

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Geociências e Ciências Exatas

Campus de Rio Claro

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO
DE SOLOS E DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS CONTAMINADOS
COM ÓLEO DIESEL**

Adriano Pinto Mariano

Orientador: Prof. Dr. Daniel Marcos Bonotto

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Dejanira de Franceschi de Angelis

Tese de Doutorado elaborada junto ao
Programa de Pós-Graduação em Geociências e
Meio Ambiente, para obtenção do Título de
Doutor em Geociências e Meio Ambiente.

Rio Claro (SP)
Dezembro/2006

551.49 Mariano, Adriano Pinto
M333a Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de
águas subterrâneas contaminados com óleo diesel / Adriano
Pinto Mariano. – Rio Claro : [s.n.], 2006
162 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Orientador: Daniel Marcos Bonotto

1. Águas subterrâneas. 2. Biorremediação. 3. Postos de
combustíveis. 4. Vinhaça. 5. Biossurfactante. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Comissão examinadora

Prof. Dr. Daniel Marcos Bonotto
Unesp/IGCE/Rio Claro

Prof. Dr. Carlos Renato Corso
Unesp/IB/Rio Claro

Prof. Dr. Bruno Coraucci Filho
Unicamp/FEC/Campinas

Prof.^a. Dr.^a. Cassiana Maria Reganhan Coneglian
Unicamp/Ceset/Limeira

Dr.^a. Aurora Mariana Garcia de França Souza
Cetesb/Piracicaba

Adriano Pinto Mariano

Rio Claro, 13 de Dezembro de 2006.

Resultado: Aprovado com Louvor

Ao meu pai

“La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. ¿Entonces para que sirve la utopía? Para eso, sirve para caminar”

(Eduardo Galeano)

“On ne voit bien qu'avec le coeur. L'essentiel est invisible pour les yeux”

(Saint-Exupéry)

“We live in a world where we have to hide in order to make love, while violence is practiced in broad daylight”

(John Lennon)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Daniel Marcos Bonotto por toda confiança depositada em mim em todas as etapas desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Dejanira de Franceschi de Angelis, não apenas pela orientação, mas também por todo seu carinho, apoio e oportunidades. Um exemplo a ser seguido.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE).

Ao Instituto de Biociências (IB) e ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, pela infraestrutura oferecida.

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos (PRH-05) da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, pela bolsa de estudos, por todo apoio financeiro e pelos cursos oferecidos.

Ao Prof. Dr. Dimas Dias Brito, coordenador do PRH-05, pela bolsa de estudos e confiança.

Aos membros das bancas de Exame de Qualificação (Dr. Luís Tadeu Furlan e Dr^a. Aurora Mariana G. de França Souza) e de defesa de Tese (Prof. Dr. Carlos Renato Corso, Prof. Dr. Bruno Coraucci Filho, Prof^a. Dr^a. Cassiana Maria R. Coneglian e Dr^a. Aurora Mariana G. de França Souza) pelas sugestões e correções.

À Geoinform – Pesquisas Geológicas S/C Ltda – e aos proprietários dos postos de combustíveis pelo acesso às áreas de estudo.

À Usina Santa Lucia pelo fornecimento de vinhaça.

À Petrobras pelo fornecimento de material biológico.

Ao Prof. Dr. Jonas Contiero pelo uso das instalações do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI).

À Dr^a. Ana Paula de A. G. Kataoka pelo material biológico.

Ao Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química da USP de São Carlos (IQSC) pelas análises cromatográficas.

À Bióloga Renata de Melo Peixoto pelas instruções relativas ao indicador DCPIP.

Aos professores Edério Dino Bidóia, José Carlos Marconato e Sandra Mara Martins Franchetti, pela oportunidade de trabalho como professor bolsista e pela orientação e ajuda.

Ao Bruce Tessari por sua ajuda nos trabalhos de campo e pela amizade.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Ângela (técnica), Inês, Maria Luiza, Beto, Ângela (secretária), Nega, Ronaldo, pela ajuda e amizade.

Ao Zito, pelas análises de toxicidade, dicas e amizade.

Ao José Maria Cazonatto, secretário do PRH-05, pela ajuda e amizade.

À Maria Paula, minha grande amiga, parceira de trabalho e congressos.

Ao amigo Sérgio Crivelaro pela ajuda e, claro, por sua amizade.

Aos bolsistas do PRH-05, companheiros de cursos, de congressos, de sala.

À Michely Perez pelo seu carinho e pela grande ajuda na coleta de solo.

Aos amigos Edi, Di, Allan e meu irmão, pelos momentos de descontração.

À Emma-Jane Toovey, fonte de inspiração no momento mais importante desse trabalho.

E por fim, mas o mais importante, à minha família, pelo apoio incondicional.

SUMÁRIO

Índice.....	i
Índice de Tabelas.....	iii
Índice de Figuras.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
1 – Introdução e Objetivos.....	1
2 - Revisão da Literatura.....	7
3 - Material e Métodos.....	45
4 - Resultados e Discussão.....	70
5 - Conclusões.....	123
6 - Referências Bibliográficas.....	125

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 – Introdução.....	1
1.2 – Objetivos.....	5
2 – REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 – Combustíveis derivados do petróleo	7
2.2 – Hidrocarbonetos como fonte de contaminação da subsuperfície.....	8
2.2.1 – Origens e conseqüências.....	8
2.2.2 – Dinâmica dos hidrocarbonetos em subsolo	10
2.3 – Técnicas de remediação aplicadas a áreas contaminadas.....	13
2.3.1 – Conceitos envolvidos na biorremediação.....	16
2.3.1.1 – Ação dos microrganismos.....	16
2.3.1.2 – Processos de biorremediação “in situ”.....	17
2.3.1.3 – Caracterização do local para implementação da biorremediação “in situ”.....	27
2.3.1.4 – Condições hidrogeológicas que influenciam a biorremediação	28
2.4 – Biodegradabilidade dos hidrocarbonetos BTEX.....	30
2.5 – Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos.....	34
2.6 – Métodos de avaliação da biodegradação em laboratório.....	38
2.7 – Processo de intemperização do óleo diesel.....	40
2.8 – Produção de biossurfactantes utilizando-se matérias primas alternativas.....	42
2.9 – Vinhaça.....	43
3 – MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 – Avaliação da biorremediação natural da água subterrânea no posto de combustíveis SB.....	45
3.1.1 – Descrição da área.....	45
3.1.2 – Amostragem de água subterrânea.....	47
3.1.3 – Análises físico-químicas.....	48
3.1.4 – Análises microbiológicas.....	49
3.2 – Amostragem de solo nos postos de combustíveis.....	50
3.2.1 – Postos de combustíveis ASP e SB.....	50
3.2.2 – Posto de combustíveis RC.....	50
3.3 – Análises realizadas nos solos.....	51
3.3.1 – Caracterização físico-química.....	51
3.3.2 – Análise cromatográfica.....	52
3.3.3 – Contagem de bactérias heterotróficas totais.....	52
3.4 – Respirimetria.....	52
3.5 – Avaliação de diferentes técnicas de biorremediação aplicadas ao solo ASP.....	55
3.5.1 – Preparo do inóculo.....	55
3.5.2 – Testes de toxicidade aguda.....	56
3.6 – Avaliação da técnica de bioaumentação aplicada a solos.....	56
3.6.1 – Microrganismos.....	58
3.6.2 – Preparo dos inóculos.....	58
3.7 – Avaliação do efeito da adição da vinhaça na biorremediação de solos e águas subterrâneas.....	59
3.7.1 – Caracterização da vinhaça.....	59
3.7.2 – Experimento respirométrico.....	59
3.7.3 – Experimentos com água subterrânea.....	60
3.8 – Comparação da biodegradabilidade de óleo diesel comercial e intemperizado.....	62

3.8.1 – Microrganismos.....	63
3.8.2 – Preparo dos inóculos.....	64
3.8.3 – Preparo do teste.....	65
3.8.4 – Experimento respirométrico.....	65
3.8.5 – Composição dos óleos diesel.....	66
3.9 – Produção de biossurfactante utilizando-se óleo diesel intemperizado.....	66
3.9.1 – Preparo dos inóculos.....	66
3.9.2 – Condições de cultivo.....	66
3.9.3 – Medidas de tensão superficial.....	67
3.9.4 – Verificação de bioemulsificadores.....	67
3.9.5 – Aplicação de ultrassom.....	68
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.1 – Avaliação da biorremediação natural da água subterrânea no posto de combustíveis SB.....	70
4.2 – Caracterização das amostras de solos.....	76
4.3 – Avaliação de diferentes técnicas de biorremediação aplicadas ao solo ASP.....	77
4.4 – Avaliação da técnica de bioaumento aplicada a solos.....	84
4.4.1 – Teste de biodegradabilidade do óleo diesel.....	84
4.4.2 – Experimentos respirométricos.....	85
4.5 – Avaliação do efeito da adição da vinhaça na biorremediação de solos e águas subterrâneas.....	100
4.5.1 – Experimento respirométrico.....	101
4.5.2 – Experimentos com água subterrânea.....	106
4.6 – Comparação da biodegradabilidade de óleo diesel comercial e intemperizado.....	110
4.6.1 – Composição dos óleos diesel.....	110
4.6.2 - Teste de biodegradabilidade: indicador redox DCPIP.....	114
4.6.3 – Experimento respirométrico.....	116
4.7 – Produção de biossurfactante utilizando-se óleo diesel intemperizado.....	120
5 – CONCLUSÕES.....	123
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Alguns exemplos de técnicas de remediação da zona não saturada.....	15
Tabela 2.2 – Alguns exemplos de técnicas de remediação da zona saturada.....	15
Tabela 3.1 – Experimento respirométrico. Condições experimentais geradas pelo Planejamento Fatorial Completo - 2 ³ . Tempo de incubação de 55 dias.	55
Tabela 3.2 – Experimento respirométrico: Parte 1 – solos ASP e SB. Tempo de incubação de 57 dias.....	56
Tabela 3.3 – Experimento respirométrico: Parte 2 – solo RC. Tempo de incubação de 92 dias.....	57
Tabela 3.4 – Experimento respirométrico: Parte 3 – solo ASP (bioaumento com o inóculo comercial EM). Tempo de incubação de 48 dias.	58
Tabela 3.5 – Experimento respirométrico: adição de vinhaça ao solo. Tempos de incubação de 48 dias (tratamentos 1 à 6) e 47 dias (tratamentos 7 à 10)	60
Tabela 3.6 – Experimento com água subterrânea simulando condição não aerada.....	61
Tabela 3.7 – Experimento com água subterrânea simulando condição aerada.....	62
Tabela 3.8 – Experimento respirométrico: Comparação da biodegradabilidade de óleo diesel comercial e intemperizado (ASP)	65
Tabela 3.9 – Resumo das condições experimentais (produção de biossurfactante).....	69
Tabela 4.1 – Parâmetros físicos e químicos avaliados nas amostras de água subterrânea coletadas entre Maio de 2004 e Abril de 2006.....	70
Tabela 4.2 – Concentração de BTEX nas amostras de água subterrânea coletadas entre Maio de 2004 e Abril de 2006.....	71
Tabela 4.3 – Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) nas amostras de água subterrânea coletadas em abril de 2006 nos poços de monitoramento SB1; SB2 e SB3.....	72
Tabela 4.4 – Caracterização das amostras de solos.....	77
Tabela 4.5 – Valores de pH e consumo de nitrogênio e fósforo no final do experimento respirométrico.....	83
Tabela 4.6 – Teste de toxicidade aguda empregando <i>Daphnia similis</i>	84
Tabela 4.7 – Teste de biodegradabilidade do óleo diesel usando o indicador DCPIP.....	85
Tabela 4.8 – Concentração de hidrocarbonetos nos solos ASP e SB.....	90
Tabela 4.9 – Concentração de hidrocarbonetos no início (1) e final (2) dos experimentos 1 ao 6. Valores entre parênteses indicam a eficiência de remoção (%).....	91
Tabela 4.10 – Concentração de hidrocarbonetos no início (1) e final (2) dos experimentos com o solo RC. Valores entre parênteses indicam a eficiência de remoção (%).....	95
Tabela 4.11 – Concentração de hidrocarbonetos no início (1) e final (2) dos experimentos com o solo ASP (parte – 3). Valores entre parênteses indicam a eficiência de remoção (%).....	99
Tabela 4.12 – Valores de pH, nitrogênio e fósforo nos experimentos respirométricos.....	100
Tabela 4.13 – Caracterização físico-química da vinhaça.....	100
Tabela 4.14 – Concentração de hidrocarbonetos no início (1) e final (2) dos experimentos. Valores entre parênteses indicam a eficiência de remoção (%).....	105
Tabela 4.15 – Valores de pH, e conteúdo de nitrogênio e potássio no experimento respirométrico.....	106
Tabela 4.16 – Experimento com a água subterrânea – condição não aerada.....	107
Tabela 4.17 – Experimento com a água subterrânea – condição não aerada – concentração de BTEX ($\mu\text{g.L}^{-1}$)..	108
Tabela 4.18 – Experimento com a água subterrânea – condição não aerada – concentração de HPA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)....	108
Tabela 4.19 – Experimento com a água subterrânea – condição aerada.....	109
Tabela 4.20 – Experimento com a água subterrânea – condição aerada – concentração de BTEX ($\mu\text{g.L}^{-1}$).....	109
Tabela 4.21 – Experimento com a água subterrânea – condição aerada – concentração de HPA ($\mu\text{g.L}^{-1}$).....	110
Tabela 4.22 – Concentração de BTEX nos óleos diesel.....	111
Tabela 4.23 – Concentração de HPA nos óleos diesel.....	112
Tabela 4.24 – Concentração de HTP nos óleos diesel.....	112
Tabela 4.25 – Teste de biodegradabilidade (DCPIP) em tubos de ensaio.....	115
Tabela 4.26 – Teste de biodegradabilidade (DCPIP) em frascos erlenmeyer	116
Tabela 4.27 – Concentração de hidrocarbonetos no início (1) e final (2) do experimento respirométrico 1. Valores entre parênteses indicam a eficiência de remoção (%).....	120
Tabela 4.28 – Medidas de tensão superficial.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Diferentes fases presentes na zonas insaturada e saturada do solo (Fonte: GUIGUER, 2000).....	11
Figura 2.2 – Evolução da contaminação por hidrocarbonetos de combustíveis em subsuperfície (Fonte: USEPA, 2003b)	13
Figura 3.1 – Mapa da área e localização dos poços de monitoramento (Posto SB).....	47
Figura 3.2 – Coleta de amostra de água subterrânea com amostrador <i>bailer</i> descartável (posto SB).....	48
Figura 3.3 – Realização da sondagem com trado rotativo manual (Posto SB).....	50
Figura 3.4 – Coleta de solo no posto RC.....	51
Figura 3.5 – Esquema de um respirômetro de Bartha e Pramer.....	53
Figura 3.6 – Respirômetros de Bartha e Pramer.....	53
Figura 3.7 – Experimento com água subterrânea (condição não aerada)	61
Figura 3.8 – Experimento com água subterrânea (condição aerada)	62
Figura 3.9 – Fase livre (óleo diesel) na água subterrânea do posto ASP.....	63
Figura 3.10 – Tensiômetro Krüss K6.....	67
Figura 4.1 – Diagrama de Piper efetuado a partir de dados obtidos com a coleta de amostras de água subterrânea realizada em Abril de 2005 (2ª coleta).....	73
Figura 4.2 – Contagem de bactérias heterotróficas totais nas amostras de água subterrânea coletadas entre Maio de 2004 e Abril de 2006.	75
Figura 4.3 – Produção acumulada de CO ₂ durante a incubação. Cada barra de erro representa 1 desvio padrão de três réplicas.....	77
Figura 4.4 – Produção diária de CO ₂ durante a incubação.....	77
Figura 4.5 – Eficiência de biodegradação os experimentos obtida através de dados respirométricos. Cada barra de erro representa 1 desvio padrão de três réplicas.....	79
Figura 4.6 – Diagrama de Pareto gerado a partir das condições experimentais.....	79
Figura 4.7 – Eficiência de remoção de hidrocarbonetos.....	82
Figura 4.8 – População de bactérias heterotróficas totais presentes no solo nos tempos inicial e final do experimento respirométrico.....	83
Figura 4.9 – Produção diária de CO ₂ durante a incubação dos tratamentos (ASP – parte 1)	86
Figura 4.10 – Produção acumulada de CO ₂ durante incubação dos tratamentos (ASP – parte 1). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.....	86
Figura 4.11 – Produção diária de CO ₂ durante a incubação dos tratamentos (SB – parte 1)	87
Figura 4.12 – Produção acumulada de CO ₂ durante incubação dos tratamentos (SB – parte 1). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.....	87
Figura 4.13 – Eficiência de biodegradação obtida com os dados respirométricos dos tratamentos (ASP – parte 1) Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.....	88
Figura 4.14 – Eficiência de biodegradação obtida com os dados respirométricos dos tratamentos (SB – parte 1) Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.....	89
Figura 4.15 – Análise cromatográfica (HTP) no tempo final dos tratamentos com os solos ASP (1 ao 3) e SB (4 ao 5). Fatores de diluição: 50x (1; 2 e 3); 20x (4 e 6); 10x (5).....	92
Figura 4.16 – Produção diária de CO ₂ durante a incubação dos tratamentos (RC – parte 2).....	93
Figura 4.17 – Produção acumulada de CO ₂ durante a incubação dos tratamentos (RC – parte 2). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.....	93
Figura 4.18 – Eficiência de biodegradação obtida com os dados respirométricos dos tratamentos (RC – parte 2). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.....	94
Figura 4.19 – Análise cromatográfica (HTP) nos tempos inicial e final dos tratamentos com o solo RC (8 ao 11). Fatores de diluição: 20x (inicial e 8); 10x (9 ao 12).....	95
Figura 4.20 – Produção diária de CO ₂ durante a incubação dos tratamentos (ASP – parte 3).....	97
Figura 4.21 – Produção acumulada de CO ₂ durante a incubação dos tratamentos (ASP – parte 3). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.....	97
Figura 4.22 – Eficiência de biodegradação obtida com os dados respirométricos dos tratamentos (ASP – parte 3). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.....	98
Figura 4.23 – Contagem de bactérias heterotróficas totais no início e final dos experimentos respirométricos... ..	98
Figura 4.24 – Análise cromatográfica (HTP) no início e final dos tratamentos com o solo ASP (13 e 14). Fatores de diluição: 10x (inicial); 1x (13 e 14).....	99
Figura 4.25 – Produção diária de CO ₂ durante incubação dos tratamentos 1 (solo RC) e 2 (solo RC + vinhaça)	102

Figura 4.26 – Produção diária de CO ₂ durante incubação dos tratamentos 3 (solo RC + óleo diesel intemperizado) e 4 (solo RC + óleo diesel intemperizado + vinhaça).....	102
Figura 4.27 – Produção diária de CO ₂ durante incubação dos tratamentos 5 (solo RC + óleo diesel comercial) e 6 (solo RC + óleo diesel comercial + vinhaça).....	103
Figura 4.28 – Produção diária de CO ₂ durante incubação dos tratamentos 7 (solo ASP) e 8 (solo ASP + vinhaça)	103
Figura 4.29 – Produção diária de CO ₂ durante incubação dos tratamentos 9 (solo SB) e 10 (solo SB+ vinhaça)	104
Figura 4.30 – Contagem de bactérias heterotróficas totais nos tempos inicial e final do experimento respirométrico.....	104
Figura 4.31 – Análise cromatográfica (BTEX) dos óleos diesel (a) comercial e (b) intemperizado. Fator de diluição: 1x.....	113
Figura 4.32 – Análise cromatográfica (HPA) dos óleos diesel (a) comercial e (b) intemperizado. Fator de diluição: respectivamente: 1x e 10x.....	113
Figura 4.33 – Análise cromatográfica (HTP) dos óleos diesel (a) comercial e (b) intemperizado. Fator de diluição: 50x.....	114
Figura 4.34 – Descoloração do indicador redox DCPIP durante teste de biodegradabilidade do óleo diesel comercial pela bactéria <i>P. aeruginosa</i> LBI (frasco 2). Frasco 1: controle do substrato (sem inóculo)	116
Figura 4.35 – Produção diária de CO ₂ durante a incubação (experimento 1).	117
Figura 4.36 – Produção acumulada de CO ₂ (experimento 1) durante a incubação. Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.....	118
Figura 4.37 – Produção diária de CO ₂ durante a incubação: 48 dias (experimento 1) e 92 dias (experimento 2)	118
Figura 4.38 – Produção acumulada de CO ₂ nos experimentos 1 (48 dias) e 2 (92 dias) durante incubação. Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.....	119
Figura 4.39 – Contagem de bactérias heterotróficas totais nos tempos inicial e final do experimento respirométrico 1.....	120

Resumo

Nesta pesquisa foram temas de estudo diversos aspectos relacionados à técnica de biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminados com hidrocarbonetos. A partir de amostras de solo e água subterrânea coletadas em diferentes postos de combustíveis, avaliou-se a biorremediação natural da água subterrânea em local onde ocorreu vazamento de óleo diesel, mediante o monitoramento de indicadores geoquímicos durante 2 anos. Diferentes técnicas de biorremediação (bioestimulação com a adição de nutrientes e de um surfactante e bioaumento (injeção de microrganismos)) foram comparadas quando aplicadas isoladas e em conjunto a solos contaminados com óleo diesel e comparou-se a capacidade de diferentes microrganismos em biodegradar óleo diesel comercial e intemperizado. Conciliando a biorremediação com a prática atual no gerenciamento ambiental de reutilização de resíduos, avaliou-se o efeito da adição da vinhaça na biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminados com óleo diesel e investigou-se a capacidade de diferentes culturas de bactérias em utilizarem óleo diesel intemperizado como matéria prima para produção de biosurfactante. O método respirométrico de Bartha e Pramer foi utilizado nos experimentos em que foi averiguada a biodegradação em solos e, no caso da água subterrânea, frascos de DBO e reatores aerados. Experimentos de biodegradabilidade dos óleos diesel foram realizados com a técnica do indicador redox DCPIP e o monitoramento da produção de biosurfactantes foi realizado com medidas de tensão superficial, segundo o método do anel de De Nöuy, empregando-se o tensiômetro Krüss K6. A partir do monitoramento dos indicadores geoquímicos, foi possível identificar fatores que corroboram a eficiência da técnica de biorremediação natural para o tratamento da água subterrânea na área de estudo. Os experimentos respirométricos demonstraram a importância do balanceamento nutricional e que nenhum ganho em termos de aumento de eficiência de biodegradação foi obtido com a técnica do bioaumento. O uso da vinhaça em processos de biorremediação mostrou-se ineficiente nas condições estudadas. Os resultados com os experimentos de biodegradabilidade demonstram a importância de se considerar o efeito de intemperização dos poluentes na determinação acurada de taxas de biodegradação. Finalmente, não foi possível, nas condições estudadas, constatar a produção de biosurfactantes utilizando-se óleo diesel intemperizado como matéria prima.

Palavras chaves: biorremediação, postos de combustíveis, óleo diesel, vinhaça, biosurfactante.

Abstract

In this research, different aspects related to the bioremediation technique of soils and groundwaters contaminated with hydrocarbons were considered. From soil and groundwater samples collected at different petrol stations, the natural bioremediation of the groundwater, where a diesel oil leakage took place, was evaluated by monitoring geochemical indicators for 2 years. Different bioremediation techniques (biostimulation with addition of nutrients and a surfactant and bioaugmentation (injection of microorganisms)) were compared when applied individually or grouped to contaminated soils with diesel oil and the capability of different microorganisms to biodegrade commercial and weathered diesel oil was compared. Considering the current environmental management practice of reusing residues, the effects of the vinasse in the bioremediation of soils and groundwaters contaminated with diesel oil was evaluated and the capability of different bacterial cultures to use weathered diesel oil as raw material to produce biosurfactant was investigated. The Bartha & Pramer respirometric method was employed in the biodegradation experiments with soils, and, in the case of the groundwater, BOD flasks and aerated reactors. The experiments testing the biodegradability of diesel oils were carried out using the DCPIP redox indicator technique and the monitoring of the biosurfactant production by superficial tension measurements, according to the De Nöuy ring method, and employing the Krüss K6 tensiometer. From the monitoring of the geochemical indicators, it was possible to identify factors that support the efficiency of the natural bioremediation technique for the treatment of the groundwater at the area of study. The respirometric experiments demonstrated the importance of the soil nutritional balance and that no gain in terms of increasing the biodegradation efficiency was obtained with the bioaugmentation technique. The use of the vinasse in bioremediation processes showed to be inefficient at the studied conditions. The results from the biodegradability experiments demonstrate the importance of considering the weathering effect of the pollutants to determine accurately the biodegradation rates. Finally, it was not possible, at the studied conditions, verify the biosurfactant production using weathered diesel oil as raw material.

Key words: Bioremediation, petrol stations, diesel oil, vinasse, biosurfactant

1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 - Introdução

A forte industrialização e o desenvolvimento econômico experimentados pelo Brasil principalmente a partir da década de 70, exigiram grande estruturação de toda a cadeia produtiva dos derivados do petróleo, desde novas descobertas de campos de petróleo passando pela formação de vários pólos petroquímicos e o aumento das redes de distribuição, a ponta dessa cadeia. Em 2004, segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2005), no Brasil existiam 13 refinarias, 48 terminais aquaviários e 26 terminais terrestres, 485 bases de distribuição, 179 distribuidoras, 33.620 postos de revenda e uma comercialização de aproximadamente 230 mil m³/dia dos principais derivados de petróleo.

Diante de toda essa estrutura logística da produção e comercialização do petróleo e de seus derivados, as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas, principalmente por vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneos em postos de combustíveis, vêm crescendo. Segundo o órgão de controle ambiental paulista, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), em 2005 os vazamentos em postos de combustíveis foram responsáveis por 73 % dos casos de áreas contaminadas no Estado de São Paulo, o que corresponde a 1596 áreas (CETESB, 2006).

Devido ao crescente número de descobertas de casos de vazamentos em postos de combustíveis, as contaminações de solos por hidrocarbonetos derivados de petróleo têm sido alvo de inúmeras pesquisas e constitui um desafio para os profissionais que atuam no saneamento ambiental, em função da complexidade dos fenômenos geoquímicos e bioquímicos que são catalisados a partir de sua inserção no subsolo. Além disso, tem sido

motivo de preocupação e repercussão na sociedade, pois essas contaminações com substâncias tóxicas podem atingir as águas subterrâneas, que estão sendo ou serão usadas como fonte de abastecimento para consumo humano.

