–460. 2001.

Silva, I. S.; Grossman, M.; Durrant, L. R. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 63 n. 2 p. 224-229. 2009.

Tecon, R.; Van der Meer J. R. Effect of two types of biosurfactants on phenanthrene availability to the bacterial bioreporter *Burkholderia sartisoli* strain RP037. **Applied Microbial And Cell Physiology**, v. 85. p. 1131–1139. 2010.

Van Hamme, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Micobiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p 503-549. 2003.

Weber Jr. W. J.; Huang, W.; LeBoeuf, E. J. Geosorbent organic matter and its relationship to the binding and sequestration of organic contaminants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 151 p. 167-179. 1999.

Wang, J. M.; Marlowe, E. M.; Maier, M. M. R.; Brusseau, M. L. Cyclodextrin - enhanced biodegradation of phenanthrene. **Environment Science Technology**, v. 32 p. 1907-1912. 1998.

Ward, O.P.; Singh, A.; Van Hamme, J. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 30 p. 260-270. 2003.

Wilcke, W.; Amelung, W. Krauss, M.; Martius, C.; Bandeira, A. Garcia, M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) patterns in climatically different ecological zones of Brazil. **Organic Chemistry**, v. 34 p. 1407-1417. 2003.

Yang, J.; Cody, J. W.; Donald, A. G.; Felton, A. L. Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on transdermal penetration and photostability of avobenzone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69 p. 605-612. 2008.

Youssef, N. H.; Kathleen, E. D.; Nagle, D. P.; Savage, K. N.; Knapp, R. M.; McInerey, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactan production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56 p. 339-347. 2004.

Zhang X. X.; Cheng S.; Zhu C. J.; Sun, S. Microbial PAH-degradation in soil: degradation pathways and contributing factor. **Pedosphere**, v. 16.n. 5.p. 555-565. 2006.