Quando o combustível atinge o solo, seus componentes separam-se em três fases: dissolvida, líquida e gasosa. Uma pequena fração dos componentes da mistura se dissolve na água do lençol freático, uma segunda porção é retida nos espaços porosos do solo na sua forma líquida pura como saturação residual e outra parte dos contaminantes passíveis de evaporação dão origem à contaminação atmosférica (NADIM et al., 1999). Portanto, uma vez estabelecida a contaminação, esta poderá atuar em três níveis diferentes: solo, água subterrânea e atmosfera. Assim, a tarefa de avaliação da extensão, dinâmica, concentração das contaminações, análise de riscos e possíveis estratégias de remediação torna-se complexa.

Essa complexidade também se deve ao fato desses contaminantes representarem uma ampla composição de produtos com propriedades diferentes, sendo que a maioria caracteriza-se pela baixa solubilidade e relativa pouca persistência no solo. No caso de combustíveis como a gasolina e o óleo diesel, os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, chamados coletivamente como compostos BTEX, são os constituintes que têm maior solubilidade em água e, portanto, são os contaminantes com maior potencial de poluir o lençol freático. Dentre os BTEX, o benzeno é considerado o mais tóxico. Para o benzeno, o padrão de potabilidade para água de abastecimento público é de 5 µg/l (BRASIL, LEIS, etc., 2004). Este produto em exposições crônicas pode causar leucopenia, câncer, vertigens, tremores e afetar o sistema nervoso central (PENNER, 2000).

A interação dos hidrocarbonetos com o fluxo freático, com os argilo-minerais e com a matéria orgânica presentes no solo é complexa do ponto de vista físico e químico. Mais ainda, sendo produtos orgânicos de possível conversão, as ações biológicas que se deflagram no terreno a partir da sua presença são significativas e alteram o comportamento dos contaminantes ao longo do tempo. Assim, aos profissionais que se apresentam para investigar uma contaminação por hidrocarbonetos com essas características e a partir dessas análises proporem e executarem uma estratégia de remediação eficaz, impõe-se um desafio que transcende a especialidade do geotécnico ou do geólogo. O problema, tratado na sua escala devida, é tipicamente multidisciplinar e exige o domínio dos processos químicos e biológicos que estão inerentemente associados (AZAMBUJA et al., 2000).

Diante desse cenário, atualmente inúmeras pesquisas relacionadas à remediação de áreas atingidas por hidrocarbonetos são realizadas com a finalidade de restaurar a qualidade

dos solos e das águas subterrâneas contaminadas. Vários métodos podem ser empregados para remover hidrocarbonetos do solo e água subterrânea tais como extração de vapor do solo, bombeamento e biorremediação. Não há uma regra geral que determine o melhor tratamento de uma área contaminada específica. Cada caso deve ser analisado individualmente, avaliando suas particularidades.

Tratamentos físicos separam os contaminantes do solo sem destruí-los ou modificá-los quimicamente, mas apresentam muitas limitações, destacando-se o custo alto. Quando os hidrocarbonetos percolam o solo, grande quantidade permanece sorvida na matriz (aproximadamente 50%) com isso diminuindo a eficiência de remoção. Processos biológicos, por outro lado, são uma tecnologia promissora para remover esses contaminantes principalmente devido à simplicidade e eficiência de custo quando comparados a outras alternativas (ALEXANDER, 1994).

Biorremediação pode ser considerada como uma nova tecnologia para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos. Estratégias de biorremediação incluem: a utilização de microrganismos autóctones, ou seja, do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (biorremediação intrínseca ou natural); a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação); e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) (BENTO et al., 2003). O benefício desses processos é a mineralização do poluente, isto é, a transformação em gás carbônico, água e biomassa.

Recentemente, o interesse em utilizar a estratégia da atenuação natural monitorada (que inclui além da biodegradação outros processos como advecção, diluição, dispersão, sorção e volatilização) como técnica de tratamento de águas subterrâneas contaminadas com hidrocarbonetos é crescente em oposição a técnicas ativas de engenharia como a tecnologia de bombeamento e tratamento (*pump-and-treat*) (WALT e McNAB Jr., 1999). A biorremediação natural mostra-se interessante devido principalmente aos baixos custos, por ser uma técnica com mínima intervenção (BHUPATHIRAJU et al., 2002).

A verificação da ocorrência da biorremediação natural exige a caracterização da geologia, hidrologia e ecologia microbiana locais, e também o conhecimento de processos biogeoquímicos. Para a biodegradação dos hidrocarbonetos é essencial uma reação de oxirredução, em que o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétron) e um aceptor de elétron é reduzido. Existem diferentes compostos que podem agir como aceptores de elétrons, entre eles o oxigênio (O_2), o nitrato (NO_3^-), os óxidos de Fe (III), o sulfato (SO_4^{2-}). Assim, mediante

o acompanhamento da evolução espacial e temporal da concentração desses indicadores geoquímicos presentes na água subterrânea, é possível verificar como está ocorrendo a biorremediação natural de um local contaminado. Além dos aceptores de elétrons, outras variáveis podem ser relacionadas a processos biológicos, como o pH e o potencial redox (VROBLESKY e CHAPELLE, 1994; BORDEN et al., 1995; CORSEUIL e ALVAREZ, 1996; WALT e McNAB, 1999; AZADPOUR-KEELEY et al., 1999; KAO e WANG, 2000; SILVA et al., 2002; BHUPATHIRAJU et al., 2002; RÖLING e VERSEVEL, 2002; HUNKELER et al., 2002, CHEON e LEE, 2004). Como limitações da biorremediação natural são apontadas principalmente o longo tempo necessário, o risco da pluma de contaminação não ser atenuada antes de atingir pontos de captação para abastecimento de água (CORSEUIL e MARINS, 1997) e a aprovação pelo órgão ambiental. Neste contexto, um dos objetivos desta tese foi avaliar a biorremediação natural da água subterrânea em um posto de combustíveis, onde ocorreu vazamento de óleo diesel e conseqüente contaminação do solo e da água subterrânea, mediante o monitoramento de indicadores geoquímicos.

Outro ponto abordado nessa tese foi a busca de meios para acelerar a biodegradação do óleo diesel presente no solo e água subterrânea de postos de combustíveis, mediante experimentos laboratoriais.

A eficiência da biorremediação está associada a uma população microbiana adaptada ao consumo dos contaminantes e como esta pode ser enriquecida e mantida no ambiente. De acordo com vários trabalhos (KATAOKA, 2001; MULLIGAN et al., 2001; BENTO et al., 2003; RAHMAN et al., 2003), a inoculação de bactérias com habilidade em biodegradar hidrocarbonetos pode reduzir o tempo de tratamento, contudo muitos estudos mostram que esta técnica é ineficiente (APS, 1989 e 1990; TRINDADE et al. 2002; PALA et al., 2002). Assim, um dos objetivos desse trabalho foi investigar a eficiência da técnica do bioaumentamento quando aplicada a solos contaminados com óleo diesel.

Ainda em relação à técnica do bioaumentamento, a avaliação preliminar da capacidade dos microrganismos em degradar os poluentes é o primeiro passo a ser tomado no desenvolvimento de um projeto de biorremediação baseado nessa técnica. Contudo, nessa fase, muitos estudos são realizados com a simulação de contaminações, onde, por exemplo, combustível comercial é adicionado ao solo ou água subterrânea. Esta metodologia pode resultar em conclusões erradas, uma vez que os poluentes têm suas características alteradas por mecanismos físico-químicos e biológicos quando expostos por longos períodos às condições ambientais, o chamado efeito de intemperização. Assim, nessa pesquisa avaliou-se

a capacidade de diferentes microrganismos em degradar óleo diesel comercial em comparação a outro intemperizado que estava presente na água subterrânea de um posto de combustíveis.

Finalmente, outro objetivo deste trabalho foi estudar meios de conciliar a biorremediação com uma prática atual no gerenciamento ambiental que é a reutilização de resíduos. A vinhaça é um resíduo gerado na indústria sucro-alcooleira, cuja disposição representa uma grande preocupação ambiental devido principalmente ao grande volume gerado. Atualmente no Brasil, a disposição desse resíduo é feita com a sua aplicação em plantações, um processo chamado ferti-irrigação, como um substituinte parcial ou total de fertilizantes minerais. Considerando que a produção de etanol no Brasil está em expansão devido a uma crescente demanda interna e internacional por fontes alternativas de energia e que o solo tem uma capacidade de suporte limitada para receber a vinhaça, a busca de alternativas para tratar ou reutilizar a vinhaça é crucial. Com isso, objetivando agregar mais uma possibilidade de uso da vinhaça, este trabalho investigou o potencial do uso da vinhaça como um agente estimulador da biorremediação, devido principalmente a sua composição nutricional.

Outro resíduo é o próprio combustível coletado após um vazamento, como o óleo diesel presente em grande volume na água subterrânea em um dos postos de combustíveis aqui considerados. A proposta de reutilização avaliada foi o emprego do óleo diesel como matéria prima na produção de biossurfactantes. A viabilidade comercial dos biossurfactantes é ainda limitada pelos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação e ao uso de matérias primas de alto valor (NITSCHKE e PASTORE, 2002), assim, atualmente, muitos estudos relacionados aos biossurfactantes referem-se à busca de fontes de matérias primas alternativas como uma das possibilidades de redução de custos de produção.

1.2 - Objetivos

Sumarizando, este trabalho possui os seguintes objetivos:

- Avaliar a biorremediação natural da água subterrânea em um posto de combustíveis, onde ocorreu vazamento de óleo diesel e conseqüente contaminação do solo e da água subterrânea, mediante o monitoramento de indicadores geoquímicos e também a realização de testes em laboratório como suporte para a determinação do potencial de remoção de poluentes pelos microrganismos presentes na área;

- comparar diferentes técnicas de biorremediação (bioestimulação com a adição de nutrientes e de um surfactante e bioaumento) aplicadas isoladas e em conjunto a solo contaminado com óleo diesel;
- avaliar a eficiência da técnica do bioaumento aplicada a diferentes solos contaminados com óleo diesel;
- avaliar o efeito da adição da vinhaça na biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminados com óleo diesel;
- comparar a capacidade de diferentes microrganismos em biodegradar óleo diesel comercial e intemperizado;
- investigar a capacidade de diferentes culturas de bactérias em utilizarem óleo diesel intemperizado como matéria prima para produção de biosurfactante.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura enfocou-se em trabalhos concernentes ao entendimento dos mecanismos de transporte de contaminantes orgânicos em solos e águas subterrâneas, bem como às técnicas de remediação de áreas impactadas. Maior ênfase é dada à técnica de biorremediação e à biodegradabilidade de hidrocarbonetos presentes em combustíveis derivados do petróleo, devido ao tema do estudo abordado nesta pesquisa.

2.1 – Combustíveis derivados do petróleo

O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos, na maior parte alcanos e hidrocarbonetos aromáticos, com pequenas quantidades de compostos como oxigênio, nitrogênio e enxofre (FETTER, 1993).

O processamento inicial de beneficiamento do petróleo envolve sua separação por destilação em uma série de frações caracterizadas pelos intervalos de temperatura e pressão. Além da destilação, numerosos processos de refinaria são utilizados para otimizar a obtenção de certos produtos desejados. As frações destiladas do petróleo podem ser classificadas em três grupos de acordo com o número de átomos de carbono nas moléculas (USEPA, 2003a): as gasolinas (4 a 12 átomos de carbono), os destilados médios (9 a 20 átomos de carbono) e óleos combustíveis pesados (mais de 14 átomos de carbono).

No Brasil, cerca de 20% do petróleo processado é convertido em gasolina automotiva e 36% em óleo diesel (MME-DNC, 1995). A gasolina é uma mistura complexa de hidrocarbonetos hidrofóbicos relativamente voláteis. Os hidrocarbonetos típicos são os compostos alifáticos (alcanos, cicloalcanos, alcenos), aromáticos e aditivos (FERREIRA e ZUQUETTE, 1998). Dentre os aditivos, os oxigenados como o etanol tem a função de

umentar o índice de octanagem da gasolina automotiva e reduzir a poluição atmosférica. O óleo diesel é composto principalmente por hidrocarbonetos de cadeias simples, não ramificadas. Em relação à gasolina, o óleo diesel apresenta moléculas com tamanho maiores de cadeias, o que confere a este combustível maior massa específica, menor volatilidade e menor solubilidade em água.

2.2 – Hidrocarbonetos como fonte de contaminação da subsuperfície

2.2.1 – Origens e conseqüências

As preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas por vazamento/derramamento de combustíveis vêm crescendo, sendo diversas as origens: acidentes envolvendo o transporte de combustíveis por navios, caminhões ou dutos e principalmente devido a vazamentos provenientes de tanques de armazenamento subterrâneos, os quais estão sujeitos a fortes processos corrosivos (SPILBORGHS, 1997). Como no Estado de São Paulo ocorreu um número elevado de instalações de postos de combustíveis na década de 70, é de se supor que a vida útil dos tanques de armazenamento, que no passado era estimada entre 20 e 25 anos, se extinguiu, o que pode contribuir para o aumento da ocorrência de vazamentos. Em função do número elevado de casos de vazamentos, o licenciamento ambiental dos postos de combustíveis tornou-se obrigatório, tendo a CETESB elaborado uma série de documentos no sentido de orientar e padronizar os trabalhos nessa área (CETESB, 2006).

Pearson e Oudijk (1993) citam as principais causas de vazamentos relacionados aos sistemas de armazenamento subterrâneos de combustíveis (SASC) encontrados nos postos de combustíveis:

- Os tanques são freqüentemente instalados sem nenhum cuidado, podendo provocar algum tipo de dano nas paredes;
- Os tanques normalmente não sofrem nenhum tipo de manutenção, permitindo, assim, que a corrosão se instale e comprometa a integridade do material. Tanques que ficam em contato direto com o solo também irão corroer mais rapidamente por causa da umidade e precipitação;
- Quando os tanques ficam vazios ou parcialmente vazios, o lado de dentro do tanque pode corroer rapidamente;

- Os SASC são freqüentemente instalados sem a proteção catódica, e detectores de vazamentos;
- Os tanques são normalmente construídos de parede simples, sem revestimento com material anti-corrosivo;
- Quando os tanques são instalados em solos pedregosos e são cobertos com enchimentos reiterados ou com entulhos de construção, permitem rachaduras por pedras, que se expandem dentro de poucos anos;
- Oscilações do nível freático provocam condições mais favoráveis para a corrosão dos tanques e suas conexões quando são instalados na altura ou abaixo do nível freático. Água subterrânea com pH ácido pode acelerar a corrosão do tanque.

Os problemas gerados pela contaminação do solo e da água subterrânea por hidrocarbonetos são vários. Sanches (1998) aponta três problemas principais: existência de riscos à segurança das pessoas e das propriedades, riscos à saúde pública e dos ecossistemas e restrições ao desenvolvimento urbano e imobiliário. Segundo Gibotti (1999), a ocorrência de vazamentos de hidrocarbonetos configura perigo constante de incêndio ou explosão nos locais atingidos. Vapores de gasolina podem explodir sem ignição previa ao atingirem concentrações da ordem de 14.000 ppm no ar, quando a mistura de combustível mais comburente é suficiente para que haja combustão espontânea. Além disso, alguns dos compostos orgânicos presentes na composição da gasolina e do óleo diesel são cientificamente comprovados como carcinogênicos. Dentre os BTEX o benzeno é considerado o mais tóxico, podendo em exposições crônicas causar danos à medula óssea, leucemia e câncer de fígado. O valor estimado da dosagem mínima letal (LDL) para humanos é de 194 mg.Kg⁻¹ (STOKSTAD, 2004).

Além destes problemas, é importante ressaltar que a recuperação de áreas contaminadas é uma tarefa complexa e bastante demorada, e em alguns casos não se consegue atingir os limites permitidos pela legislação ou pelos órgãos ambientais (MANCINI, 2002). Outro fator complicador é o custo que, segundo um consultor em artigo na Revista Meio Ambiente Industrial (n.40, p.94, 2003), pode variar entre R\$ 50 a 100 mil reais, um valor consideravelmente alto para o setor de revendedores de combustíveis. Os custos são dependentes do tipo de contaminante, das características do local e da amplitude da área.

Com o objetivo de diminuir os riscos de contaminação de corpos d'água subterrâneos e superficiais, do solo e ar, e os riscos de incêndio e explosões, o Conselho Nacional do Meio

Ambiente (CONAMA) estabeleceu a Resolução nº 273 de 29 de novembro de 2000, que estipula uma série de requisitos que devem ser atendidos pelas empresas que integram o setor de combustível no Brasil, entre eles a obrigatoriedade do licenciamento ambiental e a certificação dos equipamentos de acordo com as normas da ABNT e do Inmetro.

2.2.2 – Dinâmica dos hidrocarbonetos em subsolo

Os hidrocarbonetos ao serem liberados para o ambiente através de vazamentos em tanques subterrâneos migram verticalmente pela zona não saturada sob a influência das forças gravitacional e capilar. Alguma expansão horizontal também ocorrerá devido à atração das forças capilares (DEHAINI, 2001 *apud* MANCINI, 2002).

O termo forças capilares refere-se às forças que influenciam o movimento dos hidrocarbonetos em fase líquida pelos interstícios do solo ou poros. Essas forças dependem de: a) caso o solo esteja molhado com água ou com hidrocarbonetos em fase líquida; b) as propriedades físicas e químicas dos hidrocarbonetos em fase líquida; c) as características do solo (GUIGUER, 2000).

O escoamento dos hidrocarbonetos em meio saturado sempre é bifásico por serem compostos orgânicos que apresentam baixa miscibilidade em água. A fase composta pelos hidrocarbonetos recebe a denominação de NAPL (*non-aqueous phase liquid*) ou fase líquida não aquosa. De acordo com a densidade do hidrocarboneto existem dois tipos de NAPLs (GUIGUER, 2000):

- LNAPL (*light non-aqueous phase liquid* ou fase líquida não aquosa leve) caracterizada por possuir densidade menor que a água. Os hidrocarbonetos com essa característica estão comumente associados com a produção, refino e distribuição de produtos do petróleo, por exemplo, a gasolina, o óleo diesel e o querosene.
- DNAPL (*dense non-aqueous phase liquid* ou fase líquida não aquosa densa) caracterizada por possuir densidade maior que a água. Os hidrocarbonetos com essa característica estão relacionados principalmente às atividades industriais, onde são utilizados, por exemplo, hidrocarbonetos clorados, PCBs (bifenilas poli-cloradas), antraceno, pireno, 1,1,1-TCE e fenol.

O transporte dos hidrocarbonetos no solo é caracterizado pela formação de quatro fases distintas que regulam o processo de migração do produto: fase líquida residual, fase líquida livre, fase dissolvida e fase vapor (Figura 2.1). A partição entre as fases é determinada

pelos fenômenos da dissolução, volatilização e adsorção (USEPA, 2003b). A fase líquida residual pode existir no solo como resíduos líquidos relativamente imóveis, adsorvidos ou retidos entre os sólidos do solo. O líquido livre não residual que passa pelo solo é chamado de fase líquida livre, que quando atinge o nível d'água subterrâneo passa a flutuar sobre o mesmo. Hidrocarbonetos em fase dissolvida podem estar presentes na superfície sólida do solo formando películas, ou na água do solo; quando atingem o nível d'água subterrâneo formam a chamada pluma de contaminação. Os hidrocarbonetos em fase de vapor podem existir como componentes do vapor do solo, podendo também se condensar e adsorver-se na superfície sólida ou dissolver-se na água do solo (GUIGUER, 2000).

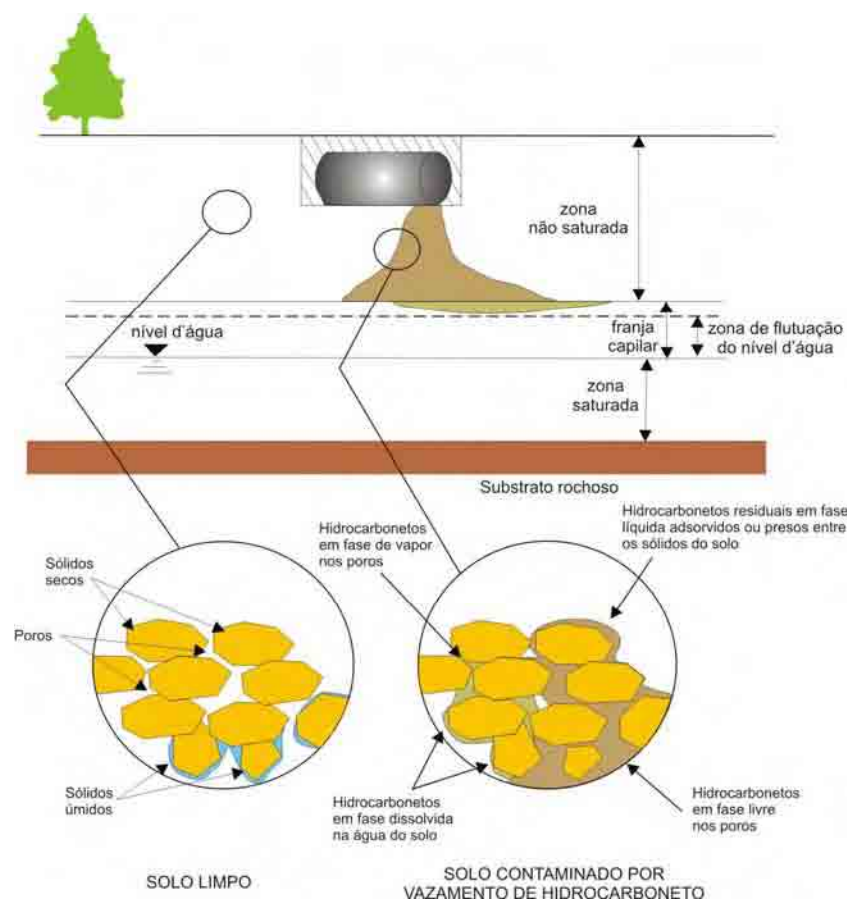


Figura 2.1 - Diferentes fases presentes nas zonas insaturada e saturada (Fonte: GUIGUER, 2000).

O transporte da LNAPL através das zonas não saturadas e saturadas depende da quantidade de hidrocarbonetos liberados ao meio. Um pequeno volume de LNAPL flui pela zona não saturada até atingir o estado de saturação residual, em razão do desenvolvimento de

um sistema de quatro fases como resultado da entrada de LNAPL nesta zona, com a seguinte ordem de grau de molhabilidade: água > LNAPL > ar (FERREIRA e ZUQUETTE, 1998).

A água de infiltração dissolve os componentes solúveis presentes na LNAPL, tais como o benzeno, o tolueno e os xilenos, e os transporta até a zona saturada. Esses contaminantes formam uma pluma que se distribui por difusão e advecção. Muitas das substâncias tendem a ser voláteis, assim o gás sofre partição de modo que uma parte fica retida no solo e outra migra para o ar, sendo transportados para outras partes do aquífero por difusão molecular. Os voláteis movem-se primeiramente pela zona saturada e finalmente entram na camada superficial do solo onde, dependendo das condições físico-químicas retornam para a fase líquida por condensação. Esses processos são responsáveis pelo transporte de contaminantes através de áreas bastante extensas (FERREIRA e ZUQUETTE, 1998).

Quando um grande volume de hidrocarbonetos é liberado, estes se deslocam no sentido da franja capilar próximo à zona saturada. Os componentes solúveis da LNAPL atravessam adiante ultrapassando os componentes menos solúveis. No topo da franja capilar, onde a água satura um grande volume de poros, o material acumulado causa uma redução na permeabilidade relativa da LNAPL. Impedida de mover-se para baixo, a LNAPL tende a se espalhar sobre o topo da franja capilar. O acúmulo de um volume suficiente de LNAPL no topo da franja capilar faz com que a mesma comece a fluir na mesma direção da água subsuperficial. Em razão de sua baixa densidade, a LNAPL flutua próxima ao nível da água subsuperficial, na zona de capilaridade. Por causa desses mecanismos alguns produtos tais como a gasolina, querosene e alguns outros óleos são encontrados como produtos livres sobre o topo da franja capilar (FERREIRA e ZUQUETTE, 1998).

Os grandes derrames geram um fornecimento contínuo de hidrocarbonetos para a zona não saturada, favorecendo uma condutividade hidráulica progressiva e contínua e formando uma depressão de interface zona saturada – LNAPL, onde os hidrocarbonetos se acumulam. No caso de remoção ou esgotamento da fonte de contaminação, os hidrocarbonetos presentes na zona não saturada continuam a migrar para níveis mais profundos, estacionando quando a concentração de hidrocarbonetos atinge o nível de saturação residual e não pode mais avançar. Caso contrário, continua a mover-se para baixo recarregando a depressão localizada sobre o nível da água subsuperficial, produzindo um espalhamento lateral maior sobre a franja capilar. A Figura 2.2 ilustra o caminho percorrido

pelo combustível liberado de um tanque subterrâneo até atingir a franja capilar e a formação de uma pluma de contaminação.

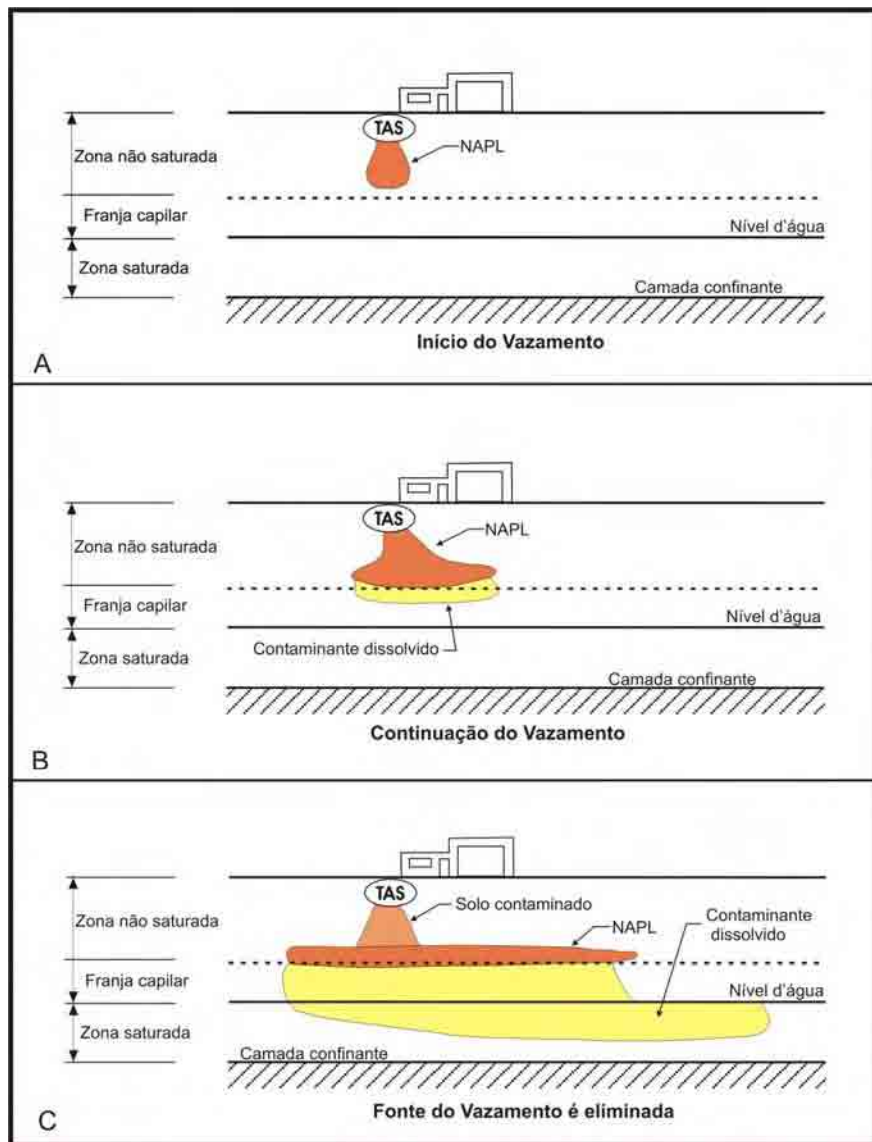


Figura 2.2 - Evolução da contaminação por hidrocarbonetos de combustíveis em subsuperfície (Fonte: USEPA, 2003b).

2.3 – Técnicas de remediação aplicadas a áreas contaminadas

Atualmente, existe uma preocupação e conscientização da sociedade em relação à qualidade ambiental, a população vem tornando-se mais crítica e participativa, exigindo atuações cada vez maiores das autoridades. Desta forma, em função da crescente demanda em

relação ao gerenciamento de áreas contaminadas, avanços significativos ocorreram nas últimas décadas nos estudos que visavam à recuperação ambiental (SPILBORGHS, 1997).

Por esse motivo, diversas tecnologias de remediação têm sido desenvolvidas e consolidadas principalmente pelos países desenvolvidos. O Brasil, hoje mais preocupado com seus locais contaminados, começa a desenvolver suas próprias tecnologias e também a adaptar as tecnologias já estabelecidas às nossas condições ambientais. O Estado de São Paulo, em função de sua intensa industrialização, apresenta uma situação mais crítica em relação a esta questão. Desta forma, a CETESB tem desenvolvido manuais e adaptado legislações, principalmente normas Holandesas (CETESB, 1996), com vistas ao controle das áreas suspeitas de contaminação e comprovadamente contaminadas. Neste sentido, destaca-se o *Manual de Gerenciamento de Áreas Contaminadas*¹, que tem por função fornecer informações e metodologias a serem utilizadas na solução dos problemas gerados por áreas contaminadas, desde a investigação preliminar até a proposição de técnicas de remediação.

Muitas opções ou combinações de opções estão disponíveis para restaurar a qualidade do solo e da água subterrânea. A seleção de tecnologias a serem utilizadas baseia-se fundamentalmente no conhecimento das características físico-químicas do contaminante, volume vazado, tempo de vazamento, caracterização geológica e hidrogeológica do local, análise do meio físico superficial e subterrâneo e extensão da pluma contaminante (SPILBORGHS, 1997).

Segundo a USEPA (1991), um plano típico de remediação possui quatro fases principais:

- contenção do produto livre e produto dissolvido;
- remoção do produto livre;
- remoção do produto dissolvido;
- remoção do produto adsorvido.

A contenção e a remoção do produto livre geralmente é realizada através de sistemas de poços ou trincheiras de bombeamento e para a remoção do produto adsorvido ao solo na zona não saturada e dissolvido na água subterrânea existem diferentes técnicas (Tabelas 2.1 e 2.2). A remediação da zona não saturada tem por objetivo evitar a contaminação da zona saturada. A zona não saturada é considerada uma fonte secundária de contaminação, onde os

¹ Documento em fase de conclusão disponível na página da CETESB na *internet* (www.cetesb.sp.gov.br).

processos de infiltração promoveriam a lixiviação e o transporte de poluentes para o aquífero (BITTON e GERBA, 1984; USEPA, 1990 e CHAPELLE, 1993). As técnicas de remediação da zona não saturada e da saturada podem ser realizadas “*ex situ*”, ou seja, através da retirada do material contaminado para posterior tratamento ou “*in situ*”, quando o material não é retirado.

Tabela 2.1 – Alguns exemplos de técnicas de remediação da zona não saturada

	<ul style="list-style-type: none"> • lavagem de solo (<i>soil wash</i>)
<u>Tratamentos “<i>ex situ</i>”:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • incineração • biorremediação: - reatores (<i>slurry phase</i>) <ul style="list-style-type: none"> - sistemas de tratamento de resíduos no solo (p.e. <i>landfarming</i>, biopilhas)
<u>Tratamentos “<i>in situ</i>”:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • lavagem de solo (<i>soil flushing</i>) • extração de compostos orgânicos voláteis (<i>SVE</i>, <i>bioventing</i>) • biorremediação

Tabela 2.2 – Alguns exemplos de técnicas de remediação da zona saturada

	<ul style="list-style-type: none"> • carvão ativado
<u>Tratamentos “<i>ex situ</i>”:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • coluna de aeração (<i>air stripping</i>) • biorremediação
<u>Tratamentos “<i>in situ</i>”:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • bombeamento e tratamento (<i>pump and treat</i>) • tratamentos químicos (injeção de oxidantes, barreiras reativas, etc.) • extração de compostos orgânicos voláteis (<i>air sparging</i>, <i>bioventing</i>) • biorremediação

No Estado de São Paulo verifica-se que o bombeamento e tratamento e a recuperação de fase livre são as técnicas mais empregadas no tratamento das águas subterrâneas, enquanto que a extração de vapores e a remoção de solo/resíduo destacam-se como as técnicas mais utilizadas para os solos, segundo dados da CETESB (2006).

Segundo o Eng^o Elton Gloeden da Cetesb em entrevista concedida para a revista Meio Ambiente Industrial (n. 56, p.18, 2005) “no Brasil, a técnica de biorremediação ainda é pouco utilizada, porém, pode ser promissora e eficiente se utilizada nas áreas contaminadas. Este é um método que pode ser aproveitado no mercado brasileiro, pois, o país apresenta solos e temperaturas favoráveis”.

A respeito da estruturação de projetos de remediação, há uma vasta disponibilidade de textos publicados, por exemplo: USEPA (1990, 1991), Nyer (1992), Fetter (1993), Norris (1994), Boulding (1995), Spilborghs (1997), Palma e Zuquette (1998) e Clu-in (2004). A seguir, alguns conceitos relacionados à técnica de biorremediação são revistos.

2.3.1 – Conceitos envolvidos na biorremediação

2.3.1.1 – Ação dos microrganismos

A tecnologia da biorremediação é baseada em processos nos quais ocorrem reações bioquímicas mediadas por microrganismos. Em geral, um composto orgânico quando é oxidado perde elétrons para um acceptor final de elétrons, que é reduzido (ganha elétrons). O oxigênio comumente atua como acceptor final de elétrons quando presente e a oxidação de compostos orgânicos com a redução do oxigênio molecular é chamado de respiração aeróbia heterotrófica. No entanto, quando o oxigênio não está presente, microrganismos podem usar compostos orgânicos ou íons inorgânicos como aceptores finais de elétrons alternativos, condições estas chamadas de anaeróbias. A biodegradação anaeróbia pode ocorrer pela desnitrificação, redução do ferro, redução do sulfato ou condições metanogênicas (CORDAZZO, 2000).

Nas condições subsuperficiais encontram-se populações de microrganismos, as quais geralmente são formadas por bactérias, fungos, algas e protozoários (GHIORSE e WILSON, 1988). As bactérias na zona saturada variam com as características específicas geoquímicas e hidrogeológicas do aquífero, sendo que, de maneira geral, embora existam bactérias anaeróbias, as que predominam são as bactérias aeróbias (CHAPELLE, 1993). Os principais mecanismos de biotransformação de contaminantes orgânicos em água subterrânea são

efetuados nos biofilmes, que são bactérias e polímeros extracelulares aderidos à subsuperfície e que obtém energia e nutrientes durante o fluxo da água subterrânea (BITTON e GERBA, 1984).

A estrutura química dos poluentes orgânicos tem uma profunda influência na habilidade dos microrganismos metabolizarem estas moléculas, especialmente com respeito às taxas e extensão da biodegradação. Alguns compostos orgânicos são rapidamente biodegradados enquanto outros são recalcitrantes (não biodegradáveis). Hidrocarbonetos com baixo a médio peso molecular e álcoois são exemplos de compostos facilmente biodegradáveis. Compostos xenobióticos (compostos químicos fabricados pelo homem), especialmente hidrocarbonetos halogenados, tendem a ser resistentes à biodegradação. Geralmente, compostos ramificados e polinucleados são mais difíceis para degradar que moléculas monoaromáticas ou com cadeias simples, e aumentando o grau de halogenação da molécula, diminui-se a biodegradabilidade (ALEXANDER, 1965 *apud* ATLAS, 1997).

A comunidade microbiana envolvida na degradação de compostos xenobióticos pode ser dividida em dois grupos: os microrganismos primários e os secundários. Os primários são aqueles capazes de metabolizar o substrato principal fornecido ao sistema, enquanto os secundários não utilizam o substrato principal, porém, os produtos liberados pelos microrganismos primários. Este processo é denominado cometabolismo (BULL e SLATER, 1982 *apud* GRADY, 1985).

Maiores detalhes a respeito do metabolismo dos microrganismos que degradam hidrocarbonetos podem ser encontrados em Alexander (1994), Kataoka (2001) e Melo (1997).

2.3.1.2 – Processos de biorremediação “*in situ*”

Biorremediação “*in situ*” é realizada no próprio local, sem que haja remoção de material contaminado. Isto evita custos e distúrbios ambientais associados com o movimento de solos e águas que estão contaminados para outros locais destinados ao tratamento. Os produtos finais de uma biorremediação efetiva são água e gás carbônico, que não apresentam toxicidade e podem ser incorporados ao ambiente sem prejuízo aos organismos vivos.

De acordo com parâmetros como origem dos microrganismos, adição ou não de nutrientes, a biorremediação *in situ* pode ser realizada através de três processos: biorremediação intrínseca, bioestimulação e bioaumento (*bioaugmentation*) (ATLAS, 1997).

- Biorremediação intrínseca (natural)

Uma nova abordagem para a descontaminação de solos e águas subterrâneas, chamada de remediação natural vem, recentemente, ganhando aceitação, principalmente em locais contaminados por derramamentos de derivados de petróleo, como o que acontece em postos de combustíveis. A remediação natural é uma estratégia de gerenciamento que se baseia nos processos naturais de atenuação para remover ou conter os contaminantes dissolvidos na água. A atenuação natural refere-se aos processos físicos, químicos e biológicos que facilitam o processo de remediação de maneira global (WIEDEMEIR, 1996). Dados obtidos em pesquisas de campo de vários pesquisadores (BARKER et al., 1987; CHIANG et al., 1989; CHAPELLE, 1994; DAVIS e KLIER, 1994) têm comprovado que a atenuação natural limita o deslocamento dos contaminantes e, portanto, diminui a contaminação ao meio ambiente. A remediação natural não é uma alternativa de “nenhuma ação de tratamento”, mas uma forma de minimizar os riscos para a saúde humana e para o meio ambiente, monitorando-se o deslocamento da pluma e assegurando-se de que os pontos receptores (poços de abastecimento de água, rios, lagos) não serão contaminados (CORSEUIL e MARINS, 1998).

Após a contaminação do lençol freático, os contaminantes se dispersarão em forma de pluma e irão deslocar-se, entretanto, o movimento da pluma pode ser atenuado por processos de diluição, dispersão, adsorção, volatilização e biodegradação. O processo que envolve as reações químicas promovidas por microrganismos é chamado de biorremediação intrínseca ou natural, cujo conceito básico é o uso da capacidade de microrganismos autóctones em degradar contaminantes que tenham sido derramados em subsuperfície sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (BORDEN et al., 1995). Dependendo das condições hidrogeológicas do local contaminado, a taxa da reação de biodegradação será mais rápida ou mais lenta, assim, a determinação da taxa de transformação é de grande importância para se prever até onde a pluma irá se deslocar. Quando a taxa de biodegradação for igual ou maior do que a taxa de deslocamento dos contaminantes, a pluma deixará de se deslocar e diminuirá de tamanho. Neste caso, se a fonte receptora não fosse atingida, não haveria a necessidade de implantação de tecnologias ativas de remediação, e a remediação natural seria a opção mais econômica de recuperação da área.

Para que se possa demonstrar que a remediação natural é uma forma adequada de descontaminação de hidrocarbonetos, é necessário que se faça uma completa caracterização hidrogeológica da área contaminada, que se determine a magnitude e extensão da

contaminação e que se demonstre que a pluma não irá migrar para regiões de risco potencial. Para tal, é necessário que se determine as taxas de migração e redução de tamanho da pluma por meio de estudos de campo e de laboratório. No entanto, se o processo natural de atenuação não evitar o deslocamento da pluma até locais de risco, tecnologias que aceleram a transformação dos contaminantes devem ser implantadas (CORSEUIL e MARINS, 1997).

A biodegradação de hidrocarbonetos é essencialmente uma reação de oxi-redução onde o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétrons) e um aceptor de elétrons é reduzido. Há vários compostos que podem agir como aceptores de elétrons, tais como o oxigênio (O_2), nitrato (NO_3^-), óxidos de ferro (p.e. $Fe(OH)_3$), sulfato (SO_4^{2-}), água (H_2O) e dióxido de carbono (CO_2). A seguinte seqüência de preferência de utilização desses aceptores foi observada: oxigênio > nitrato > óxidos de ferro > sulfato > água. Esta seqüência reflete a diminuição do potencial de oxidação dos aceptores. Em geral, a cinética de oxidação dos hidrocarbonetos é mais rápida para aceptores de elétrons com potenciais de oxidação mais altos (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

O monitoramento da biorremediação intrínseca é baseado em um acompanhamento da evolução temporal e espacial da concentração de indicadores geoquímicos (p.e., pH, Eh, OD, temperatura, aceptores de elétrons) na água subterrânea. Resultados desse monitoramento podem ser usados para identificar fatores que podem controlar a taxa de biodegradação bem como identificar o processo microbiológico de respiração (aeróbia ou anaeróbia) em diferentes porções da pluma de hidrocarbonetos dissolvidos. A diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (OD) na água e um aumento da concentração de dióxido de carbono são indicativos de um processo aeróbio de biodegradação, enquanto que a produção de íons Fe^{2+} ou diminuição de íons nitrato indicam a presença de processos anaeróbios. Um declínio do potencial redox (Eh) de valores positivos para negativos reflete a mudança de condições oxidantes (favoráveis aos microrganismos aeróbios) para condições redutoras (melhores condições aos processos anaeróbios, que são mais lentos que os aeróbios). Um aumento nos valores de pH pode ser creditado ao consumo de íons H^+ durante a redução de íons férricos ou do nitrato (BORDEN et al., 1995). Os processos aeróbios e anaeróbios de biodegradação são melhor apresentados a seguir:

- Biodegradação aeróbia

Quase todos os hidrocarbonetos do petróleo são biodegradados sob condições aeróbias. Oxigênio é um cosubstrato para a enzima que pode inicializar o metabolismo do hidrocarboneto e por fim é utilizado como aceptor final de elétrons para a geração de energia

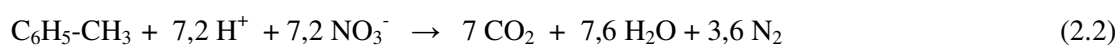
(YOUNG, 1984). Em muitos casos, a maior limitação na biodegradação aeróbia em subsuperfície é a baixa solubilidade do oxigênio em água. Por exemplo, a mineralização aeróbia do tolueno ($C_6H_5-CH_3$) é representada pela seguinte equação:



A água saturada com ar contém de 6 a 12 ppm de oxigênio dissolvido. Por exemplo, a completa conversão do tolueno (e muitos outros hidrocarbonetos) para CO_2 e H_2O requer aproximadamente 3 g de O_2 por grama de hidrocarboneto. Usando-se essa taxa, o O_2 presente na água pode resultar na biodegradação de 2 a 4 ppm de hidrocarboneto através de processo estritamente aeróbio. Se a concentração de hidrocarboneto for maior que essa, a biodegradação deve ser incompleta ou deve acontecer mais vagarosamente por processo anaeróbio (BROWN et al., 1994). A extensão da biodegradação aeróbia é controlada pela quantidade de contaminantes, a taxa de transferência de oxigênio para a subsuperfície e o conteúdo original de oxigênio no aquífero (BORDEN, 1994). Os tempos de meia vida, por exemplo, do tolueno, podem variar entre 1 e 20 dias, dependendo da concentração microbiológica ativa (ALVAREZ et al., 1991; CHEN et al., 1992; CHIANG et al., 1989; WEBER e CORSEUIL, 1994), chegando a valores fora dessa faixa se também ocorrerem limitações de transferência de massa (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

- Biodegradação utilizando o nitrato

Quando a quantidade de oxigênio diminui e nitrato está presente (ou outras formas oxidadas de nitrogênio), alguns microrganismos anaeróbios facultativos utilizam nitrato (NO_3^-) ao invés de oxigênio como aceptor final de elétrons. Para o tolueno, este processo pode ser aproximado pela seguinte equação:



Os tempos de meia vida para o tolueno sob condições desnitrificantes são maiores que em condições aeróbias, tipicamente variando de 20 a 50 dias (ALVAREZ et al., 1994; HUTCHINS et al., 1991b), mas podem ser mais curtos se a concentração inicial de desnitrificantes exceder 1 mg/l (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

Nas últimas décadas, pesquisadores descobriram que tolueno, etilbenzeno, xilenos, naftaleno e uma variedade de outros compostos podem ser biodegradados usando nitrato como aceptor final de elétrons (KUHN et al., 1988; HUTCHINS et al., 1991a; MIHELIC e LUTHY, 1991). Atualmente, há algumas controvérsias sobre a biodegradabilidade do

benzeno sob condições desnitrificantes. Vários trabalhos indicam o benzeno como sendo recalcitrante (não biodegradável) sob estas condições (HUTCHINS et al., 1991a; KUHN et al., 1988; SILVA et al., 2002) enquanto outros estudos indicam que o benzeno é degradado (MAJOR et al., 1988; KUKOR e OLSEN, 1989).

- Biodegradação utilizando o íon férrico

Uma vez que as quantidades de oxigênio e nitrato reduzem, os microrganismos podem utilizar o íon férrico (FeIII) como acceptor de elétrons. Grandes quantidades de ferro na forma férrica estão presentes em sedimentos de muitos aquíferos e esta pode ser uma potencial fonte desse composto para a biodegradação. O ferro pode estar presente tanto em minerais cristalinos ou amorfos. As formas que são mais facilmente reduzidas são as formas amorfas e pouco cristalinas de hidróxidos, oxi-hidróxidos, e óxidos de Fe (III) (LOVLEY, 1991). A reação hipotética da oxidação do tolueno com a redução do Fe (III) na forma de hidróxido férrico (Fe (OH)₃) pode ser representada pela seguinte equação:



A redução do Fe (III) resulta em elevadas concentrações de íon Fe (II) dissolvidos em aquíferos contaminados. Lovley et al. (1989) descobriram que em um aquífero contaminado por um derramamento de óleo cru, a remoção seletiva de benzeno, tolueno e xilenos da pluma foi acompanhada por uma acumulação de Fe (II) dissolvido e diminuição de óxidos de Fe (III) nos sedimentos contaminados. Embora o exato mecanismo de redução microbiológica dos íons férricos seja minimamente quantificado, as evidências disponíveis sugerem que a redução do ferro é um importante mecanismo na biodegradação de hidrocarbonetos dissolvidos (BORDEN et al., 1995).

Vários microrganismos foram identificados por apresentarem a capacidade de utilização do íon férrico como acceptor de elétrons na oxidação de compostos aromáticos incluindo o tolueno, fenol, p-cresol e benzoato (LOVLEY e LONERGAN, 1990; LOVLEY et al., 1989).

- Biodegradação utilizando outros aceptores

Pesquisas demonstram que uma ampla variedade de compostos orgânicos pode ser biodegradada pela ação de microrganismos redutores de sulfato e/ou metanogênicos (geradores de metano). Estes compostos incluem isômeros de cresol (SMOLENSKI e SUFLITA, 1987), hidrocarbonetos mono e poliaromáticos (BERRY et al., 1987),

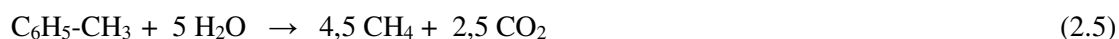
alquilbenzenos (GRBIC-GALIC e VOGEL, 1987) e hidrocarbonetos insaturados (SCHINK, 1985).

Redutores de sulfato podem potencialmente biodegradar o tolueno usando sulfato através da reação representada na seguinte equação (BELLER et al., 1992):



Este processo é relativamente lento e, quando ocorre, usualmente acontece no centro da pluma, longe das bordas não contaminadas (aeróbias) da água subterrânea (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

Um consórcio metanogênico (grupo de microrganismos que geram metano) pode potencialmente biodegradar o tolueno (processo lento) usando água como acceptor de elétrons mediante a reação representada na seguinte equação:



Atualmente, poucos estudos de campo têm examinado o efeito dos mecanismos metanogênicos e os redutores de sulfato na biodegradação de hidrocarbonetos dissolvidos na água subterrânea. Enquanto há vários estudos sobre a biodegradação do tolueno via redução do sulfato (BELLER et al., 1992) e metanogenises (GRBIC-GALIC e VOGEL, 1987), a extensão e significância da biodegradação de hidrocarbonetos em aquíferos rasos por esses processos são minimamente quantificadas. Esta falta de informação deve ser causada parcialmente pelas características desses microrganismos. Consórcios sulfato-redutores e metanogênicos são conhecidos por serem sensíveis a variações das condições ambientais como a temperatura, nutrientes inorgânicos (nitrogênio, fósforo e traços de metais), contaminantes e pH (ZEHNDER, 1978). Um não balanceamento em qualquer desses fatores pode reduzir a taxa e a extensão da biodegradação anaeróbia (BORDEN et al., 1995).

- Bioestimulação

A bioestimulação de populações de microrganismos autóctones com o objetivo de aumentar as taxas de biodegradação é freqüentemente empregada em projetos de biorremediação (ATLAS, 1997). Para se utilizar o processo de bioestimulação, deve-se demonstrar que existe no local contaminado uma população natural de microrganismos capazes de biodegradar os contaminantes presentes e que as condições ambientais são insuficientes para se obter altas taxas de atividade microbológica dessa população. Medidas das propriedades físicas e químicas de amostras do local podem revelar as limitações físico-

químicas para a atividade microbiológica, a qual pode então ser modelada para indicar os fatores críticos limitantes (RAMASWAMI e LUTHY, 1997).

Algumas limitações naturais comuns à biodegradação de poluentes são: altos níveis de concentração de poluentes, falta de oxigênio, pH desfavorável, falta de nutrientes minerais, baixa umidade e temperaturas desfavoráveis. Uma variedade de métodos que modificam as condições ambientais podem ser utilizados para melhorar as taxas das atividades biodegradadoras da população microbiológica autóctone. Uma vez que as condições naturais limitantes são corrigidas, a distribuição natural existente de microrganismos permite, em muitos casos, um enriquecimento espontâneo de microrganismos apropriados.

A disponibilidade de oxigênio molecular tem um profundo efeito na biodegradação de vários compostos. Limitação de oxigênio é um problema freqüente na biorremediação “*in situ*” de hidrocarbonetos e outros poluentes que são biodegradados em condições aeróbias.

O fornecimento de oxigênio para a água subterrânea pode ser efetuado de várias formas. O uso de difusores de ar comprimido é limitado, pois, esse método não fornece oxigênio acima de 8-10 ppm. Esses valores podem ser elevados para 40-50 ppm se for utilizado oxigênio puro, porém, além de ser anti-econômico, nessas concentrações o oxigênio pode ser perdido da solução antes de ser utilizado pelos microrganismos (BROWN et al., 1994).

A adição de soluções diluídas de peróxido de hidrogênio com formulações apropriadas e estáveis pode ser usado como fonte de oxigênio para a biodegradação de hidrocarbonetos (API, 1987; BERWANGER e BARKER, 1988; BROWN et al., 1994; BROWN et al., 1985; THOMAS et al., 1987; YANIGA e SMITH, 1984). Para se evitar a formação de bolsão de gás e a toxicidade microbiológica, a concentração prática de peróxido de hidrogênio na água injetada é mantida aproximadamente em 100 ppm (BROWN et al., 1994; YANIGA e SMITH, 1984).

A biorremediação “*in situ*” baseada na injeção de ar é extensivamente usada no tratamento da água subterrânea (BRUBAKER, 1995; HINCHEE, 1994). *Air sparging* é uma tecnologia que pode ser utilizada para remover compostos voláteis da subsuperfície ou para induzir a biodegradação aeróbia na zona vadosa (*bioventing*) ou na saturada (*biosparging*). Durante o *air sparging*, ar é injetado na zona saturada, usualmente abaixo da zona contaminada. Compostos voláteis dissolvidos na água subterrânea e sorvidos nas partículas do solo são particionados para a fase advectiva de ar e são transportados para a zona vadosa. Os

compostos volatilizados podem então ser coletados da zona vadosa por um sistema de extração de vapores. O *air sparging* pode ser muito efetivo em providenciar oxigênio para microrganismos aeróbios. Estes microrganismos são naturalmente encontrados nas áreas contaminadas e são freqüentemente capazes de oxidar uma ampla gama de compostos orgânicos, incluindo compostos semivoláteis, que não são removidos por volatilização. Além disto, microrganismos aeróbios têm demonstrado capacidade em oxidar compostos halogenados como os mono e poliaromáticos halogenados.

Enquanto a disponibilidade de oxigênio pode limitar severamente a biodegradação de hidrocarbonetos, outros compostos são mais rapidamente degradados sob condições anaeróbias. Considerações termodinâmicas e experiências práticas indicam que a descloração de hidrocarbonetos halogenados é favorecida em condições anaeróbias (SUFLITA et al., 1982). Para a biorremediação de compostos altamente clorados, tratamentos alternando condições anaeróbias e aeróbias podem ser a melhor solução prática (ABRAMOWICZ, 1990; UNTERMAN, 1996).

A concentração de vários nutrientes também pode limitar as taxas de biodegradação. Os microrganismos necessitam dos macronutrientes para sintetizar componentes celulares, como o nitrogênio para aminoácidos e enzimas, o fósforo para o ATP e o DNA, enxofre para algumas proteínas e coenzimas, cálcio para estabilizar a parede celular e magnésio para estabilizar os ribossomos. Uma razão de C:N:P de 30:5:1 é geralmente suficiente para assegurar o crescimento microbiano no aquífero (PAUL e CLARK, 1989). Microrganismos também necessitam de micronutrientes para realizar certas atividades enzimáticas. Em geral, os minerais do aquífero contêm quantidade suficiente desses nutrientes para suportar a atividade microbiana. Apesar disso, análises geoquímicas e ensaios laboratoriais de biodegradação devem ser feitos para verificar se a quantidade de nutrientes inorgânicos presentes é suficiente para o sucesso da biorremediação (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

Microrganismos requerem principalmente nitrogênio e fósforo para incremento de biomassa, assim, a disponibilidade desses nutrientes na área contaminada é um fator crítico para a biodegradação. Sob condições onde a deficiência de nutrientes limita a biodegradação dos hidrocarbonetos, os efeitos benéficos da fertilização com esses nutrientes têm sido demonstrados (PRITCHARD e COSTA, 1991). As formas de fósforo mais utilizadas para recuperação de aquíferos são os sais de ortofosfato e polifostato. Em relação ao nitrogênio, as formas mais utilizadas são os sais de amônio (cloreto de amônio), pois, essa forma é a mais utilizada no metabolismo microbiano (CASARINI e SPILBORGHS, 1992).

O transporte de nutrientes bem como de outras substâncias que devem ser levadas até um aquífero contaminado, freqüentemente tem sido o fator limitante para o processo de biorremediação (THOMAS e WARD, 1989). Normalmente essas soluções são introduzidas no aquífero por meio de técnicas convencionais de injeção (WARD et al., 1988). Entretanto, a hidrogeologia do aquífero geralmente dificulta esse transporte fazendo com que ele não ocorra de maneira uniforme (MERCER e COHEN, 1990).

Devlin e Barker (1994) descreveram em seu estudo em sistema semi-passivo para introduzir soluções no aquífero, de maneira que as soluções injetadas consigam se misturar e se espalhar completamente pela água do aquífero.

Dey (1991) remediou um aquífero arenoso contaminado com 31800 L de gasolina proveniente de vazamento de tanque de armazenamento subterrâneo. O vazamento contaminou 1530 m³ de solo, atingindo também a água subterrânea. Para a remediação do local foi usado um plano integrado utilizando as tecnologias de extração de orgânicos voláteis (*bioventing*) com adição de nitrogênio e fósforo para biodegradar os hidrocarbonetos adsorvidos e para remediar a água subterrânea foi utilizada uma tecnologia *ex-situ* através de uma coluna de aeração (*air stripping*). A operação no sistema integrado durou 18 meses e no final obteve-se uma remoção de 15300 Kg de gasolina representando 73 % do total vazado. A extração de hidrocarbonetos voláteis combinada com o *bioventing* removeu grande parcela dos hidrocarbonetos poucos solúveis retidos no solo.

Segundo Wilson e Brown (1989), o sistema de injeção de nutrientes e oxigênio deve ser projetado visando à transferência de massa para dentro e para fora da área contaminada. Assim, o sistema pode ser passivo, onde existe apenas um poço de injeção de nutrientes e oxigênio na pluma de contaminação ou dinâmico, onde existem poços de injeção e extração sendo os nutrientes e o oxidante misturados em tanques na superfície. A vantagem do sistema dinâmico é que se pode criar um gradiente hidráulico para se controlar o fluxo de nutrientes e conter a pluma de contaminação.

De acordo com Corseuil (1994), outro fator que deve ser considerado como limitante da biorremediação é a presença de biomassa autóctone insuficiente para a degradação dos contaminantes. Baixas populações de microrganismos tipicamente presentes em sistemas subsuperficiais podem resultar em significantes períodos de retardos antes do início mensurável da biodegradação, mesmo em condições favoráveis de oxigênio e nutrientes. O autor observou que estes retardos, os períodos para o desenvolvimento da população, variaram inversamente com o número de microrganismos contaminante-específicos

inicialmente presentes no solo do aquífero, o que sugere a necessidade da obtenção de concentrações críticas de biomassa. Embora esta última afirmação não seja novidade, ela é raramente abordada de forma adequada em aplicações de biotecnologia para a remediação subsuperficial *in-situ*. Estas aplicações geralmente focalizam o estabelecimento de condições apropriadas de receptor de elétrons e de nutrientes, e assumem um desenvolvimento garantido de suficientes populações microbianas. Esta pode não ser uma prática apropriada e mais atenção deve ser dada à possível necessidade de se aumentar as populações microbianas autóctones para assegurar que as concentrações de biomassa sejam suficientemente altas para a confirmação das taxas de degradação do contaminante.

- *Bioaumentação* (“*bioaugmentation*”)

A introdução de microrganismos não indígenas (alóctones) pode ser considerada em locais, onde após a contagem das bactérias heterotróficas totais e fungos, foi identificada uma insuficiência de microrganismos indígenas (autóctones) para a biodegradação do resíduo perigoso em questão, mesmo após a tentativa da bioestimulação (SPILBORGHS, 1997).

O bioaumentação é um processo de biorremediação que utiliza microrganismos alóctones muitas vezes encontrados em produtos biotecnológicos comercializados. Esse processo é necessário quando um local contaminado não possui ou possui em quantidades insuficientes os requisitos necessários para que o processo de degradação ocorra. Assim, essa técnica tem como objetivo acelerar ou estimular a biodegradação através da intensificação do crescimento microbiano tanto quanto também pela otimização do ambiente em questão.

O bioaumentação, quando bem utilizado, pode acelerar a biodegradação do contaminante, devendo, entretanto, serem considerados os seguintes aspectos:

- Aprovação do órgão ambiental: o produto biotecnológico antes de sua utilização deve ser identificado, caracterizado e testado em sua toxicidade e ecotoxicidade, bem como comprovada a sua eficiência e inocuidade ao ambiente. No Estado de São Paulo, a CETESB homologou norma técnica específica para esta avaliação (CETESB, 1994a) e no âmbito federal foi publicada uma legislação específica (BRASIL, LEIS, etc., 1995), constituindo a CTNBIO (Comissão Técnica Nacional de Biosegurança) que define os critérios para utilização de microrganismos geneticamente modificados. A Resolução Conama 314 de 2002 disciplina o registro de produtos com a finalidade de biorremediar solos afetados por vazamentos de petróleo e seus derivados.

- Os microrganismos aplicados devem atuar em sinergismo com as espécies autóctones, sem interferir nos processos biogeoquímicos naturais.

Leavitt e Brown (1994) fizeram um estudo comparativo entre a bioestimulação e o bioaumentação para um caso de tratamento de solo contaminado com óleo cru, empregando, em um caso, microrganismos autóctones e, no outro, cultura comercial com mistura recomendada de nutrientes. Concluíram que, para algumas aplicações, a bioestimulação de microrganismos autóctones é a melhor escolha, considerando custo e desempenho.

Bento et al. (2003) avaliaram a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solos contaminados com óleo diesel através da biorremediação intrínseca, bioestimulação e bioaumentação. O bioaumentação apresentou a maior degradação e a biorremediação intrínseca foi mais efetiva do que a bioestimulação. O melhor desempenho para a biorremediação do solo contaminado com diesel foi obtido quando foram adicionados microrganismos pré-selecionados do próprio ambiente contaminado.

Segundo a *Applied Biotreatment Association* (APS, 1989 e 1990) o bioaumentação não tem se mostrado necessário nem útil para tratamento de locais contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, pois, estes locais já apresentam populações suficientes de microrganismos autóctones capazes de biodegradar essas substâncias. Atualmente várias misturas comerciais de microrganismos são vendidas com esse objetivo, contudo, a baixa eficiência desse processo e o alto custo não justificam essa prática.

A utilização de produtos biotecnológicos não deve ser interpretada como a solução de todos os problemas de poluição, sendo que os processos convencionais, como os já estabelecidos, devem ser os mais utilizados quando o contaminante é degradável e não tóxico. Esta biotecnologia está sendo desenvolvida com vista aos contaminantes recalcitrantes e complexos, como organoclorados e pesticidas, ou casos específicos onde um resultado mais rápido é necessário (SPILBORGHS, 1997; MACHADO, 1998; SILVA, 1999 e MATHEUS, 2003).

2.3.1.3 – Caracterização do local para implementação da biorremediação “*in situ*”

Para o projeto e implantação do plano de biorremediação “*in situ*”, o local deve ser caracterizado do ponto de vista físico, químico e biológico. Muitas dessas características são genéricas para todos os processos de biorremediação (USEPA, 1992).

- Características físicas

- distribuição espacial da contaminação, especialmente a distribuição da fase não aquosa (NAPL), a origem do resíduo e a geometria da pluma;
- hidrogeologia, direção e velocidade do fluxo da água subterrânea, heterogeneidades e zonas impermeáveis do sedimento;
- temperatura.

- Características químicas

- composição da contaminação, incluindo contaminantes que não sejam hidrocarbonetos, mas que podem interferir no processo;
- qualidade da água subterrânea, especialmente o potencial redox, receptores de elétrons, pH e produtos de degradação;
- propriedades de adsorção do sedimento.

- Características biológicas

- presença de microrganismos viáveis, especialmente degradadores de hidrocarbonetos, em zonas contaminadas e não contaminadas;
- potencial de biodegradação e taxas de degradação.

2.3.1.4 – Condições hidrogeológicas que influenciam a biorremediação

A seguir são listadas algumas condições hidrogeológicas que devem ser analisadas antes da implementação da biorremediação (USEPA, 1992).

- Permeabilidade do solo e materiais de subsuperfície

Quanto maior a permeabilidade mais fácil é a distribuição dos nutrientes e do receptor de elétrons no solo contaminado e na água subterrânea. Evidentemente, estas condições tendem a ampliar a extensão da contaminação.

- Tipo de solo

Como a permeabilidade, o tipo de solo afeta o grau de adsorção de contaminantes e nutrientes. Areia e cascalho são os materiais mais favoráveis para o transporte de nutrientes; argilas são os menos favoráveis.

- Profundidade do nível d'água

A profundidade do nível d'água não deve ser considerada tanto como um fator favorável ou desfavorável à biodegradação, mas pode interferir em sistemas de bombeamento da fase livre e injeção de nutrientes.

- Concentração de minerais

Os nutrientes básicos exigidos para o desenvolvimento microbiano são o nitrogênio, fósforo, enxofre e, em baixo nível, diversos metais (Fe, Mn, etc.), podendo variar de acordo com o poluente. De qualquer forma, a dissolução da rocha matriz geralmente libera alguns minerais, portanto, é improvável que estes estejam completamente ausentes (McNABB e DUMLAP, 1975 *apud* SPILBORGHS, 1997).

Alguns metais pesados podem estar presentes em aquíferos em concentrações suficientemente altas para inibir a atividade microbiológica. Por exemplo, não é incomum a presença de metais pesados potencialmente tóxicos como Pb, Hg, Cd e Cr. Quantidades traços destes metais são necessárias para os objetivos nutricionais dos microrganismos, mas estes metais podem ser prejudiciais à vida microbiana se presentes na água subterrânea em concentrações maiores que 1 mg/L. Embora a gasolina brasileira não tenha chumbo, análises geoquímicas com amostras representativas do aquífero devem ser realizadas para verificar a ausência dessas substâncias inibitórias (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

- Potencial Redox (Eh)

A concentração de oxigênio é um dos parâmetros mais importantes dentro dos processos microbiológicos, o qual é usualmente medido através do potencial redox (Eh, em mV). O potencial redox do solo é afetado pela profundidade abaixo da superfície e a taxa de difusão de oxigênio, que é determinada pelo tamanho e número de poros preenchidos por ar, que é função da textura, pH, teor de água no solo, presença de carbono orgânico e microrganismos (CASARINI e SPILBORGHS, 1992). Os microrganismos aeróbios do solo e

aquífero requerem um potencial redox em torno de 800 mV para as suas reações, enquanto que os anaeróbios requerem Eh de -240 mV (a 25°C e pH 7) (BITTON e GERBA, 1984).

- pH

Enzimas são polímeros de aminoácidos e suas atividades requerem um grau de protonação adequado dos aminoácidos. Este processo é controlado pelo pH. O pH ótimo para a ação dos microrganismos é usualmente próximo da neutralidade, mas muitos microrganismos presentes em aquíferos podem agir sem prejuízos de suas funções para valores de pH entre 5 e 9 (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996). A água subterrânea é tipicamente bem tamponada dentro destes limites, assim, os requerimentos microbiológicos referentes ao pH são geralmente atendidos (CHAPELLE, 1993). Contudo, em locais onde o pH tem sido alterado pela ação do homem, a biodegradabilidade é comumente prejudicada.

- temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam a atividade e a sobrevivência dos microrganismos (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996). Baixas temperaturas diminuem a fluidez e a permeabilidade da membrana celular, que controla o transporte de nutrientes (e contaminantes) entre o meio exterior e o interior da célula microbiana. Altas temperaturas são associadas com atividades enzimáticas mais altas e taxas de biodegradação mais rápidas, até um valor que é específico de cada espécie. Nesta faixa, por exemplo, a taxa de biodegradação dos BTEX pode triplicar em função de um aumento de temperatura em 10 °C (CORSEUIL e WEBER, 1994). Se a temperatura aumenta muito acima do valor ótimo, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos tornam-se desnaturados e inativos. A temperatura dos primeiros 10 m de subsuperfície pode variar sazonalmente; contudo, entre 10 e 100 m de profundidade, a temperatura se aproxima da média anual da região (LEE et al., 1988). As águas subterrâneas no Brasil tipicamente variam entre 20 a 25 °C, que são valores muito favoráveis à biorremediação.

2.4 – Biodegradabilidade dos hidrocarbonetos BTEX

Os BTEX estão presentes em combustíveis como a gasolina e em menor quantidade no óleo diesel. Estes compostos apresentam maior solubilidade em água que os outros constituintes de combustíveis automotivos, portanto, são os contaminantes que estarão em maior quantidade na água subterrânea quando os poluentes atingirem o lençol freático, e

devido aos efeitos maléficos à saúde humana causados por esses compostos é de fundamental importância estudar a capacidade de microrganismos promoverem a sua degradação.

A habilidade de microrganismos degradarem BTEX é conhecida desde 1908, quando Stormer isolou a bactéria *Bacillus hexabovorum* que apresentou capacidade de crescer aerobiamente em meio contendo tolueno e xileno. A existência de degradadores de BTEX é fato largamente aceito, além disso, estes microrganismos estão amplamente distribuídos. A capacidade de microrganismos naturais do solo em degradar BTEX foi primeiro demonstrada por Gray e Thornton em 1928. Estes pesquisadores encontraram, entre 245 espécies de bactérias presentes em amostras de solos não contaminados, 146 capazes de degradar hidrocarbonetos (GIBSON e SUBRAMANIAM, 1984 *apud* CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

Na biodegradação do BTEX, como de outras substâncias, é necessário que haja uma indução de enzimas degradadoras apropriadas. Este processo envolve a ativação de regiões específicas do genoma bacteriano. Quando alguns substratos alvos estão presentes, as bactérias iniciam reações bioquímicas em cascata que resultam na transcrição de genes (plasmídios) que codificam a síntese das enzimas necessárias para degradar o composto alvo. Com relação à degradação do BTEX, muitas enzimas requerem indução, e o indutor (p.e. tolueno) deve estar presente em concentrações mais altas que o limite mínimo de indução (LINKFIELD et al., 1989). Em geral esse limite é bastante baixo e a indução de enzimas dificilmente é um fator limitante na biorremediação de BTEX. Além disto, contaminações de BTEX são geralmente descobertas vários anos após a ocorrência do vazamento, e significativa aclimação microbiológica e indução de enzimas pode ocorrer durante este período (CHAPELLE, 1993).

Alguns estudos com *Pseudomonas putida* identificaram vias metabólicas dedicadas aos componentes benzeno, tolueno e p-xileno. Lee et al. (1994) provaram que a via de metabolização do tolueno, codificada pelo plasmídio TOL, em misturas desses compostos, não utiliza o benzeno como substrato. A degradação do tolueno é iniciada com uma oxidação e podem ser formados cinco diferentes produtos de oxidação por *P. putida* contendo tolueno 2,3-dioxigenase, uma enzima que oxida o anel aromático do tolueno incorporando 1 átomo de oxigênio molecular. Nesta reação, tolueno cis-dihidrodiol, um intermediário formado, é convertido no ciclo de Krebs (PARALES et al., 2000). Xilenos podem também sofrer a mesma reação oxidativa para o benzil-álcool e então para um intermediário do ciclo de Krebs. Somente a via codificada pelo plasmídio TOD pode utilizar benzeno como substrato.

Nos ensaios de biodegradação de Otenio (2000), foi testada a ação da bactéria *Pseudomonas putida* CCMI 852, isolada de uma estação de tratamento de esgoto doméstico, sobre benzeno, tolueno e xilenos, individualmente e suas misturas. Os resultados confirmaram a caracterização genotípica da bactéria, avaliando a presença do plasmídeo TOL, que possibilita o metabolismo de tolueno e xilenos e suas misturas, e não metabolismo do benzeno. O trabalho ainda concluiu que a presença do benzeno nas misturas inibe a ação da bactéria sobre os substratos tolueno e xilenos.

Quando células bacterianas foram expostas a misturas de compostos aromáticos presentes em concentrações iguais, as vias de degradação foram modificadas substancialmente, comparando-se com os dados obtidos quando os substratos estavam individualizados. Os compostos BTEX foram degradados na seguinte seqüência: etilbenzeno, tolueno, benzeno e xilenos (DEEB e ALVAREZ-COHEN, 1999).

Substratos facilmente biodegradáveis presentes em adição ao BTEX podem ser utilizados preferencialmente e com isso limitar a indução de enzimas degradadoras de BTEX. Este pode ser um fato importante no Brasil, onde a gasolina automotiva contém 22% de etanol, um substrato facilmente degradável. Neste caso, uma fase inicial de adaptação (fase *lag*) pode ser observada, durante a qual o etanol é degradado antes que qualquer biodegradação significativa de BTEX ocorra.

Para Corseuil e Marins (1997) e Barker et al. (1987), todos os álcoois primários podem ser biodegradados em preferência ao BTEX e consumir o oxigênio disponível, além de ser tóxico ou inibitório ao crescimento dos microrganismos degradadores de BTEX.

Hubbard et al. (1994) realizaram experimentos com três tipos de combustíveis: (1) 100% gasolina – para o controle, (2) 10% MTBE e 90% gasolina e (3) 85% metanol e 15% gasolina, que foram adicionados à água subterrânea. Ao final de 16 semanas de experimento, 93% e 88% dos BTEX foram degradados no controle e na pluma de gasolina com MTBE, respectivamente, ao passo que apenas 69% dos BTEX na pluma de metanol com gasolina desapareceram.

Concordando com a experiência anterior, Santos (1996) verificou a degradação preferencial do etanol por parte dos microrganismos, com isso retardando a degradação dos compostos BTEX. Em seu experimento, uma amostra do contaminante puro foi totalmente consumida em menos de quatro dias, ao passo que misturado a uma grande concentração de etanol (300 mg/l), em doze dias não foi verificada biodegradação significativa.

Corseuil e Kulkamp (2003) investigaram a atenuação natural em um derramamento controlado de etanol e diesel. Resultados mostraram que o etanol presente na água subterrânea agia como consumidor de aceptores de elétrons e nutrientes que poderiam estar disponíveis para a bioatenuação dos compostos mono e poliaromáticos. Indicadores geoquímicos mostraram que degradação aeróbia, redução de ferro e metanogênese eram os principais processos biológicos responsáveis pela degradação do etanol. Enquanto o etanol estava sendo degradado, a concentração aquosa de BTEX e PAHs ainda estava aumentando perto da fonte do vazamento. Degradação preferencial do etanol foi indicada pelo aumento da concentração de acetato e diminuição do pH em uma ordem de magnitude. A presença de grande quantidade de metano após 540 dias de contaminação mostra que as plumas de BTEX e PAHs podem ter uma longa fase *lag* antes da biodegradação e tornar-se o mecanismo de atenuação desses compostos. Esta fase *lag* na área contaminada antes da biodegradação é dependente não somente da taxa de degradação do etanol, mas também de seus subprodutos acetato e metano.

Chiang et al. (1989), num estudo de biodegradação aeróbia de BTEX num aquífero arenoso raso, reforçaram a idéia de que a quantidade de BTEX na água subterrânea está diretamente relacionada com a disponibilidade de oxigênio dissolvido. Observaram que quando a concentração de oxigênio dissolvido era maior que 0,9 ppm a concentração de BTEX estava ausente.

Spilborghs (1997) verificou em sistema de microcosmo o comportamento de um vazamento de gasolina na subsuperfície. Através do sistema de biorremediação *air sparging* todos os compostos BTX foram degradados num período máximo de 126 dias. As concentrações iniciais desses compostos eram de 289 mg/L de benzeno, 308 mg/L de tolueno e 230 mg/L de xilenos. O tolueno foi biodegradado mais rapidamente (98 dias) seguido do benzeno (112 dias) e finalmente os xilenos.

Outras pesquisas também foram realizadas analisando-se a biodegradação de BTEX em condições anaeróbias. Hutchins et al. (1991c) num estudo de otimização da degradação de BTEX sob condições desnitrificantes, efetuaram testes em laboratório com amostras vindas de um aquífero da cidade de Traverse, em Michigan. Neste estudo foram criados microcosmos onde foram adicionadas diferentes concentrações de nitrato e nutrientes a substratos com um ou mais hidrocarbonetos. Os resultados mostraram que tolueno, etilbenzeno, m-xileno e p-xileno foram degradados até concentrações abaixo de 5 µg/L quando presentes como única fonte de substrato. O isômero o-xileno foi recalcitrante quando presente como única fonte de

substrato, mas foi degradado vagarosamente na presença de outros hidrocarbonetos. O benzeno não foi degradado dentro de 1 ano, mesmo quando em combinação com tolueno, fenol ou catecol. Esse estudo mostrou uma variedade de condições ambientais com taxas relativamente independentes das concentrações de nutrientes. Entretanto, os dados mostraram que o benzeno é recalcitrante sob condição estritamente anaeróbia.

Uma avaliação da biorremediação usando oxigênio, nitrato ou óxido nitroso como receptor de elétrons (HUTCHINS et al., 1991b) foi efetuada em microcosmos preparados com material de aquífero contaminado com hidrocarbonetos monoaromáticos. Os resultados mostraram que benzeno e alquilbenzeno foram degradados dentro de 7 dias sob condições aeróbias, enquanto que somente o alquilbenzeno foi também degradado na presença de nitrato e óxido nitroso.

Hutchins et al. (1992) estudaram em laboratório a biodegradação de BTEX em colunas preenchidas com material de aquífero sob condições microaerofílicas e de desnitrificação. Foram estudadas três colunas, a primeira sob condição microaerófila, a segunda sob condição microaerófila mais nitrato e a terceira somente com nitrato. Os resultados mostraram que os alquilbenzenos podem ser degradados sob condição de desnitrificação, sempre que o ambiente for microaerófilo. O benzeno pode ser degradado sob condição microaerófila, mas se mostrou recalcitrante no tratamento apenas com nitrato. Não foi apresentado nenhum efeito adverso com a adição de nitrato em ambientes microaerófilos, indicando que a mistura oxigênio/nitrato pode ser usada para a biorremediação de aquíferos contaminados com BTEX. Os resultados mostraram que o nitrato foi necessário para uma boa remoção de TEX embora alguma remoção ocorra sem adição de nitrato.

2.5 – Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos

Os microrganismos são os principais agentes responsáveis pela ciclagem do carbono na natureza. Em muitos ecossistemas existe uma comunidade autóctone de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos (hidrocarbonoclasticos) (KATAOKA, 2001).

Os primeiros estudos da utilização de hidrocarbonetos por microrganismos foram realizados por Sohnger e Kaserer em 1906 (BUSHNELL e HAAS, 1941). Em 1913, Sohnger relatou que gasolina, querosene, parafina e óleo de parafina poderiam ser oxidadas a CO₂, água e traços de ácidos orgânicos por microrganismos. Os microrganismos estudados pertenciam principalmente aos gêneros *Mycobacterium* e *Pseudomonas*.

Gray e Thornton (1928) isolaram vários organismos capazes de decompor compostos aromáticos como naftaleno, tolueno, cresol e fenol pertencentes aos seguintes gêneros: *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Bacterium*, *Bacillus* e *Spirillum*.

A habilidade em degradar hidrocarbonetos não é restrita a apenas alguns gêneros de microrganismos, pois, vários grupos de bactérias, fungos e actinomicetos têm mostrado possuir essa capacidade (KATAOKA, 2001).

Zobell (1946a), em uma extensa revisão sobre a ação dos microrganismos nos hidrocarbonetos, descreveu que muitas espécies têm a habilidade de utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia e que estes microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza. Observou o autor que mais de 100 espécies de 30 gêneros microbianos foram capazes de utilizar hidrocarbonetos.

Komagata et al. (1964) examinaram cerca de 500 espécies de leveduras quanto à capacidade de utilizar hidrocarbonetos. Destas, 56 espécies possuíam esta capacidade, sendo que a maioria delas pertencia ao gênero *Candida*. Ahearn et al. (1971) isolaram espécies de *Candida*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sacharomyces*, *Sporobolomyces* e *Trichosporom*, todas capazes de metabolizar hidrocarbonetos.

Gutnick e Rosenberg (1977) postularam 3 características essenciais para a utilização de hidrocarbonetos pelos microrganismos:

- um sistema eficiente de absorção de hidrocarbonetos com sítios especiais de ligação e/ou produção de substâncias emulsificantes para o transporte do hidrocarboneto ao interior da célula;
- enzimas oxigenases específicas;
- especificidade induzida – resposta positiva do organismo ao hidrocarboneto.

Deste modo, os vários meios que os microrganismos têm desenvolvido a fim de solucionar estes três problemas provavelmente contribuem para o fato de mais de 200 espécies diferentes terem sido descritas com capacidade de utilização de hidrocarbonetos (KATAOKA, 2001).

Leahy e Colwell (1990) citam os seguintes gêneros de bactérias como os mais importantes: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas*. Kadri et al. (1986), Shamshoom et al. (1990), Sorkhoh et al. (1990), Al-Hadhrami et al. (1995), estudando a distribuição de bactérias que

degradam hidrocarbonetos, identificaram: *Acinetobacter sp.*, *Aeromonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Klebsiella cepacia*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella phenylpiruvica*, *Nocardia sp.*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Vibrio fisheri* e *Xanthomonas maltophilia*.

Em uma revisão sobre estudos ecológicos de bactérias que degradam hidrocarbonetos, Rosemberg e Gutnick (1981) verificaram que estes microrganismos estão potencialmente localizados em todas as áreas naturais, embora apresentem grandes variações em suas concentrações celulares. Nestes estudos, os pesquisadores investigaram a relação entre bactérias degradadoras de hidrocarbonetos e o total de bactérias heterotróficas no solo. Seus trabalhos demonstraram que a variabilidade dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos encontradas em um ecossistema particular mudou de acordo com o período em que se realizou a amostragem e a extensão da poluição com o resíduo.

Pinholt et al. (1979) verificaram que a população de bactérias hidrocarbonoclasticas variou de 10^6 a 10^7 por grama de solo seco, concordando com os resultados apresentados por Jensen (1975) e Raymond et al. (1976). O autor concluiu ainda que pela restrita quantidade de biomassa de fungos e dada a resposta bacteriana aos hidrocarbonetos, há indicação de maior atividade das bactérias na decomposição dos hidrocarbonetos.

Venkateswaram e Harayama (1995), através do enriquecimento de culturas, isolaram uma população bacteriana capaz de degradar petróleo bruto, verificando que 28-51% da fração saturada e 0-18% da fração aromática presentes foram biodegradadas por uma cultura mista. Contudo, quando as culturas foram colocadas puras, nenhuma delas apresentou melhor degradação do que quando estavam consorciadas. As espécies isoladas foram *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas vesicularis*, *Pseudomonas diminuta*, *Moraxella sp.*, *Sphingobacterium sp.* e *Ochrobactrum sp.*

Em uma cultura mista, o produto metabólico pode ser degradado por uma outra espécie e o ataque de outros microrganismos pode levar a uma completa degradação do produto, mesmo que dentro da comunidade não exista um microrganismo capaz de degradá-lo totalmente (KATAOKA, 2001).

Deste modo, estudos realizados com cultura mista possuem vantagens sobre estudos realizados com cultura pura. A primeira e mais importante é que a capacidade biodegradativa de uma comunidade é muito maior quantitativa e qualitativamente. Segundo, a resistência da

comunidade a substâncias tóxicas pode ser muito maior porque há uma maior probabilidade de que um organismo que possa detoxificá-las esteja presente, e finalmente, o fato de que a mineralização de compostos xenobióticos algumas vezes requer a união da atividade de múltiplas enzimas (GRADY, 1985).

Entretanto, devido a grande dificuldade de análise de misturas complexas, a maioria dos trabalhos realizados sobre microrganismos que degradam hidrocarbonetos têm sido realizados envolvendo o crescimento de um único microrganismo sobre um único hidrocarboneto ou uma classe de hidrocarbonetos relacionados (KATAOKA, 2001).

Além das bactérias, os fungos representam importante papel na degradação dos hidrocarbonetos no solo, suas enzimas extracelulares podem proporcionar substratos para o crescimento de bactérias através da hidrólise de polímeros e também importantes metabólitos secundários. O mecanismo da degradação de hidrocarbonetos por fungos têm sido menos estudado, mas provavelmente envolve oxigenases induzíveis similares as apresentadas por *Mycobacterium* e *Nocardia* (RUDD et al., 1996).

A habilidade dos fungos em utilizar hidrocarbonetos ocorre principalmente em duas ordens: Mucorales e Moniliales. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* possuem muitas espécies que assimilam hidrocarbonetos, contudo, esta característica é uma propriedade individual da espécie e não necessariamente uma característica particular do gênero (RISER-ROBERTS, 1992).

Ao contrário das bactérias e leveduras que mostram decréscimo na capacidade de degradação de alcanos com o aumento da cadeia do composto, os fungos filamentosos parecem ser mais hábeis em degradar ou transformar hidrocarbonetos de estrutura complexa e de cadeia longa. Entretanto, o metabolismo dos fungos geralmente resulta numa degradação incompleta que necessita da associação de bactérias para alcançar a completa oxidação do composto (RISER-ROBERTS, 1992).

De acordo com Atlas (1995), durante a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias há a formação de cis-diols, enquanto que durante a biodegradação por fungos formam-se trans-diols. Uma vez que muitos trans-diols são potentes carcinogênicos e que os cis-diols não são ativos biologicamente, a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias resulta em sua detoxificação sem produção de carcinógenos potenciais.

Atualmente, grande atenção tem sido dada à biodegradação de hidrocarbonetos por fungos da podridão branca da madeira. Dentre estes, *Phanaerochaete chrysosporium* tem sido

usado como organismo modelo na maioria destes estudos. Embora o substrato natural degradado por este fungo seja a lignina, o complexo enzimático por ele secretado pode degradar grande variedade de poluentes recalcitrantes. Esta habilidade tem sido explicada pela similaridade estrutural destes poluentes por porções da estrutura da lignina e a baixa especificidade das ligninases produzidas por *P. chrysosporium* (BRODKORB e LEGGE, 1992).

Algumas cianobactérias e algas também possuem a capacidade de utilizar hidrocarbonetos, dentre elas destacando-se os gêneros: *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Ulva* (ATLAS, 1981).

Pelos trabalhos anteriormente mencionados, pode-se afirmar que microrganismos que degradam hidrocarbonetos têm sido isolados de todos os tipos de ambientes nos quais foram pesquisados, parecendo provável que qualquer ambiente possa ter ao menos uma pequena população destes organismos (BAZYLINSKI et al., 1989) e que esta população aumenta após a adição destes compostos no solo (PINHOLT et al., 1979). Assim, a proporção de microrganismo hidrocarbonoclasticos dentro da comunidade microbiana depende do grau de exposição do ambiente ao poluente. De acordo com Riser-Roberts (1992), em ecossistemas não poluídos, estes microrganismos constituem menos de 1 % da comunidade microbiana e em ecossistemas poluídos podem chegar a constituir 100 % da comunidade. Le Petit et al. (1977) verificaram que 10 % do total de bactérias isoladas de um efluente de refinaria de petróleo eram bactérias hidrocarbonoclasticas e que somente 4 % dessas bactérias foram isoladas em uma área não poluída.

2.6 – Métodos de avaliação da biodegradação em laboratório

Para demonstrar que uma tecnologia de biorremediação é potencialmente útil, é importante verificar a biodegradação dos poluentes sob condições controladas. Isto geralmente não é possível de se obter *in situ*, assim, esta verificação deve ser obtida através de experimentos laboratoriais, os quais demonstram o potencial que um determinado tratamento pode ter em estimular a remoção de xenobióticos de um local contaminado (BAILEY et al., 1973). Experimentos laboratoriais que mais se aproximam das condições reais do ambiente são provavelmente os mais capazes de produzirem resultados relevantes (BERTRAND et al., 1983). Em muitos casos, isto envolve o uso de amostras coletadas no campo que contenham populações microbianas autóctones. Em tais experimentos é importante incluir controles que possam diferenciar fatores abióticos como a evaporação e a fotodegradação das taxas de

biodegradação. Os experimentos não excluem a necessidade de demonstrações em campo, contudo são críticos para se estabelecer a credibilidade científica de uma determinada estratégia de biorremediação (ATLAS, 1997).

Os parâmetros tipicamente medidos em testes laboratoriais da eficiência da biodegradação incluem a contagem de microrganismos heterotróficos totais, contagem de microrganismos degradadores de um ou de vários substratos específicos, medidas da taxa de respiração microbiana (consumo de oxigênio e/ou produção de dióxido de carbono) e a determinação das taxas de degradação (desaparecimento de poluentes individualmente e/ou na totalidade) (SONG et al., 1990; BALBA et al., 1998; OH et al., 2000; KATAOKA, 2001).

A presença de grande população de microrganismos heterotróficos totais não apresenta necessariamente correlação direta com a biodegradação, porém, a quantificação da fração da comunidade que degrada o resíduo de interesse tem sido utilizada como um dos métodos mais comuns para o monitoramento de poluição ambiental com hidrocarbonetos (KATAOKA, 2001). Song e Bartha (1990), estudando o efeito da adição de combustível de avião sobre a comunidade microbiana do solo, verificaram que, após 2 semanas, cerca de 90% dos microrganismos heterotróficos do solo eram degradadores de hidrocarbonetos, ainda que a porcentagem inicial destes microrganismos representasse somente 0,01% da população de heterotróficos aeróbios.

Os métodos respirométricos (consumo de oxigênio e/ou produção de dióxido de carbono) podem ser utilizados como um primeiro teste para se avaliar a pronta ou inerente biodegradabilidade de poluentes em solo ou água. Estes testes são geralmente conduzidos sob condições ótimas com respeito à umidade, temperatura, nutrientes minerais, inoculação microbiana e aeração (se o teste é aeróbio). Testes que obtêm uma conversão de 30 % (CETESB, 1990) ou 50 a 60% (ATLAS, 1997) a CO₂ dentro de um específico período de tempo, indicam que, sob condições apropriadas, os poluentes serão biodegradados pelos microrganismos.

Uma possível maneira de se conduzir experimentos respirométricos é através do respirômetro de Bartha & Pramer, cujo método é utilizado na determinação da taxa de biodegradação da matéria orgânica contida em resíduos presentes em solos (CETESB, 1990). Kataoka (2001), utilizando o respirômetro de Bartha & Pramer, avaliou a biodegradação de borra oleosa, um resíduo proveniente de refinaria de petróleo, em solo de *landfarming*. Esta mesma metodologia foi utilizada em Siviero (1999), Souza (2000), Siviero et al. (2000),

Inazaki et al. (2004), Crivelaro (2005), Hencklein (2005), Guerra e Angelis (2005) e Mariano et al. (2005, 2006a, b e c).

Freijer et al. (1996), avaliando a produção de CO₂ como um parâmetro da biodegradação de hidrocarbonetos, concluíram que para conteúdos de hidrocarbonetos maiores que 1,0 g/kg de solo, a produção de CO₂ está fortemente relacionada ao consumo de hidrocarbonetos, entretanto, para conteúdos menores que 1,0 g/kg de solo, a produção de CO₂ aumentava abruptamente, isto provavelmente devido à menor disponibilidade de hidrocarbonetos, o que ocasionou aumento relativo da mineralização da biomassa morta, proporcionando diminuição na porção da mineralização de hidrocarbonetos em relação à produção total de CO₂.

Indubitavelmente, a medida mais direta da eficiência da biodegradação é o monitoramento da taxa de consumo dos poluentes. A caracterização dos componentes individuais de uma classe específica de hidrocarbonetos exige o uso da cromatografia líquida de alta precisão (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG) acoplada a um detector (p.ex., o espectrômetro de massa (CG-EM)) (FERRARI, 1996). Segundo Blackburn et al. (1993), a combinação das técnicas CG/EM é o método mais eficaz para a quantificação de um resíduo oleoso, pois, combina a resolução do ponto de ebulição com informações sobre o tipo de molécula dos compostos. Outro detector muito utilizado na determinação dos BTEX e PAHs é o detector de ionização por chama (FID) (CETESB, 2003).

2.7 – Processo de intemperização do óleo diesel

A composição de um produto quando lançado ao meio ambiente começa a transformar-se quase imediatamente por causa de inúmeros processos bioquímicos e físicos. A geoquímica relacionada a hidrocarbonetos é descrita em detalhes por Kaplan et al. (1997). De acordo com os pesquisadores, os hidrocarbonetos lançados ao meio ambiente estão sujeitos a reações bióticas e abióticas no solo e na água subterrânea. Estes processos atuam juntos, com uma taxa de transformação relacionada com a composição química do combustível e fatores ambientais locais, incluindo temperatura, umidade do solo e conteúdo de nutrientes e oxigênio. A granulometria do solo também é um importante parâmetro para controlar os processos de intemperização. A maioria das reações abióticas inclui a hidrólise, a desidrogenação, a oxidação e a polimerização (LYMAN et al., 1992). Estas reações ocorrem comitantemente com as transformações microbianas ao longo do perfil do solo. A intemperização biótica de hidrocarbonetos consiste em dois mecanismos independentes:

absorção microbiana (BAUGHMAN e PARIS, 1981) e regime metabólico (SINGER e FINNERTY, 1984). Estas transformações são prováveis de acontecerem em etapas, produzindo álcoois, fenóis, aldeídos e ácidos carboxílicos, em seqüência. A biodegradação é o principal processo de intemperização de destilados médios, como o óleo diesel (KAPLAN et al., 1997).

O óleo diesel contem de 2000 a 4000 hidrocarbonetos que compõem uma mistura de compostos de cadeias lineares e ramificadas, cicloalcanos e compostos aromáticos obtidos da destilação da fração média do petróleo (GALLEGO et al., 2001). Alguns desses compostos podem ser usados como indicadores na avaliação da intemperização do óleo diesel. Mudanças na razão das concentrações de hidrocarbonetos como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) são devidas principalmente a processos de evaporação e dissolução. Estes compostos são caracterizados pela alta pressão de vapor e relativa solubilidade em água. Benzeno e tolueno dissolvem preferencialmente na água subterrânea quando comparados com o etilbenzeno e os xilenos, os quais têm menor solubilidade e são mais recalcitrantes à biodegradação (KAPLAN et al., 1997).

Os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) são outra ferramenta útil no monitoramento das alterações ambientais. Alguns dos HPA presentes no óleo diesel estão entre os menos afetados pela intemperização. Estes compostos semi-voláteis com baixa solubilidade e características recalcitrantes podem persistir por um longo período no ambiente.

O processo de intemperização também pode ser avaliado analisando os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). Neste caso, perfis cromatográficos de um óleo diesel inalterado, geralmente apresenta uma resolução satisfatória para n-alcenos e alguns isoprenóides como o pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) e o fitano (2,6,10,14-tetrametilhexadecano). Entretanto, a maior fração do óleo diesel não é caracterizada porque a maioria dos componentes não podem ser resolvidos e estes aparecem nos cromatogramas como uma “lombada”, que é chamada de “mistura complexa não resolvida (MCNR)”, a qual presumidamente inclui alcenos ramificados e cíclicos e produtos das transformações (MARCHAL et al., 2003; BREGNARD et al., 1996). Os hidrocarbonetos resolvidos são chamados “hidrocarbonetos totais resolvidos (HTR) e os HTP são a soma dos HTR com a MCNR. Os HTR são hidrocarbonetos não degradados, e aparecem como picos nos cromatogramas.

Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos usualmente degradam alcanos ramificados e compostos isoprenóides em velocidades menores que os alcanos de cadeias lineares. Portanto, a razão de alcanos lineares em relação aos compostos altamente ramificados pode refletir a extensão de degradação do óleo diesel causada por microrganismos (BALBA et al., 1998). Nos cromatogramas a “lombada” correspondente à MCNR torna-se maior e os picos dos HTR diminuem devido à biodegradação.

2.8 – Produção de biossurfactantes utilizando-se matérias primas alternativas

Os surfactantes são uma ampla classe de moléculas anfipáticas (com domínio polar e apolar) que são capazes de diminuir as tensões superficial e/ou interfacial entre gases, líquidos e sólidos com uma grande variedade de aplicações, tanto industriais como na limpeza de locais contaminados com hidrocarbonetos. Contudo, surfactantes sintéticos mostram alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e eficiência somente em faixas pequenas de pH e temperatura. Devido a essas limitações, o interesse pelos biossurfactantes (surfactantes de origem microbiana), produzido por certas bactérias, leveduras e fungos, tem aumentado devido à baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficiência em valores de temperatura, pH e salinidade extremos e seu papel na recuperação de ecossistemas pela aceleração da biodegradação dos hidrocarbonetos provenientes de vazamentos. Além disso, alguns biossurfactantes apresentam capacidades anti-fúngicas, anti-virais e de sorção de metais e são usados na indústria do petróleo para aumentar a recuperação do petróleo (OLIVEIRA et al., 2005; PRUTHI e CAMEOTRA, 1997).

Contudo, a viabilidade comercial dos biossurfactantes é ainda limitada pelos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação e ao uso de matérias primas de alto valor (proteínas) (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Estes custos podem ser significativamente minimizados com o desenvolvimento de processos mais eficientes e o uso de matérias primas de baixo custo, que correspondem de 10 a 30% do custo total (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). Os biossurfactantes podem ser produzidos comercialmente em níveis de até 100 g.L⁻¹, como reportado para os raminolipídios produzidos por *Pseudomonas* (MAIER e SOBERON-CHAVEZ, 2000). A combinação desse nível de produção com o uso de matérias primas de baixo custo como resíduos orgânicos, pode diminuir o custo dos biossurfactantes a patamares competitivos em relação ao surfactante sintético (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002). Substratos alternativos para a produção de biossurfactantes têm sido sugeridos (KOSARIC et al., 1984; MERCADÉ, 1994; MAKKAR e

CAMEOTRA, 2002), especialmente resíduos agrícolas miscíveis em água como o soro de leite, manipueira (água derivada da prensagem de mandioca) ou resíduos de destilarias (BABU et al., 1996; PATEL e DESAI, 1997; DANIEL et al., 1998 e 1999; COPPEDE et al., 2005; LIMA et al., 2005, NITSCHKE e PASTORE, 2006). No entanto, poucos exemplos são encontrados do uso de resíduos hidrofóbicos como o óleo residual de frituras (HABA et al., 2000; JACKISCH-MATSURA e DURRANT, 2005), óleo lubrificante usado (MERCADÉ et al., 1996) e borra oleosa de refinarias de petróleo (PIRÔLLO, 2006). Assim, muitos estudos relacionados aos biossurfactantes, atualmente, referem-se à busca de fontes de matérias primas alternativas como uma das possibilidades de diminuição de custos de produção (MARIANO et al., 2006d).

2.9 - Vinhaça

A vinhaça é um subproduto do processo de destilação do álcool, cuja disposição representa um importante problema ambiental principalmente devido ao grande volume gerado e sua alta demanda biológica de oxigênio (DBO). Em média, para produzir um litro de álcool, 10 a 15 litros de vinhaça são produzidos, dependendo da qualidade da cana e do processo industrial (CORTEZ et al., 1992), o que corresponde a aproximadamente 170 bilhões de litros por ano desse resíduo no Brasil (AGRIANUAL, 2004). Considerando que cada 2 litros de vinhaça são equivalentes ao esgoto doméstico gerado por uma pessoa por dia (LUKSSEMBERG et al., 1980 *apud* GONÇALVES e SILVA, 2000), a produção anual de vinhaça corresponde a uma quantidade de esgoto doméstico produzido por uma população estimada de 232 milhões de pessoas durante um ano.

Este resíduo é um líquido âmbar claro consistindo basicamente de água (93%), sólidos orgânicos e minerais (7%). Sua composição química é variável, dependendo, entre outros fatores, da disponibilidade de água, características da cana de açúcar e dos processos de fermentação e destilação empregados (FERRAZ et al., 1986). A vinhaça apresenta alta turbidez e pH baixo, com altos níveis de matéria orgânica (principalmente glicerol, um fonte de carbono solúvel), potássio, cálcio e quantidades moderadas de nitrogênio e fósforo (RODELLA et al., 1983; TAUKE, 1987; GÓMEZ e RODRÍGUEZ, 2000).

No Brasil é freqüente a disposição da vinhaça nos campos agrícolas, um processo chamado ferti-irrigação, como um substituto parcial ou total de fertilizantes minerais, principalmente potássio. Este procedimento é mais aceitável ambientalmente que o antigo meio de disposição, quando a vinhaça era descartada nos rios próximos às usinas, e tem uma boa receptibilidade pelas usinas devido a sua simplicidade técnica e vantagens econômicas

(CORAZZA, 1999). No Estado de São Paulo, onde a maior parte das plantações de cana se localiza, este procedimento é controlado por uma legislação específica que determina como calcular a dosagem de vinhaça no solo (CETESB, 2005b). A adição de vinhaça em taxas adequadas tem demonstrado aumentar o rendimento na produção da cana de açúcar, contudo, a longo prazo, a aplicação intensiva da vinhaça pode aumentar a salinidade do solo (CORAZZA, 1999), afetar a qualidade da cana e contaminar a água subterrânea (GONÇALVES e SILVA, 2000). Alguns trabalhos mostram que a vinhaça pode modificar temporariamente algumas características químicas e biológicas do solo, como pH, carbono orgânico, acidez trocável (CAMARGO et al., 1987) e a atividade microbiana e biomassa (MINHONI e CERRI, 1987). Ramalho e Sobrinho (2001) verificaram que o uso da vinhaça em larga escala não altera significativamente a concentração de metais pesados no solo. Fontes (1988), Cardoso (1988) e Itamar (1987) observaram que a vinhaça aumenta as concentrações de cálcio, magnésio, matéria orgânica e principalmente potássio, causando uma elevação da condutividade elétrica do solo.

Considerando que a produção de etanol no Brasil está em expansão devido a crescente demanda interna e internacional por fontes alternativas de energia e que o solo tem uma capacidade de suporte limitada para receber a vinhaça, a busca por alternativas para tratar ou reutilizar a vinhaça é crucial. Corazza (1999) relata tecnologias alternativas onde a vinhaça é reciclada no processo de fermentação, tratada em reatores anaeróbios, ou usada para produzir extrato de levedura, ração animal e também empregada na construção civil. Em relação ao uso da vinhaça como um agente intensificador da biodegradação de poluentes, Prata et al. (2001) avaliaram os efeitos da vinhaça na degradação e sorção do herbicida ametrina. A adição da vinhaça aumentou a atividade microbiana e a degradação da ametrina, e a sorção não foi afetada. Crivelaro (2005) estudou o uso da vinhaça como agente acelerador da biodegradação de borra oleosa em solo. Foi observado um aumento na população microbiana, principalmente fungos, e um ligeiro aumento da eficiência da biodegradação.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de solo e água subterrânea foram coletadas em três postos de combustíveis localizados nas cidades paulistas de Santa Bárbara d'Oeste, Águas de São Pedro e Rio Claro, sendo que neste último apenas solo foi coletado. As amostras bem como os postos de combustíveis foram designados de acordo com as seguintes siglas: SB, ASP e RC, respectivamente.

3.1 – Avaliação da biorremediação natural da água subterrânea no posto de combustíveis SB

A biorremediação natural da água subterrânea contaminada com óleo diesel no posto de combustíveis SB foi avaliada mediante o monitoramento de indicadores geoquímicos e microbiológicos. A área foi monitorada durante dois anos (entre Maio de 2004 e Abril de 2006) e neste período foram realizadas quatro coletas de amostras de água subterrânea, cada uma avaliada quanto aos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e concentração de hidrocarbonetos.

3.1.1 – Descrição da área

A descrição da área é baseada em relatórios fornecidos pela empresa *Geoinform – Pesquisas Geológicas S/C Ltda*, com sede no município de Rio Claro.

O posto de combustíveis está localizado no município de Santa Bárbara d'Oeste (22° 45' 15'' S e 47° 24' 58'' W) à 138 km da capital paulista. Geologicamente situa-se na Bacia Sedimentar do Paraná em área onde ocorrem o Sistema Aquífero Tubarão (ou Itararé) e os aquíferos Diabásio e Cenozóico, cada qual com diferentes características de circulação de água subterrânea (WATERLOO, 1999).

No ano de 1994 foi constatado vazamento em um tanque de armazenamento subterrâneo de combustível com óleo diesel, o qual, na época, foi imediatamente isolado e retirado. Os trabalhos de avaliação de impacto ambiental na área começaram em 1999. Inicialmente foram conduzidas 12 sondagens de solo, seguido da instalação de 4 poços de monitoramento. Nesta avaliação inicial não foi verificada a presença de fase livre de combustível, tanto nos furos das sondagens como na instalação dos poços de monitoramento (WATERLOO, 1999).

A região próxima ao posto de combustíveis é caracterizada por uma ocupação essencialmente residencial, com ocorrência de alguns comércios locais de pequeno porte, não sendo observada grandes lojas comerciais, *shopping center*, terminais de transporte coletivo ou outro tipo de atividade que favoreça a concentração de pessoas. A pavimentação das ruas vizinhas ao posto é de asfalto na sua totalidade, não existindo ruas pavimentadas com paralelepípedos. Na área localizada nas vizinhanças do posto, o abastecimento público de água e a coleta de esgoto são feitos pelo Departamento de Águas e Esgoto (DAE). Em um raio de 500 m a partir do posto, não foi identificado nenhum poço particular ou público de captação de água subterrânea (WATERLOO, 1999).

Na área foram construídos 4 poços de monitoramento para a caracterização hidrogeológica e verificação de contaminação associada à água subterrânea (atualmente somente 3 poços estão disponíveis). Foram identificados quatro horizontes geológicos no local (WATERLOO, 1999): aterro areno-siltoso (0,15 a 0,30 m); silte arenoso levemente consolidado (0,42 a 1,16 m); areia siltosa consolidada (0,90 a 2,85 m); arenito pouco alterado de dureza média a alta (2,85 m).

Na área de interesse foi identificado até a profundidade investigada (em torno de 5 m) um aquífero de caráter livre, anisotrópico e heterogêneo, associado aos tipos litológicos descritos anteriormente. Os três primeiros horizontes não apresentam estratificação sedimentar, sendo a heterogeneidade textural e granulométrica sua característica mais marcante; a estratificação plano-paralela aparece a partir do quarto horizonte e constitui uma importante variável hidrogeológica (WATERLOO, 1999).

A partir de testes de formação do tipo *slug test*, o valor da condutividade hidráulica média obtida foi de $5,38 \cdot 10^{-4}$ cm/s. O nível d'água médio obtido foi de 1,79 m. Com base nas cargas hidráulicas obtidas nos poços de monitoramento, foi elaborado um mapa potenciométrico para a área, o qual é apresentado na Figura 3.1. Nele pode-se observar que o sentido geral de fluxo é de sul para o norte seguindo a topografia local. O gradiente hidráulico

médio observado no mapa potenciométrico é de 3%. Os valores de condutividade hidráulica obtidos para o local são característicos de aquíferos constituídos por materiais silto-arenosos, conforme a classificação de Freeze e Cherry (1979). Segundo o estudo feito por Gelhar et al. (1992), os valores de porosidade total e efetiva para os aquíferos de composições litológicas semelhantes ao da área de interesse são em torno de 25%. A velocidade média de escoamento calculada com base na Lei de Darcy foi de $6,46 \cdot 10^{-5}$ cm/s ou 5,58 cm/dia. Por outro lado, considerando-se o menor e o maior valor de condutividade hidráulica obtidos nos *slug tests*, tem-se que a velocidade da água para a área pode variar entre 1,84 e 12,13 cm/dia (WATERLOO, 1999).

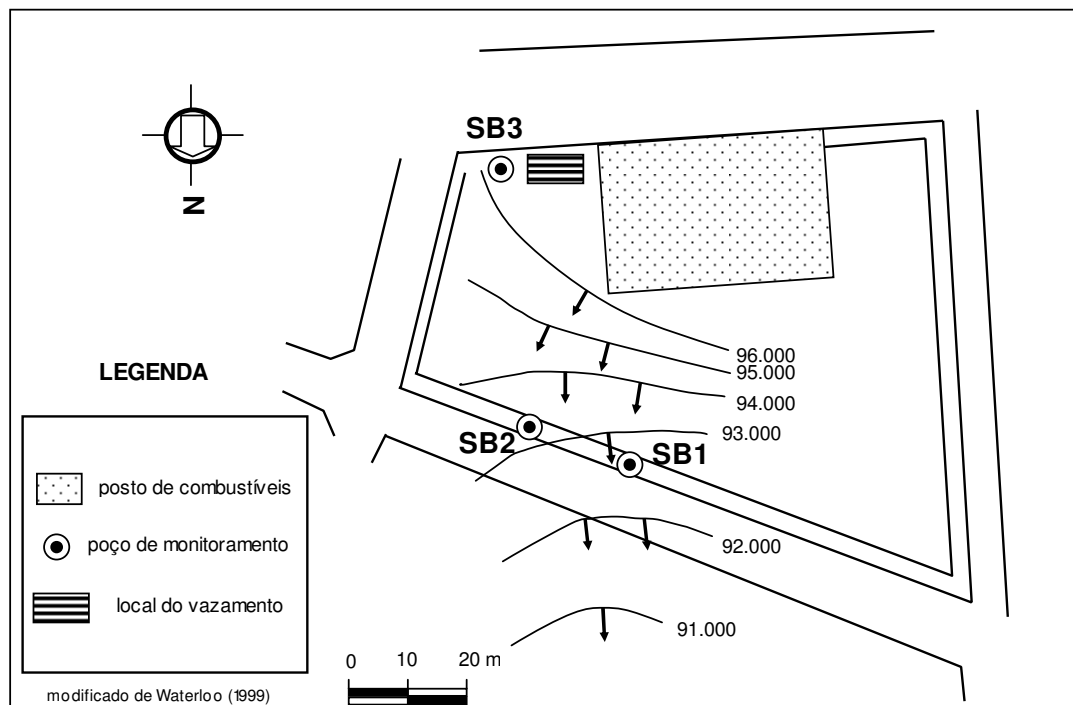


Figura 3.1 - Mapa da área e localização dos poços de monitoramento (Posto SB).

3.1.2 – Amostragem de água subterrânea

Inicialmente em cada ponto de coleta (poços de monitoramento SB1, SB2 e SB3, Figura 3.1) realizou-se a medição da profundidade do nível d'água (nível estático) e em seguida procedeu-se o esgotamento dos poços de monitoramento utilizando-se amostradores descartáveis do tipo *bailer*. Após a recuperação dos poços, realizaram-se medidas de temperatura e condutividade elétrica, ambas com a sonda YSI 3000 TLC e a coleta de água subterrânea com os amostradores *bailer* (Figura 3.2).

As amostras foram transferidas para diferentes frascos de coleta de acordo com a finalidade da análise: hidrocarbonetos BTEX (vial com septo exposto faceado de teflon, 40 mL); hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (frasco de vidro âmbar, 1 L); análises físico-químicas (frascos plásticos, 2 L); análises microbiológicas (tubos de cultura com rosca, 10 mL, previamente autoclavados para assegurar a esterilidade). Os frascos foram mantidos sob refrigeração até a execução das análises.



Figura 3.2 - Coleta de amostra de água subterrânea com amostrador *bailer* descartável (posto SB).

3.1.3 – Análises físico-químicas

Em campo foram realizadas medidas de oxigênio dissolvido (Hanna HI 9142). Determinações de pH (Analion IA601) e Eh (Hanna HI 8314) foram realizadas em laboratório no mesmo dia da coleta. O eletrodo de Ag/AgCl (Orion 9002) utilizado na leitura do potencial redox foi calibrado utilizando-se uma solução contendo um par redox estável e conhecido (ZOBELL, 1946b).

Em laboratório, as concentrações dos íons nitrato, sulfato, fosfato, potássio, cálcio, magnésio e ferroso foram determinadas utilizando-se o espectrofotômetro Hach (DR 2000) (HACH, 1992). A determinação de cloreto foi conduzida utilizando-se o eletrodo íon seletivo

Orion modelo 9417B e o eletrodo de referência Orion modelo 9002 acoplados ao analisador de íons Analion IA601. Para a calibração foram utilizados padrões de concentrações conhecidas e compatíveis com o esperado para as amostras (TONETTO e BONOTTO, 1999).

As determinações de sódio para as três primeiras coletas foram efetuadas por espectrofotometria de absorção atômica (FAAS), com o espectrofotômetro GBC 608 no Laboratório de Geoquímica (LABOGEO) no IGCE/Unesp. Para a última coleta, utilizou-se o eletrodo combinado Orion (8611BN) acoplado ao analisador de íons.

A alcalinidade total foi determinada por titulação usando uma solução padrão de ácido sulfúrico (0,020 N) até que o ponto final fosse evidenciado pela mudança de cor da solução indicadora (HACH, 1992). Os valores obtidos correspondem a concentrações de bicarbonato, já que nem carbonatos ou hidróxidos foram caracterizados.

A análise dos sólidos totais em suspensão (STS) consistiu em separar os sólidos suspensos por filtração de um determinado volume através de membrana Millipore de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade. Após a filtração, levou-se a membrana a secar por um período de 24 horas. Em seguida, efetuaram-se pesagens sucessivas dessa membrana até a obtenção de valores constantes. O valor de STS foi expresso como uma razão entre a massa de material retido e o volume de amostra (TONETTO e BONOTTO, 1999).

As análises de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) e HPA (hidrocarbonetos poliaromáticos) foram realizadas pelo Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química da USP de São Carlos (IQSC) de acordo com as metodologias USEPA 8015 e 8270, respectivamente.

3.1.4 – Análises microbiológicas

A contagem de bactérias heterotróficas totais nas amostras de água subterrânea foi realizada com a técnica *pour plate* em placas de Petri contendo o meio PCA (Acumedia, EUA), incubadas durante 48 h a 35 °C.

As metodologias descritas em Aaronson (1970) foram utilizadas para averiguar a presença na água subterrânea (ponto SB3, 1ª coleta) de bactérias oxidantes de benzeno e tolueno e bactérias do gênero *Pseudomonas* capazes de degradar naftaleno.

A verificação qualitativa da presença de coliformes totais e da bactéria *Escherichia coli* foi realizada com plaqueamento utilizando-se o meio de cultura *chromocult*[®] (Merck, Alemanha). As colônias são diferenciadas pela cor: coliformes totais (violeta) e *E. coli* (rosa).

3.2 – Amostragem de solo nos postos de combustíveis

3.2.1 - Postos de combustíveis ASP e SB

Inicialmente o revestimento de concreto do piso da área foi rompido utilizando-se uma talhadeira (marca BOSCH, modelo SDS-max RTEX 400 mm) acoplada a um martelo/furadeira rompedor (marca BOSCH, modelo GBH 11DE). O procedimento seguinte consistiu na perfuração do solo com trado rotativo manual (Figura 3.3), de diâmetro igual a 2”, até a profundidade dos pontos de coleta. A coleta das amostras de solo foi realizada com *liner* de PVC embutido em um amostrador AMS em aço inox, próprio para esta função. As amostras foram coletadas na profundidade da franja capilar (ASP – 1,60 m; SB – 2,60 m).

As amostras coletadas foram divididas em duas alíquotas. A primeira (~ 400g) foi armazenada em saco plástico destinada ao ensaio de análise granulométrica e a segunda (~ 2 kg) foi acondicionada no mesmo tipo de embalagem e em seguida identificada e armazenada sob refrigeração para a utilização nos ensaios de biodegradação.

A escolha da localização das sondagens considerou os locais de maior probabilidade de ocorrência de contaminação. No posto SB a sondagem foi localizada próximo ao poço de monitoramento 3 (SB3) e ao tanque que apresentou vazamento; no posto ASP a sondagem foi localizada a jusante do tanque que apresentou vazamento.



Figura 3.3 - Realização da sondagem com trado rotativo manual (Posto SB).

3.2.2 - Posto de combustíveis RC

Neste local a amostra de solo foi coletada a 0,50 m de profundidade durante a substituição de tubos subterrâneos (Figura 3.4). A amostra foi acondicionada em saco plástico

e em seguida identificada e armazenada sob refrigeração para a utilização nos ensaios de biodegradação e caracterização físico-química.



Figura 3.4 – Coleta de solo no posto RC.

3.3 – Análises realizadas nos solos

3.3.1 – Caracterização físico-química

A caracterização físico-química do solo foi realizada pelo laboratório “Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo (ICASA)”, de acordo com a metodologia Embrapa (1997), com exceção das seguintes análises:

- nitrogênio total (Laboratório PIRASOLO - Laboratório Agrotécnico Piracicaba) (EMBRAPA, 1997);
- análise granulométrica;
- umidade.

A análise granulométrica das amostras SB e ASP foi realizada no Laboratório de Geotécnica do Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas da Unesp, campus de Rio Claro. A análise seguiu o que preconiza a norma ABNT NBR 7181 “Solo - Análise Granulométrica” (ABNT, 1984), segundo a qual os métodos do peneiramento e da sedimentação são utilizados, respectivamente, para a separação das frações arenosas e para a quantificação da fração silte e argila. As frações constituintes do solo foram

classificadas segundo a norma ABNT NBR 6502 “Rochas e Solos” (ABNT, 1995), a qual de acordo com o diâmetro das partículas (D_p) considera fração areia ($0,06 \text{ mm} < D_p < 2,0 \text{ mm}$), fração silte ($0,002 \text{ mm} < D_p < 0,06 \text{ mm}$) e argila ($D_p < 0,002 \text{ mm}$). A umidade foi calculada pela diferença de massa após secagem do solo em estufa ($120 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.3.2 – Análise cromatográfica

A determinação da concentração de hidrocarbonetos nos solos foi realizada empregando-se a técnica de cromatografia gasosa. Para esta análise uma quantidade de 80 g de solo foi acondicionada em frasco de vidro e tampa com vedação em teflon, o qual foi encaminhado ao laboratório sob refrigeração em caixa térmica.

Essas análises foram realizadas pelos laboratórios “Bioagri Ambiental” (Piracicaba/SP) e “Analytical Technology” (São Paulo/SP) de acordo com a metodologia proposta pelo órgão ambiental federal norte-americano (USEPA). Nas tabelas onde são apresentados esses resultados, está especificado o laboratório responsável pela análise.

3.3.3 – Contagem de bactérias heterotróficas totais

Bactérias heterotróficas totais foram enumeradas usando a técnica de *pour-plate* em meio PCA (Acumedia, USA) esterilizado em autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Amostras de 1 g de solo foram adicionadas a 9 mL de solução salina estéril (0,85%) em tubos de cultura que foram agitados mecanicamente por 2 minutos. Depois de apropriada série de diluições, 1 mL da solução foi utilizado no plaqueamento em duplicata. As placas de Petri foram mantidas em incubação durante 48 h a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ até a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/g de solo seco).

3.4 – Respirimetria

A verificação do desempenho de diferentes técnicas de biorremediação aplicadas aos solos contaminados foi realizada com os respirômetros de Bartha e Pramer (BARTHA e PRAMER, 1965), os quais foram utilizados para medir a produção microbiana de CO_2 (Figuras 3.5 e 3.6). Estudos de mineralização envolvendo medidas de produção de CO_2 podem prover excelentes informações sobre o potencial de biodegradabilidade de hidrocarbonetos (BALBA et al., 1998).

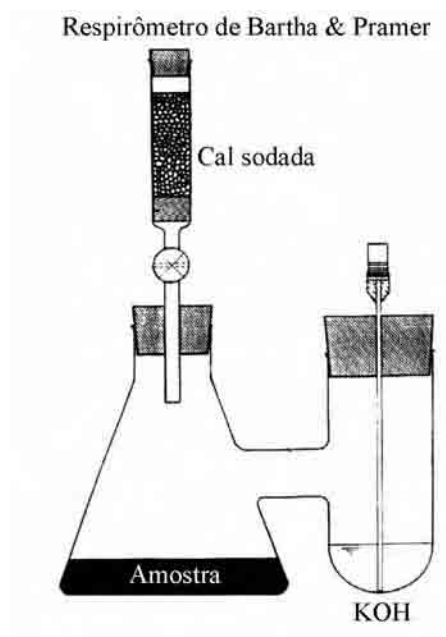


Figura 3.5 - Esquema de um respirômetro de Bartha e Pramer



Figura 3.6 - Respirômetros de Bartha e Pramer

Nos experimentos respirométricos, os frascos foram preparados em triplicata (3 x 50 g de solo) e incubados a 27 °C no escuro. O CO₂ produzido é capturado pela solução de KOH (10 mL; 0,2 N) localizada no braço lateral do respirômetro. Esta solução foi periodicamente retirada com seringa, e a quantidade de gás carbônico absorvida foi medida pela titulação do KOH residual (Equação 3.1) (após a adição de solução de cloreto de bário (1 mL; 1,0N) com uma solução padronizada de HCl (0,1 N). Durante este procedimento, os respirômetros foram aerados durante 1,5 minutos através dos filtros de ascarita (cal sodada).

$$\text{CO}_2 \text{ gerado } (\mu\text{mol}) = (V_B - V_A) \cdot 50 \cdot f_{\text{HCl}} \quad (3.1)$$

onde:

V_B = volume de HCl 0,1 N utilizado para titular o branco, em mL;

V_A = volume de HCl 0,1 N utilizado para titular o tratamento, em mL;

f_{HCl} = fator de correção da normalidade do HCl.

No final dos experimentos respirométricos, os solos contidos nas réplicas foram misturados para a realização de análises físico-químicas e microbiológicas.

A produção de gás carbônico foi utilizada para estimar a quantidade total de hidrocarbonetos mineralizados. Assumindo que 50 % do carbono biodegradado é convertido à CO_2 e a outra metade é adicionada ao solo como húmus e biomassa (CETESB, 1990), a quantidade de carbono biodegradado pode ser expresso como:

$$\text{Quantidade total de carbono biodegradado } (\mu\text{mol}) = 2 \cdot \text{CO}_2 \text{ produzido } (\mu\text{mol}) \quad (3.2)$$

No caso de experimentos em que foi utilizado controle sem contaminantes (Item 3.6), é necessário subtrair o CO_2 produzido pelo controle.

Assim, a eficiência de biodegradação (EB) é calculada pela seguinte equação:

$$\text{EB}\% = \frac{\text{Quantidade total de carbono biodegradado } (\mu\text{mol})}{\text{Quantidade de carbono orgânico inicial no solo } (\mu\text{mol})} \cdot 100 \quad (3.3)$$

A quantidade de carbono orgânico presente no solo foi determinado pelo laboratório “Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo (ICASA)” de acordo com a metodologia Embrapa (1997). No caso do experimento do Item 3.5, como essa medida inicial não foi realizada, o teor de carbono orgânico inicial foi calculado mediante um balanço de massa de carbono, isto é, somando o carbono produzido como CO_2 à quantidade final de carbono orgânico.

A metodologia de cálculo para a eficiência de biodegradação foi obtida na Norma Técnica L6.350 – “Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha” (CETESB, 1990).

3.5 – Avaliação de diferentes técnicas de biorremediação aplicadas ao solo ASP

A influência de três variáveis (conteúdo de nitrogênio e fósforo (NP), adição de surfactante (S) e consórcio de bactérias (CB)) na biodegradação do óleo diesel presente no solo ASP foi avaliada através de experimento respirométrico delineado a partir de um planejamento fatorial completo (2^3), que resultou em 8 condições experimentais (Tabela 3.1).

A correção de nitrogênio e fósforo foi realizada usando soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (6080 mg/Kg de solo) e KH_2PO_4 (973 mg/Kg de solo), respectivamente, para um ajuste (C:N:P) de 100:15:1 (CASSIDY et al., 1997 *apud* CARDONA e ITURBE, 2003). O inóculo de bactérias e o surfactante não iônico Tween 80 foram adicionados em concentrações de 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de solo e 0,2 % (m/m), respectivamente. Considerando a adição dessas soluções, a umidade do solo resultante foi de 21,9%.

Tabela 3.1 – Experimento respirométrico. Condições experimentais geradas pelo Planejamento Fatorial Completo - 2^3 . Tempo de incubação de 55 dias.

tratamento	NP	S	CB
1	+1	+1	+1
2	-1	+1	+1
3	+1	-1	+1
4	-1	-1	+1
5	+1	+1	-1
6	-1	+1	-1
7	+1	-1	-1
8	-1	-1	-1

+1 : C:N:P ajustado para 100:15:1 ou adição de surfactante (0,2% m/m) ou inóculo de 10^5 UFC/g de solo

- 1 : C:N:P não ajustado ou não adição de surfactante ou inóculo

NP: nitrogênio e fósforo; S: surfactante; CB: consórcio bacteriano

Análises estatísticas para se determinar os efeitos de cada variável na eficiência de biodegradação foram realizadas pelo programa STATISTICA (versão 5.0) para Windows. Significância foi considerada para o nível de probabilidade $p < 0,05$.

3.5.1 – Preparo do inóculo

O inóculo microbiano constituiu-se de três espécies de bactérias hidrocarbonoclásticas (*Ochrobactrum anthropi*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus cereus*) que foram previamente isoladas e identificadas por Kataoka (2001) de um sistema de *landfarming* da refinaria de petróleo Replan (Petrobras) em Paulínia/SP. As bactérias foram enriquecidas separadamente em meio PCA líquido (10 mL) por 48 h a 35 °C. As células foram recuperadas por centrifugação (8.000 rpm durante 10 min) e o meio sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 5,5 mL de solução salina estéril (0,85%) e o

mesmo procedimento de centrifugação foi repetido. As células das três espécies foram agrupadas e a suspensão final foi preparada com a adição de 5,5 mL de solução salina.

3.5.2 – Testes de toxicidade aguda

Testes de toxicidade aguda foram utilizados para verificar a eficiência dos tratamentos em termos de geração de produtos menos tóxicos. Primeiramente foi realizada a solubilização do solo de acordo com a norma ABNT 10006 (ABNT, 2004) para extrair os componentes solúveis presentes no solo. A seguir aplicou-se o teste de toxicidade aguda ao solubilizado usando *Daphnia similis* como organismo teste, seguindo a norma Cetesb L 5.018 (CETESB, 1991). No tempo zero, o teste foi aplicado aos tratamentos 6, 7 e 8 (representativos das três variáveis isoladas) e por similaridade de tratamento, inferiu-se os valores relativos aos tratamentos 1 à 5. No tempo final, o teste de toxicidade foi aplicado a todos os tratamentos. Os resultados foram calculados baseados no método estatístico de Trimmed Spearman-Kärber descrito por Hamilton et al. (1978) e expressos como CE50, 48 h.

3.6 – Avaliação da técnica de bioaumento aplicada a solos

Para esta avaliação, os experimentos respirométricos foram divididos em três partes. A primeira objetivou avaliar a influência das técnicas de bioaumento em conjunto com a de bioestimulação (adição de nutrientes) na eficiência de biodegradação dos solos ASP e SB. Essas condições experimentais são apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Experimento respirométrico: Parte 1 – solos ASP e SB. Tempo de incubação de 57 dias.

tratamento	solo	condição experimental
1		controle (nenhum tratamento)
2	ASP	bioestimulação (adição de N e P)
3		bioestimulação (adição de N e P) + bioaumento (consórcio bacteriano)
4		controle (nenhum tratamento)
5	SB	bioestimulação (adição de N e P)
6		bioestimulação (adição de N e P) + bioaumento (consórcio bacteriano)

A correção de nitrogênio e fósforo foi realizada usando soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (6080 mg/kg de solo) e KH_2PO_4 (973 mg/kg de solo), respectivamente, para um ajuste (C:N:P) de 100:15:1 (CASSIDY et al., 1997 *apud* CARDONA e ITURBE, 2003). O consórcio bacteriano (*Staphylococcus hominis* e *Kocuria palustris*) foi adicionado a uma concentração de 10^6 UFC por grama de solo seco. Considerando a adição das soluções correspondentes a cada tratamento, a umidade dos solos resultante foi de 21,1% (solo ASP) e de 20,2 % (solo SB).

Nos tratamentos 1 e 4 (controles), a umidade foi corrigida em relação aos outros tratamentos com adição de água destilada.

Na segunda parte dos experimentos, foi simulada uma contaminação de óleo diesel no solo RC. Assim, óleo diesel comprado de um posto de combustíveis local foi adicionado ao solo. A Tabela 3.3 traz resumidamente as condições experimentais. Em relação ao bioaumento com o consórcio bacteriano *S. hominis/K. palustris*, duas condições foram simuladas: a) adição de microrganismos antes da contaminação; b) adição de microrganismos após contaminação. O objetivo da primeira estratégia foi avaliar o quão eficiente seria o bioaumento se empregado como uma maneira de “preparar” o solo para possíveis vazamentos futuros.

Tabela 3.3 - Experimento respirométrico: Parte 2 – solo RC. Tempo de incubação de 92 dias.

tratamento	solo	condição experimental
7		controle 1 - (apenas solo)
8		controle 2 - (contaminação sem bioaumento)
9	RC	bioaumento (<i>S. hominis</i> / <i>K. palustris</i>) antes de contaminação
10		bioaumento (<i>S. hominis</i> / <i>K. palustris</i>) depois de contaminação
11		bioaumento (<i>Ochrobactrum anthropi</i>) depois de contaminação
12		bioaumento (consórcio - R) depois de contaminação

A adição do inóculo no tratamento 9 foi feita 71 dias antes da contaminação. Foi utilizado o mesmo inóculo preparado para a primeira parte dos experimentos (Tabela 3.2), numa concentração de 10^4 UFC por grama de solo seco. O solo inoculado (600 g) foi mantido em um béquer envolto por um plástico preto para manter o solo em condições sem iluminação. Após esse período, a contaminação do solo foi simulada pela adição de 6 g de óleo diesel por quilograma de solo (tratamentos 8 ao 12).

Nos tratamentos 10 ao 12, as concentrações de inóculos foram, respectivamente, 10^6 , 10^9 e 10^8 UFC por grama de solo seco. Considerando a adição dos inóculos, a umidade do solo resultante foi de 9,3 % (tratamento 9) e de 28,8 % (tratamentos 10 ao 12). Nos tratamentos 7 e 8 (controles), a umidade foi corrigida em relação ao tratamento 10 com adição de água destilada.

A terceira parte dos experimentos objetivou verificar a eficiência do inóculo comercial EM, o qual foi aplicado no solo ASP. As condições experimentais estão apresentadas na Tabela 3.4:

Tabela 3.4 - Experimento respirométrico: Parte 3 – solo ASP (bioaumento com o inóculo comercial EM). Tempo de incubação de 48 dias.

tratamento	solo	condição experimental
13	ASP	controle (nenhum tratamento)
14		bioaumento (inóculo comercial)

Considerando a adição do inóculo, a umidade do solo resultante foi de 19,0 %. No tratamento 13 (controle), a umidade foi corrigida em relação ao tratamento 14 com adição de água destilada.

3.6.1 - Microrganismos

As culturas bacterianas *Staphylococcus hominis* e *Kocuria palustris* foram isoladas do solo ASP a partir do plaqueamento após término da respirometria do Item 3.5 e identificadas pelo seqüenciamento do rDNA 16S (realizado pelo CPQBA/UNICAMP).

As bactérias *Ochrobactrum anthropi* e *Bacillus cereus* são as mesmas utilizadas na respirometria do Item 3.5.

O inóculo comercial chamado “Microrganismos Eficientes” (EM) é um consórcio de microrganismos que tem demonstrado bom desempenho como fertilizante biológico e aumentado a eficiência de lagoas de tratamento de efluentes. Embora EM tem sido aplicado com sucesso em tratamentos biológicos de efluentes, este consórcio nunca foi testado na biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos, assim, originalmente o EM não foi desenvolvido para esse propósito.

3.6.2 – Preparo dos inóculos

Nos tratamentos 3, 6 e 9, os inóculos foram preparados da seguinte maneira: as bactérias *S. hominis* e *K. palustris* foram enriquecidas separadamente em meio PCA líquido (10 mL) por 48 h a 35 °C. As células foram recuperadas por centrifugação (8.000 rpm durante 10 min) e o meio sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 5,5 mL de solução salina estéril (0,85%) e o mesmo procedimento de centrifugação foi repetido. As células das duas espécies foram agrupadas e a suspensão final foi preparada com a adição de 5,5 mL de solução salina.

Nos tratamentos 10 ao 12, os inóculos foram preparados estriando-se as culturas, que estavam armazenadas em tubos, em placas de Petri contendo meio nutriente agar (Merck,

Alemanha). As placas de Petri foram incubadas durante 24 horas a 35 °C. As células foram raspadas utilizando-se água destilada estéril e os inóculos ajustados para uma D.O. de 1,2 a 610 nm (SHIMADZU UV-1601PC).

O inóculo EM foi inicialmente diluído em água (1:10) e a seguir aplicado a uma concentração de 0,034 mL por grama de solo, o que correspondeu a 10^7 UFC por grama de solo seco.

3.7 – Avaliação do efeito da adição da vinhaça na biorremediação de solos e águas subterrâneas

3.7.1 – Caracterização da vinhaça

A vinhaça foi coletada na usina Santa Lucia (Araras-SP) e armazenada congelada até o seu uso. A caracterização físico-química da vinhaça foi realizada pelo laboratório “Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo (ICASA)”, de acordo com a metodologia Embrapa (1997), com exceção dos seguintes parâmetros: oxigênio dissolvido (OD) (Digimed DM4), demanda química de oxigênio (DQO) (CETESB, 1994b), potencial redox (Eh) (Hanna HI 8314) e condutividade (Analion C-701, eletrodo Analion C 801-1).

3.7.2 – Experimento respirométrico

A influência da adição da vinhaça na biodegradação do óleo diesel no solo foi avaliada mediante experimentos respirométricos.

Os experimentos foram divididos em duas partes, descritas na Tabela 3.5. Na primeira, foram simuladas contaminações do solo RC com óleo diesel comercial (comprado em um posto de combustíveis local) ou com o óleo diesel coletado no posto ASP (6 mg.Kg^{-1} de solo). Na segunda parte, foi realizado experimento com os solos ASP e SB. Para ambas as partes, a vinhaça foi adicionada a uma concentração de 33 mL.Kg^{-1} de solo. Com isso, a umidade resultante dos solos foi de 11,9 % (RC), 19,0 % (ASP) e 19,0 % (SB). Nos tratamentos onde a vinhaça não foi adicionada (controles), a umidade foi corrigida, em relação aos outros tratamentos, com adição de água destilada.

Tabela 3.5 - Experimento respirométrico: adição de vinhaça ao solo. Tempos de incubação de 48 dias (tratamentos 1 a 6) e 47 dias (tratamentos 7 a 10).

tratamento	solo	condição experimental
1		solo (controle)
2		solo + vinhaça (controle)
3	RC	solo + óleo diesel ASP
4		solo + óleo diesel ASP + vinhaça
5		solo + óleo diesel comercial
6		solo + óleo diesel comercial + vinhaça
7	ASP	solo (controle)
8		solo + vinhaça
9	SB	solo (controle)
10		solo + vinhaça

3.7.3 – Experimentos com água subterrânea

Com o objetivo de verificar a influência da vinhaça na biodegradação do óleo diesel presente na água subterrânea dos postos ASP e SB, dois experimentos foram realizados simulando condições aeradas e não-aeradas.

No posto ASP, a água subterrânea foi coletada em um poço de monitoramento à jusante do local do vazamento, utilizando-se amostrador descartável do tipo *bailer*.

- condição não aerada

Este experimento foi realizado em frascos (300 mL) que são utilizados na análise de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), os quais foram incubados durante 20 dias a $20,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (Figura 3.7). Os tratamentos com vinhaça foram comparados com a técnica de biorremediação padrão de injeção de nutrientes, onde a correção de nitrogênio e fósforo foi realizada usando soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 , respectivamente. A Tabela 3.6 traz resumidamente as condições experimentais. Nos tratamentos sem vinhaça, para se obter as mesmas condições, 5 % do volume do meio reacional corresponde à água destilada.

Tabela 3.6 - Experimento com água subterrânea simulando condição não aerada

tratamento	água subterrânea	condição experimental
1		água subterrânea (controle)
2	ASP	água subterrânea + nutrientes (DQO:N:P = 100:5:1)
3		água subterrânea + vinhaça (5% v/v)
4		água subterrânea (controle)
5	SB	água subterrânea + nutrientes (DQO:N:P = 100:5:1)
6		água subterrânea + vinhaça (5% v/v)

DQO = demanda química de oxigênio

Para cada tratamento, 6 frascos de DBO foram preparados e as seguintes medidas foram realizadas nos intervalos de 0; 5; 10 e 20 dias: oxigênio dissolvido (OD) (Digimed DM4); pH (Analion IA601); potencial redox (Eh) (Hanna HI 8314); condutividade (Analion C-701, eletrodo Analion C 801-1); demanda química de oxigênio (DQO) (CETESB, 1994b); concentração dos íons potássio e nitrato (Hach DR 2000); concentração dos hidrocarbonetos BTEX e HPA (item 3.1.3), sendo o último medido apenas nos tempos inicial e final. Nos intervalos de tempo mencionados, para cada tratamento, o OD foi medido em dois frascos, os quais foram misturados, tendo sido retiradas alíquotas apropriadas para cada análise.



Figura 3.7 – Experimento com água subterrânea (condição não aerada)

- condição aerada

O segundo experimento com a água subterrânea foi realizado em quatro reatores aerados (900 mL) (Figura 3.8), cujas condições experimentais estão listadas na Tabela 3.7. Nos tratamentos sem vinhaça, para se obter as mesmas condições, 5 % do volume do meio reacional corresponde à água destilada. Nos mesmos intervalos de tempo do experimento com os frascos de DBO, foi medida a concentração de BTEX. A demanda química de oxigênio (DQO) e a concentração de HPA foram determinados apenas nos tempos inicial e final.

Tabela 3.7 - Experimento com água subterrânea simulando condição aerada

tratamento	água subterrânea	condição experimental
1	ASP	água subterrânea (controle)
2		água subterrânea + vinhaça (5% v/v)
3	SB	água subterrânea (controle)
4		água subterrânea + vinhaça (5% v/v)



Figura 3.8 – Experimento com água subterrânea (condição aerada)

3.8 – Comparação da biodegradabilidade de óleo diesel comercial e intemperizado

A capacidade de diferentes microrganismos em biodegradar óleo diesel comercial e intemperizado (ASP) foi verificada utilizando-se a técnica baseada no indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). O princípio deste teste é que durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato. Ao incorporar um aceptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível averiguar a

capacidade dos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato pela observação da mudança de cor do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido). Esta técnica desenvolvida por Hanson et al. (1993) tem sido utilizada em vários trabalhos, por exemplo, Cormack e Fraile (1997), Roy et al. (2002), Peixoto e Vieira (2005), Lovaglio et al. (2005), Silva et al. (2005) e Souza et al. (2005).

Foi testada a biodegradabilidade do óleo diesel comercial, comprado em um posto de combustíveis em Rio Claro, e do óleo diesel presente na água subterrânea (fase livre) no posto ASP (Figura 3.9).



Figura 3.9 – Fase livre (óleo diesel) na água subterrânea do posto ASP

3.8.1 – Microrganismos

Diferentes culturas de bactérias e consórcios de microrganismos foram testados em relação à capacidade de biodegradar os óleos diesel:

- *Staphylococcus hominis* e *Kocuria palustris* (item 3.6.1).
- *Ochrobactrum anthropi* e *Bacillus cereus* (item 3.6.1).

- inóculo comercial EM (item 3.6.1).
- *Pseudomonas aeruginosa* LBI - isolada por Benincasa et al. (2002) de uma área contaminada com hidrocarbonetos.
- consórcio microbiano R – obtido do efluente bruto da refinaria Replan (Petrobras).
- consórcio L – o lodo ativado de um reator piloto que está sendo testado para o tratamento de água de produção no “Terminal Marítimo Almirante Barroso – Tebar” (Petrobras), localizado em São Sebastião (SP).
- consórcios ASP-S e ASP-AS, obtidos respectivamente do solo e da água subterrânea do posto ASP.
- consórcios SB-S e SB-AS, obtidos respectivamente do solo e da água subterrânea do posto SB.
- consórcio RC, proveniente do solo do posto RC.
- consórcio U, obtido de um solo não contaminado coletado no campus da Unesp (Rio Claro).

3.8.2 – Preparo dos inóculos

Os inóculos *S. hominis*, *K. palustris*, *O. anthropi*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* LBI e consórcio R foram preparados estriando-se as culturas, que estavam armazenadas em tubos, em placas de Petri contendo meio nutriente agar (Merck, Alemanha). Para preparar os consórcios ASP-S, SB-S, RC-S e U, 1.0 g dos respectivos solos foram adicionados a frascos erlenmeyers (125 mL) contendo 50 mL de meio Bushnell-Hass (BH) (descrito no item 3.8.3) e mantidos sob agitação durante 3 dias. Após este período, o meio de cultivo foi estriado em placas de Petri contendo meio nutriente agar. Os consórcios ASP-AS e SB-AS foram preparados pelo estriamento de água subterrânea na superfície de placas de Petri contendo meio nutriente agar.

As placas de Petri foram incubadas durante 24 horas a 35 °C. Então as células foram raspadas utilizando-se água destilada estéril. Os consórcios EM e L foram adicionados aos frascos dos testes sem preparação prévia.

3.8.3 – Preparo do teste

Os inóculos *S. hominis*, *K. palustris*, *O. anthropi*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* LBI e consórcio R foram adicionados (125 µL, D.O. = 0,55; $\lambda = 610$ nm (SHIMADZU UV-1601PC)) separadamente a tubos de ensaio (duplicatas) que continham o meio Bushnell-Hass (BH) (7,5 mL) e 50 µL de óleo diesel, ambos previamente esterilizados em autoclave. A concentração de DCPIP foi de 27 µg.mL⁻¹. O inóculo EM (200 µL, concentração igual a 10⁹ UFC.mL⁻¹), o consórcio L (1,0 mL, concentração igual to 10⁷ UFC.mL⁻¹), os inóculos preparados com os microrganismos nativos dos solos e águas subterrâneas (1,0 mL, concentração não determinada) e *P. aeruginosa* LBI novamente (1,0 mL, concentração não determinada) foram adicionados a frascos erlenmeyers (125 mL, duplicatas) que continham meio BH estéril (50 mL) e 1% (v/v) de óleo diesel. A concentração de DCPIP foi de 20 mg.mL⁻¹. Os tubos de cultura e os frascos erlenmeyers foram mantidos sob agitação (240 rpm) a 27±2 °C. O meio BH é composto por (g.L⁻¹): MgSO₄: 0,2; CaCl₂: 0,02; KH₂PO₄: 1,0; K₂HPO₄: 1,0; NH₄NO₃: 1,0; FeCl₃: 0,05 (DIFCO MANUAL, 1984).

3.8.4 – Experimento respirométrico

A biodegradabilidade desses óleos diesel também foi comparada em ensaio respirométrico, onde os combustíveis foram aplicados ao solo RC. Para essa análise foi feita uma composição de experimentos anteriores e de um experimento montado com a adição do óleo diesel ASP. Todos foram mantidos sob as mesmas condições, contudo, com períodos de incubação diferentes. A Tabela 3.8 apresenta o protocolo dos experimentos que participaram dessa análise.

Tabela 3.8 – Experimento respirométrico: Comparação da biodegradabilidade de óleo diesel comercial e intemperizado (ASP).

experimento	condição experimental	tempo de incubação (dias)
1	solo RC + óleo diesel comercial (tratamento 5, Tabela 3.5)	48
	solo RC + óleo diesel intemperizado (ASP) (tratamento 3, Tabela 3.5)	
2	solo RC + óleo diesel comercial (tratamento 8, Tabela 3.3)	92
	solo RC + óleo diesel intemperizado (ASP)	89

3.8.5 – Composição dos óleos diesel

A análise de cromatografia gasosa foi utilizada para a caracterização dos óleos diesel (comercial e intemperizado). Primeiramente, solo superficial sem cobertura vegetal foi coletado de uma área não contaminada (campus da Unesp - Rio Claro), o qual foi peneirado (*tyler* 14) antes de ser contaminado com óleo diesel comercial ou intemperizado. Para as análises de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) e hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA), foram adicionados 8 mg de óleo diesel por quilograma de solo e para a análise de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH), 3 mg.Kg⁻¹. As análises foram realizadas pelo laboratório “Analytical Solutions” (São Paulo/SP) de acordo com as metodologias USEPA 8021B, 8270 e 8015B, respectivamente.

3.9 – Produção de biossurfactante utilizando-se óleo diesel intemperizado

Neste experimento foi investigada a capacidade das culturas *Staphylococcus hominis*, *Kocuria palustris* e *Pseudomonas aeruginosa* LBI utilizarem óleo diesel intemperizado (ASP) como matéria prima para produção de biossurfactante.

3.9.1 – Preparo dos inóculos

Os inóculos foram preparados estriando-se as culturas, que estavam armazenadas em tubos de cultura, em placas de Petri contendo meio nutriente agar (Merck, Alemanha). As placas de Petri foram incubadas durante 24 horas a 35 °C. Então as células foram raspadas utilizando-se água destilada estéril e o inóculo então ajustado para uma D.O. de 0,65 a 610 nm (SHIMADZU UV-1601PC).

3.9.2 – Condições de cultivo

Os experimentos foram realizados em frascos erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio líquido. Diferentes combinações de meio de cultura e fontes de carbono foram avaliadas. Assim, foi testada a influência de dois meios na produção de biossurfactante: a) o meio descrito por Robert et al. (1989), contendo (g.L⁻¹): NaNO₃: 4,0; KCl: 0,1; KH₂PO₄: 0,5; K₂HPO₄: 1,0; CaCl₂: 0,01; MgSO₄.7H₂O: 0,5; FeSO₄.7H₂O: 0,01; extrato de levedura: 0,1; e 0,05 mL/L da seguinte solução de elementos traços: B (0,026%), Cu (0,05%), Mn (0,05%), Mo (0,006%) e Zn (0,07%); b) o meio Bushnell-Hass (BH) (item 3.8.3). O primeiro meio tem sido empregado em experimentos de produção de biossurfactantes com diferentes linhagens de *P. aeruginosa* (ROBERT et al., 1989; BENINCASA et al., 2002; SILVA, 2005;

PIRÔLLO, 2006), enquanto que o meio BH é normalmente usado em estudos onde é avaliada a biodegradação de hidrocarbonetos (HANSON et al., 1993; ROY et al., 2002).

Como fontes de carbono foram testados o óleo diesel intemperizado do posto ASP (D-ASP) e comparativamente, um óleo diesel comercial (D-C) comprado em um posto de combustíveis local. O meio mineral mais a fonte de carbono (diferentes concentrações de óleo diesel (Tabela 3.9)) foram esterilizados conjuntamente em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 15 minutos. Após isto, os inóculos (1 mL) foram adicionados aos frascos, que foram mantidos sob agitação (240 rpm) durante 144 horas a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Experimentos incluindo a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI e o meio Robert com o óleo diesel comercial não foram realizados porque previamente esta linhagem mostrou-se eficiente em produzir biossurfactante nessas condições em Piróllo (2006).

3.9.3 – Medidas de tensão superficial

O monitoramento da produção de biotensoativos foi realizado após o período de incubação medindo-se a tensão superficial do caldo livre de células (centrifugação, 8.000 rpm, 15 minutos), segundo o método do anel de De Nöuy, utilizando-se o tensiômetro Krüss K6 (Figura 3.10).



Figura 3.10 – Tensiômetro Krüss K6

3.9.4 – Verificação de bioemulsificadores

Para os experimentos 1; 4; 5; 11; 14 e 15 (Tabela 3.9), determinou-se o Índice de Emulsificação (E24), segundo Iqbal et al. (1995), para a verificação da presença de bioemulsificadores, com a adição de 1 mL de óleo diesel (D-ASP) ou querosene ao caldo de cultivo livre de células (1 mL), em tubos de ensaio seguidos por agitação em alta velocidade

em vórtex durante 2 minutos. Os tubos foram deixados em repouso por 24 horas e o índice de emulsificação foi calculado segundo a fórmula:

$$E24 = (\text{altura da camada de emulsão/altura total}) \times 100 \quad (3.4)$$

A realização deste teste é importante porque nem todos biossurfactantes apresentam boas propriedades tensoativas, porém em alguns casos, como o biossurfactante *emulsan*, são ótimos agentes emulsificantes de hidrocarbonetos (KIM et al, 1997). Segundo Ron e Rosemberg (2001), os biossurfactantes com baixo peso molecular reduzem as tensões inter e superficiais, enquanto que os de alto peso molecular são emulsificadores.

3.9.5 – Aplicação de ultrassom

Considerando-se a possibilidade de armazenamento de biossurfactante na parede celular (GOMES et al., 2004), também foram realizados experimentos (Tabela 3.9) nos quais, antes da realização da medida da tensão superficial, foi aplicada uma carga de ultrassom ao meio de cultivo (com células) objetivando provocar a ruptura da parede celular e conseqüente liberação de biossurfactante ao meio. O ultrassom foi irradiado no meio de cultura (com as células) antes da medição da tensão superficial. O equipamento utilizado foi o “Desruptor de Células” (UNIQUE), com uma frequência ultrasônica de 20 KHz, potência de 306 W e empregando-se a macro ponta como agente gerador das ondas de ultrassom. Para os experimentos 10 e 20 a carga de ultrassom foi aplicada durante 20 minutos e para os experimentos 6; 8; 16 e 18, 10 minutos.

O ultrassom somente foi empregado nos experimentos com as culturas *S. hominis* e *K. palustris* porque a bactéria *P. aeruginosa* LBI é um produtor de biossurfactante extra-celular (PIRÔLLO, 2006).

Tabela 3.9 – Resumo das condições experimentais (produção de biossurfactante)

experimento	cultura	meio de cultivo	fonte de carbono	concentração de óleo diesel (% v/v)	aplicação de ultrassom
1	<i>K. palustris</i>	Robert et al. (1989)	D-ASP	1	não
2				5	
3				10	
4				20	
5				30	
6				10	
7		BH	D-ASP	10	sim
8					não
9					sim
10					não
11	<i>S. hominis</i>	Robert et al. (1989)	D-ASP	1	não
12				5	
13				10	
14				20	
15				30	
16				10	
17		BH	D-ASP	10	sim
18					não
19					sim
20					não
21	<i>P. aeruginosa</i> LBI	Robert et al. (1989)	D-ASP	30	não
22		BH	D-ASP	10	
23					

BH – Bushnell e Haas

D-ASP - óleo diesel coletado no lençol freático do posto de combustíveis ASP

D-C – óleo diesel comercial

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Avaliação da biorremediação natural da água subterrânea no posto de combustíveis SB

Resultados obtidos a partir das análises efetuadas nas amostras de água subterrânea coletadas entre Maio de 2004 e Abril de 2006 são mostrados nas Tabelas 4.1 até 4.3.

Tabela 4.1 - Parâmetros físicos e químicos avaliados nas amostras de água subterrânea coletadas entre Maio de 2004 e Abril de 2006.

poço monit.	data coleta	nível (m)	T (°C)	condutividade (25°C) (mS.cm ⁻¹)	OD* (mg.L ⁻¹)	pH	Eh (mV)
SB1	01/mai/04	2,46	25,0	0,308	4,4	6,0	14
	29/abr/05	1,80	25,6	0,241	1,1	6,2	72
	08/nov/05	1,27	25,0	0,378	2,2	5,8	- 46
	10/abr/06	1,17	25,7	0,860	1,1	5,8	48
SB2	01/mai/04	1,69	26,3	0,173	4,6	6,2	203
	29/abr/05	1,73	27,4	0,179	2,8	6,4	117
	08/nov/05	2,33	25,3	0,310	5,0	6,3	215
	10/abr/06	1,80	27,0	0,620	4,6	6,1	198
SB3	01/mai/04	3,60	25,2	0,254	4,3	6,5	53
	29/abr/05	3,06	25,5	0,235	1,4	5,9	89
	08/nov/05	2,88	24,5	0,281	2,6	5,9	75
	10/abr/06	3,02	26,0	0,260	4,5	5,8	187

Tabela 4.1 - Parâmetros físicos e químicos avaliados nas amostras de água subterrânea coletadas entre Maio de 2004 e Abril de 2006 (cont.).

poço monit.	data coleta	Na	Cl	Mg	Ca	PO ₄ ³⁻	K	
		(mg.L ⁻¹)						
SB1	01/mai/04	26,2	6,40	0,00	0,38	0,05	6,90	
	29/abr/05	33,2	11,4	0,07	0,36	0,53	20,6	
	08/nov/05	38,9	15,6	< 0,01	0,64	3,16	19,0	
	10/abr/06	64,5	12,7	0,05	0,58	2,86	4,55	
SB2	01/mai/04	14,9	7,60	0,06	0,57	0,20	6,30	
	29/abr/05	14,3	3,20	0,01	0,57	0,12	18,2	
	08/nov/05	20,9	16,6	0,12	0,36	0,19	69,0	
	10/abr/06	15,9	3,20	< 0,01	0,60	0,18	4,86	
SB3	01/mai/04	19,4	2,90	0,03	0,51	0,09	4,61	
	29/abr/05	18,8	6,00	0,07	0,41	0,11	4,57	
	08/nov/05	25,8	17,7	0,04	0,41	0,07	2,99	
	10/abr/06	27,8	9,40	< 0,01	0,51	0,14	4,55	

Tabela 4.1 - Parâmetros físicos e químicos avaliados nas amostras de água subterrânea coletadas entre Maio de 2004 e Abril de 2006 (cont.).

poço monit.	data coleta	SO ₄ ²⁻	Fe(II)	NO ₃ ⁻	STS**	alcalinidade***
		(mg.L ⁻¹)				
SB1	01/mai/04	62	< 0,01	0,50	8,0	52,0
	29/abr/05	13	0,03	5,05	80	178
	08/nov/05	27	1,30	1,90	10	72,0
	10/abr/06	33	3,22	1,94	10	114
SB2	01/mai/04	11	0,01	0,08	8,0	39,0
	29/abr/05	8,0	0,02	0,26	10	51,0
	08/nov/05	8,0	0,03	0,28	20	77,0
	10/abr/06	19	0,06	0,39	10	44,5
SB3	01/mai/04	17	< 0,01	1,11	80	95,0
	29/abr/05	4,0	0,79	1,54	10	72,0
	08/nov/05	9,0	0,01	0,38	80	67,0
	10/abr/06	1,0	0,47	0,87	20	67,5

* oxigênio dissolvido

** sólidos totais em suspensão

*** alcalinidade expressa como HCO₃⁻

Tabela 4.2 - Concentração de BTEX nas amostras de água subterrânea coletadas entre Maio de 2004 e Abril de 2006.

poço monit.	data coleta	benzeno	tolueno	etil-benzeno	xilenos	TOTAL
		(µg.L ⁻¹)				
SB1	01/mai/04	<LD ¹	<LD	<LD	<LD	<LD
	29/abr/05	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	08/nov/05	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	10/abr/06	<LD	<LD	4330	372	4702
SB2	01/mai/04	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	29/abr/05	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	08/nov/05	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	10/abr/06	49	69	90	99	307
SB3	01/mai/04	9,0	11,4	13,4	22,3	56,1
	29/abr/05	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	08/nov/05	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	10/abr/06	57	<LD	914	334	1305
intervenção ²		5	700	300	500	
referência ³		5	-	-	-	

¹ LD (limite de detecção) = 4,0 µg.L⁻¹² CETESB- "Valores orientadores para avaliação de solos e águas subterrâneas, Novembro de 2005."³ Portaria 518, 21 de Dezembro de 2004 do Ministério da Saúde.

Tabela 4.3 - Concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) nas amostras de água subterrânea coletadas em abril de 2006 nos poços de monitoramento SB1; SB2 e SB3.

HPA	SB1	SB2	SB3	intervenção ²
	(µg.L ⁻¹)			
Naftaleno	<LD ¹	2,56	12,09	140
Acenaftileno	<LD	<LD	<LD	-
Fluoreno	1,15	4,97	4,54	-
Antraceno	2,34	0,87	2,87	-
Pireno	<LD	6,12	1,97	-
Benzo (a) Antraceno	<LD	<LD	<LD	1,75
Criseno	5,18	0,87	<LD	-
Benzo (k) Fluoranteno	<LD	<LD	<LD	-
Benzo (a) Pireno	<LD	0,02	0,032	0,7 ³
Dibenzo (a,h) Antraceno	<LD	<LD	<LD	0,18
Benzo (g,h,i) Pirileno	6,09	<LD	<LD	-
Indeno (1,2,3) Pireno	<LD	<LD	<LD	0,17
Fenantreno	0,05	1,91	7,12	140
Fluoranteno	<LD	<LD	<LD	-
Benzo (b) Fluoranteno	0,07	0,054	<LD	-
TOTAL	15	17	29	

¹ LD (limite de detecção) = 0,01 µg.L⁻¹

² CETESB- "Valores orientadores para avaliação de solos e águas subterrâneas, Novembro de 2005."

³ Valor estipulado pela Portaria 518, 21 de Dezembro de 2004 do Ministério da Saúde.

A partir dos dados de concentração dos componentes maiores (Tabela 4.1) foi feita a classificação hidroquímica da água subterrânea com o auxílio do diagrama de Piper. Em todas as coletas, as amostras foram classificadas como bicarbonatada sódica, com exceção do ponto SB1 na 1ª coleta, classificada como bicarbonatada sulfatada. Assim, no geral, os resultados obtidos em todas as coletas são semelhantes aos representados no diagrama da Figura 4.1, que mostra os dados da 2ª coleta.

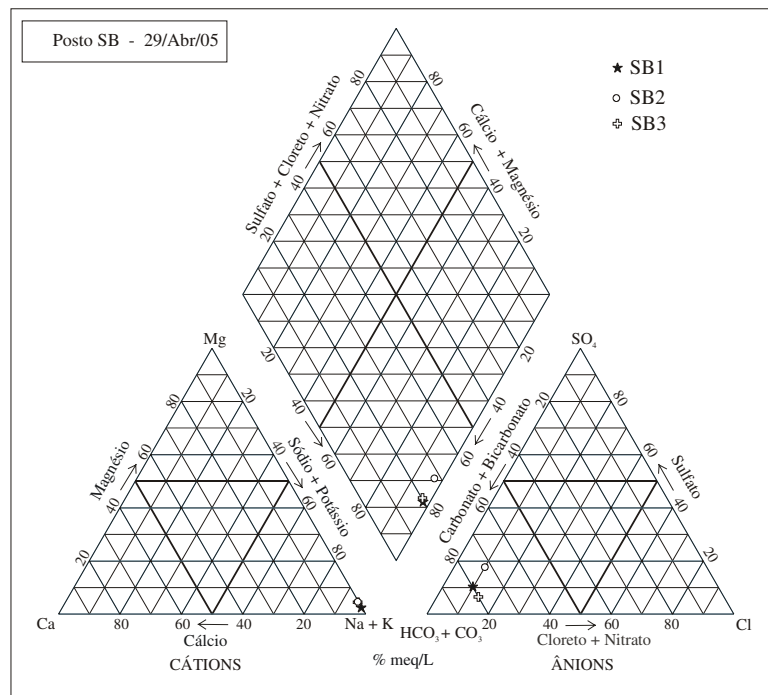


Figura 4.1 - Diagrama de Piper efetuado a partir de dados obtidos com a coleta de amostras de água subterrânea realizada em Abril de 2005 (2ª coleta).

Observações de campo em relação ao poço de monitoramento SB1, como odor de H_2S e rápida recuperação em relação aos outros poços, levantaram a suspeita da possibilidade de infiltração de água proveniente da rede de esgoto. Teste realizado em laboratório (plaqueamento em meio *chromocult*[®]), cuja finalidade consistiu na verificação da presença de bactérias do grupo coliformes totais e a bactéria *Escherichia coli*, mostrou que os três pontos de coleta apresentavam *E. coli*, sendo que somente no ponto SB1 foram verificados os coliformes totais. A bactéria *E. coli* em outros estudos (SORKHOH et al., 1990; AL-HADHRAMI et al., 1995) foi considerada como capaz de biodegradar hidrocarbonetos, contudo, a presença dos coliformes é um forte indício da infiltração de esgoto doméstico. Outros parâmetros (Tabela 4.1) também são indicativos quando são comparados os valores obtidos para SB2 relativamente à SB1, que estão situados proximamente, por exemplo, menor concentração de oxigênio dissolvido, e maiores concentrações de sódio, fosfato, sulfato e nitrato. Portanto, devido a esta possível influência externa, é conveniente não considerar os valores medidos no ponto SB1 na análise dos indicadores geoquímicos.

Fatores importantes para a avaliação da biorremediação natural como a caracterização da composição natural da água subterrânea (*background*) e a delimitação da

pluma de contaminação não foram possíveis de serem obtidos devido ao pequeno número de poços de monitoramento na área. Apesar disso, com as análises realizadas é possível verificar alguns parâmetros que indicam a biodegradação dos contaminantes, como a presença de microrganismos hidrocarbonoclasticos (que consomem hidrocarbonetos) na água subterrânea.

De acordo com a metodologia proposta por Aaronson (1970), foi verificada a presença, na amostra coletada no ponto SB3, de bactérias do gênero *Pseudomonas* oxidantes de naftaleno, e bactérias capazes de biodegradar benzeno e tolueno. A verificação da presença desses microrganismos na água subterrânea é importante uma vez que o naftaleno, um composto aromático policíclico (HPA) característico na composição de óleo diesel, bem como o benzeno e o tolueno, estão especificados na lista de referência de valores de intervenção para águas subterrâneas da CETESB (CETESB, 2005a).

No teste utilizando-se o indicador redox DCPIP (inóculo SB-AS), a descoloração do meio de cultivo ocorreu em 3 dias para ambos os óleos testados. Esse resultado mostra que os microrganismos presentes na água subterrânea apresentam a capacidade de degradar o óleo diesel mesmo este estando intemperizado.

Rosenberg e Gutnick (1981) concluíram que bactérias capazes de degradarem hidrocarbonetos estão localizadas potencialmente em todas as áreas naturais, embora apresentem grandes variações em suas concentrações celulares. No entanto, é importante ressaltar que apenas a constatação da presença desses microrganismos não significa que uma biorremediação efetiva esteja ocorrendo no local contaminado. Segundo Corseuil (1994) é também importante verificar a presença de biomassa suficiente para a degradação dos contaminantes, pois baixas populações de microrganismos contaminantes-específicos podem resultar em significantes períodos de retardo antes do início de uma biodegradação mensurável. A água subterrânea contaminada com hidrocarbonetos contem frequentemente maiores densidades populacionais microbianas que a água subterrânea natural do local. Este aumento está relacionado à fonte suplementar de carbono oferecida pelos hidrocarbonetos (RISER-ROBERTS, 1992). De acordo com USEPA (1987) *apud* Shaffner e Juneau (1995), amostras de água subterrânea coletadas a montante de locais contaminados com hidrocarbonetos tipicamente apresentam uma densidade populacional total de aproximadamente 10^2 a 10^3 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC.mL⁻¹). A população de bactérias heterotróficas totais nas amostras de água subterrânea em todas as coletas (Figura 4.2) variou entre 10^4 e 10^6 UFC.mL⁻¹, valores compatíveis com a baixa

concentração de hidrocarbonetos verificada na água subterrânea durante o período de monitoramento.

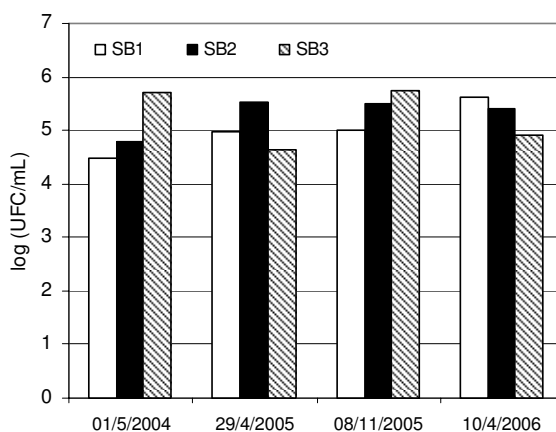


Figura 4.2 - Contagem de bactérias heterotróficas totais nas amostras de água subterrânea coletadas entre Maio de 2004 e Abril de 2006.

Os resultados das análises físico-químicas da água subterrânea realizadas durante o período de monitoramento de dois anos (Tabela 4.1) também fornecem parâmetros que indicam condições favoráveis à biodegradação dos contaminantes, como temperatura próximo a 25 °C, pH ligeiramente ácido e condições oxidantes (valores de Eh positivos). Contudo a baixa concentração de fósforo dissolvido (PO_4^{3-}) pode ser um fator limitante.

Nas datas em que foi constatada a presença de hidrocarbonetos na água subterrânea, as concentrações de BTEX no ponto SB3, próximo ao local do vazamento, sempre foram maiores que aquelas encontradas em SB2 que está à jusante (Tabela 4.2), sendo que somente no primeiro foi detectada fase livre. Esta diminuição pode ser atribuída a processos como advecção, diluição, dispersão, sorção, volatilização e também à biodegradação, pois níveis de oxigênio dissolvido e alcalinidade são, respectivamente, menores e maiores em SB3. Em locais onde esteja ocorrendo processos aeróbios de biodegradação, a concentração de oxigênio diminui nos locais de maior concentração de hidrocarbonetos devido ao consumo destes pelos microrganismos e como produto desse metabolismo tem-se a produção de CO_2 , que causa o aumento da alcalinidade. Os indicadores geoquímicos também indicam que processos anaeróbios de biodegradação possivelmente não estão ocorrendo, uma vez que o aquífero apresenta condições oxidantes e a variação das concentrações de nitrato, sulfato, e Fe (II) entre SB3 e SB2 não são significativas.

Na última coleta, após um ano em que a concentração de BTEX esteve abaixo do nível de detecção, houve um aumento considerável na concentração destes contaminantes (Tabela 4.2). Isto indica que hidrocarbonetos retidos ou adsorvidos no solo representam uma fonte constante de contaminação. Nesta mesma data, também foi realizada a análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e os valores não se encontraram acima daqueles permitidos pela legislação (Tabela 4.3). Em SB3, as concentrações de benzeno e etilbenzeno estão acima do valor de intervenção determinado pela Cetesb, sendo este valor definido como “a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerado um cenário de exposição genérico” (CETESB, 2005a). Nestes casos, o órgão ambiental indica a necessidade de ações para resguardar os receptores de risco. À jusante de SB3, em SB2, as concentrações diminuem e apenas a concentração de benzeno continua acima dos valores permitidos pela legislação. Segundo Borden et al. (1995), a taxa de biodegradação de compostos aromáticos em ambientes aeróbios pode ser bastante alta, portanto é muito provável que mais à jusante a concentração deste contaminante atinja valores aceitáveis. Considerando que nesta região não há captação de água subterrânea para abastecimento público, a biorremediação natural monitorada é uma opção bastante adequada de saneamento, sendo que a instalação de novos poços de monitoramento à jusante de SB2 seria imprescindível para uma confirmação mais precisa da extensão dessa pluma.

4.2 – Caracterização das amostras de solos

A Tabela 4.4 traz a caracterização físico-química das amostras de solos. As concentrações de metais pesados não estão acima dos níveis mais restritivos determinados pela Cetesb (CETESB, 2005a).

Tabela 4.4 – Caracterização das amostras de solos

parâmetros	tipos de solo													
	ASP	SB	RC											
pH (CaCl ₂) ^a	6,7	5,0	6,7											
carbono orgânico (%)	1,39	0,99	0,29											
nitrogênio total (%)	0,08	0,07	0,02											
fósforo disponível (ppm)	6,0	3,0	2,0											
C:N:P	100 : 5,75 : 0,043	100 : 7,08 : 0,03	100 : 6,89 : 0,10											
	(mmolc/dm ³)													
K	1,7	1,4	1,1											
Ca	100	20	15											
Mg	8	6	2											
H+Al	11	16	10											
Al	- ^a	- ^a	- ^a											
CTC ^b	121,8	44,1	28,7											
granulometria (%)														
areia	78,7	66,7	81,4											
silte	16,3	18,3	7,3											
argila	5,0	15,0	11,3											
	micronutrientes (ppm)					metais pesados (ppm)								
solo	S	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	B	Co	Mo	Ba	Cd	Cr	Ni	Pb
ASP	24	24	136	9,4	1,6	1,7	0,24	- ^a	0,03	9,73	0,03	2,10	0,44	5,9
SB	14	17	150	49,1	1,1	2,2	0,21	2,29	- ^a	55,81	0,19	4,92	1,53	7,96
RC	12	13	19	3,0	0,6	7,3	0,15	0,56	- ^a	4,06	0,12	9,93	0,30	7,10

^a não detectado^b capacidade de troca catiônica

4.3 – Avaliação de diferentes técnicas de biorremediação aplicadas ao solo ASP

A quantidade acumulada de CO₂ produzido durante os 55 dias de incubação e a produção diária de CO₂ são mostradas nas Figuras 4.3 e 4.4, respectivamente. Os tratamentos não apresentaram a fase de adaptação (fase *lag*), provavelmente devido a uma adaptação prévia dos microrganismos aos poluentes e a condições experimentais favoráveis. Comparando a taxa de produção média de CO₂ durante os primeiros 20 dias e o período subsequente, houve uma diminuição de aproximadamente 45 % para os tratamentos 1; 3; 5 e 7, e 23 % para os tratamentos 2; 4; 6 e 8. Esta variação pode ter sido causada por uma transição de fontes de carbono. O consumo dos hidrocarbonetos mais facilmente biodegradáveis (hidrocarbonetos lineares e de cadeias abertas) resulta na diminuição da biodisponibilidade desses compostos. A falta dessas fontes exigiria uma adaptação metabólica dos microrganismos para consumirem hidrocarbonetos mais recalcitrantes, como os

poliaromáticos, resultando no decréscimo da produção de CO_2 . Como esse comportamento foi mais evidente em tratamentos com adição de nutrientes (1; 3; 5 e 7), isto sugere que o efeito benéfico obtido com os nutrientes é menos pronunciado na biodegradação de hidrocarbonetos recalcitrantes, como observado por Hencklein (2005) quando estudou a biodegradabilidade de borra oleosa de refinaria.

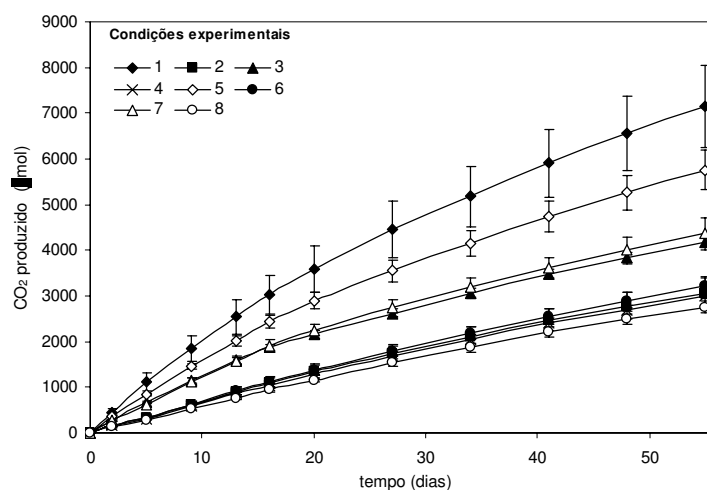


Figura 4.3 - Produção acumulada de CO_2 durante a incubação. Cada barra de erro representa 1 desvio padrão de três réplicas. Tratamentos: 1 – NP/S/CB; 2 – S/CB; 3 – NP/CB; 4 – CB; 5 – NP/S; 6 – S; 7 – NP; 8 – controle. NP: nitrogênio e fósforo; S: surfactante; CB: consórcio bacteriano.

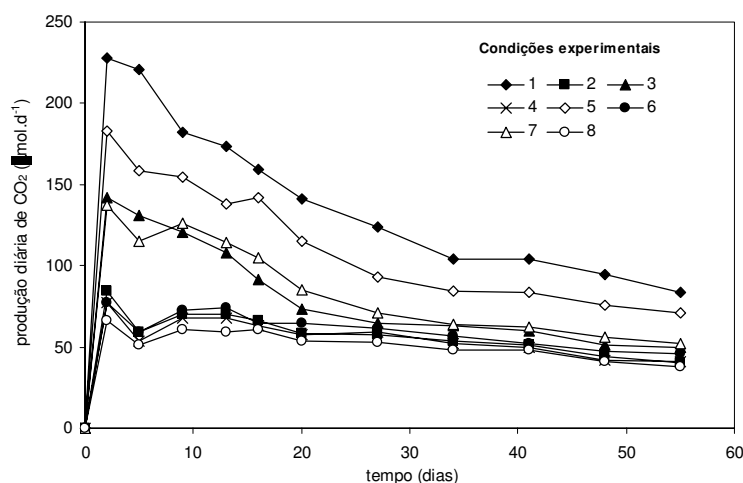


Figura 4.4 - Produção diária de CO_2 durante a incubação. Tratamentos: 1 – NP/S/CB; 2 – S/CB; 3 – NP/CB; 4 – CB; 5 – NP/S; 6 – S; 7 – NP; 8 – controle. NP: nitrogênio e fósforo; S: surfactante; CB: consórcio bacteriano.

A eficiência de biodegradação (EB) (Figura 4.5) foi calculada usando a Equação 3.3 baseada na produção total de CO_2 . Esta eficiência está relacionada com a mineralização dos

hidrocarbonetos, portanto, não considera a formação de subprodutos intermediários. Tratamentos com a adição de nutrientes (1; 3; 5 e 7) mostraram claramente melhores resultados (até 19,8%). Na Figura 4.6, o diagrama de Pareto, obtido através do planejamento experimental, representa os efeitos de cada variável testada na eficiência de biodegradação. Efeitos foram considerados estatisticamente significantes para um nível de 95% de confiabilidade, o qual é representado pela linha tracejada ($p = 0,05$). Efeitos com valores positivos acima daquele indicado pela linha tracejada indicam que o tratamento em questão é favorável para a eficiência de remoção dos poluentes. Assim, as três variáveis isoladamente e a combinação de nutrientes com surfactante (1 by 2) influenciaram positivamente o processo de biodegradação.

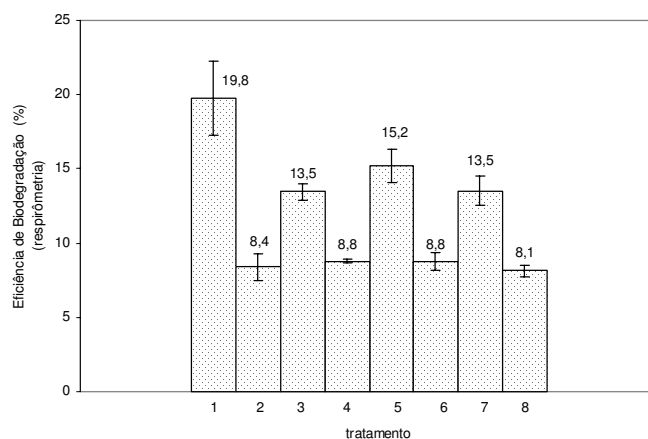


Figura 4.5 - Eficiência de biodegradação dos tratamentos obtida através de dados respirométricos. Cada barra de erro representa 1 desvio padrão de três réplicas.

Tratamentos: 1 – NP/S/CB; 2 – S/CB; 3 – NP/CB; 4 – CB; 5 – NP/S; 6 – S; 7 – NP; 8 – controle. NP: nitrogênio e fósforo; S: surfactante; CB: consórcio bacteriano.

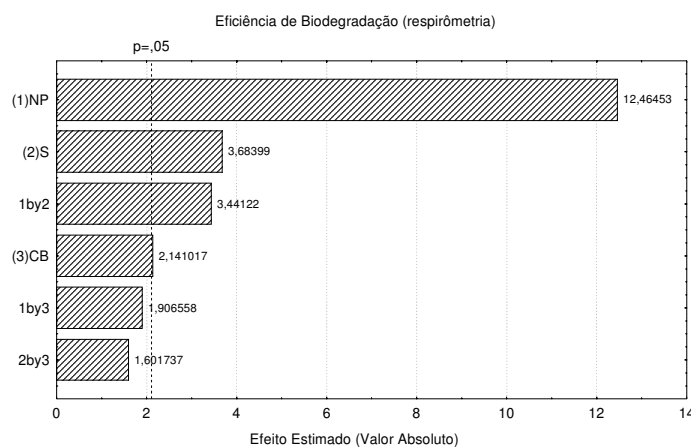


Figura 4.6 - Diagrama de Pareto gerado a partir das condições experimentais.

Tratamentos: NP: nitrogênio e fósforo; S: surfactante; CB: consórcio bacteriano.

O efeito relativamente maior dos nutrientes indica que a disponibilidade de nutrientes é um fator limitante importante da biorremediação natural do solo ASP. O efeito positivo desse tipo de tratamento foi verificado em diversos trabalhos (GALLEGO et al., 2001; CARDONA e ITURBE, 2003). Contudo, alguns estudos revelam que a correção das quantidades de nitrogênio e fósforo pode não apresentar efeitos na descontaminação (SEKLEMOVA et al., 2001; HENCKLEIN, 2005) ou mesmo representar um fator inibitório devido a uma quantidade excessiva adicionada (TRINDADE et al., 2002; WALWOTH et al., 1997). O nitrogênio quando adicionado na forma de sais de amônia pode ser tóxico aos microrganismos devido à possibilidade da geração de amônia, podendo ser letal em altas concentrações. Algumas fontes de fósforo (fosfatos e orto-fosfatos) podem ter diversos efeitos na biodegradação, dependendo da toxicidade e solubilidade apresentada por essas fontes ((GIBB et al., 2000 e MARGESIN et al., 2000) *apud* TRINDADE et al., 2002). Segundo Walworth et al. (1997), níveis inibitórios de nitrogênio estão na faixa de 100 a 4000 mgN.Kg⁻¹. Estes valores não estão de acordo com a correção de 2090 mgN.Kg⁻¹ efetuada nesse experimento.

A bioestimulação com a adição do surfactante Tween 80, cuja função é a de aumentar a disponibilidade dos hidrocarbonetos aos microrganismos, também apresentou efeitos positivos na eficiência de biodegradação, principalmente nos tratamentos (1 e 5) onde os nutrientes haviam sido ajustados. Os efeitos dos surfactantes em processos de biorremediação podem variar desde a estimulação até a inibição da desorção e biodegradação dos hidrocarbonetos (VOLKERING et al., 1998). Neste experimento, o surfactante não causou inibição do crescimento bacteriano devido a uma possível toxicidade de compostos metabólicos intermediários, assim como não houve estímulo do crescimento devido a uma possível utilização do surfactante como co-substrato, uma vez que a média da população bacteriana nos tratamentos com Tween 80 não difere estatisticamente (ANOVA) dos outros tratamentos. Aumento das taxas de biodegradação devido à adição do surfactante Tween 80 também foi obtido por Xie (2003), Kataoka (2001) e Mueller et al. (1991) *apud* Rouse et al. (1994). De acordo com Zheng e Obbard (2002), Tween 80 é um polioxietileno biodegradável e não apresenta toxicidade quando presente no ambiente. Contudo, Hencklein (2005) observou diminuição da eficiência de biodegradação ao utilizar esse surfactante, o qual pode ter aumentado a disponibilidade de compostos mais tóxicos presentes na borra oleosa oriunda de refinaria de petróleo.

O bioaumento com o consórcio bacteriano foi a variável que apresentou relativamente o menor efeito positivo nas taxas de biodegradação. Comparando-se os tratamentos 1 e 5, é possível observar que a presença do consórcio no tratamento 1 aumentou claramente a eficiência de biodegradação (Figura 4.5). Este efeito positivo também pode ser notado na contagem final da população bacteriológica, pois, o tratamento 1 foi o que apresentou maior acréscimo. Contudo, a média das populações nos tratamentos com bioaumento não foi estatisticamente (ANOVA) diferente dos outros tratamentos, o que pode ser um indício do fraco efeito dessa variável. Alguns pesquisadores reportam que o bioaumento pode não apresentar efeitos positivos, ou meramente marginais, na biodegradação de hidrocarbonetos. Culturas de microrganismos capazes de degradar poluentes orgânicos podem falhar nessa função quando inoculados em ambientes naturais, porque estão susceptíveis a toxinas ou predadores presentes no ambiente. Além disso, os microrganismos podem metabolizar outros compostos orgânicos em preferência ao poluente ou serem incapazes de se percolarem através do solo até os pontos de contaminação. O sucesso do uso de inóculos microbianos requer que os microrganismos entrem em contato com os contaminantes, contudo, a adsorção física às partículas do solo ou a filtração através de pequenos poros podem limitar o transporte dos microrganismos (MÁRQUES-ROCHA et al., 2001). Em alguns estudos, a estratégia do bioaumento tem apresentado melhores resultados quando realizada com microrganismos autóctones (BENTO et al., 2003).

Em termos de remoção de hidrocarbonetos (Figura 4.7), o comportamento foi similar aos dados respirométricos, isto é, tratamentos mais eficientes foram obtidos com nutrientes em combinação com outras estratégias. O tratamento 3 que apresentou maior remoção (57,8% de eficiência) de hidrocarbonetos (soma de todas as faixas) não corresponde ao tratamento com maior grau de mineralização (tratamento 1). Em relação às faixas de hidrocarbonetos, não houve diferenças significativas entre a biodegradação de hidrocarbonetos leves e pesados como observado por Bento et al. (2003). Os valores iniciais das concentrações são (mg.kg^{-1}): 151 (C8-C11); 1385(C11-C14); 2255 (C14-C20); 1770 (C20-C40); 5561 (total).

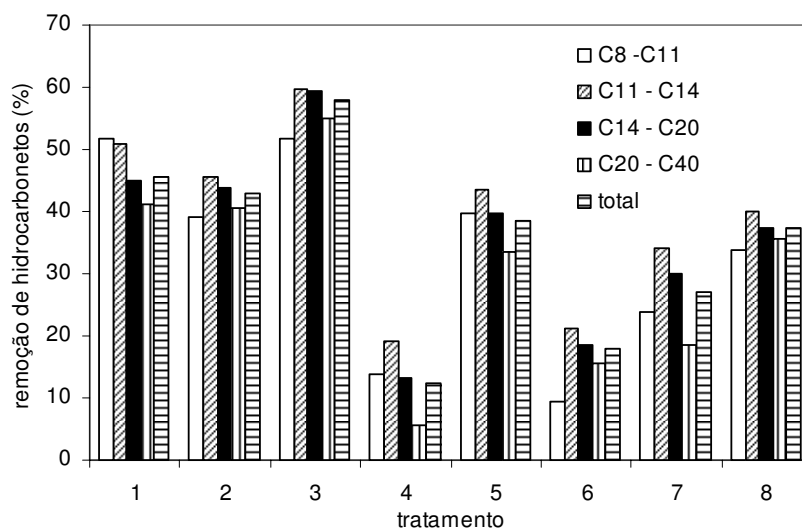


Figura 4.7 - Eficiência de remoção de hidrocarbonetos.

Análises realizadas pelo laboratório Bioagri Ambiental.

Tratamentos: 1 - NP/S/CB; 2 - S/CB; 3 - NP/CB; 4 - CB; 5 - NP/S; 6 - S; 7 - NP; 8 - controle.

NP: nitrogênio e fósforo; S: surfactante; CB: consórcio bacteriano.

Na Figura 4.8 está representada a contagem de bactérias heterotróficas totais presentes no solo antes e depois do experimento. Na maioria dos tratamentos, as populações microbiológicas no final do experimento eram aproximadamente de 2 a 30 vezes maiores que as iniciais. O número de bactérias heterotróficas não foi influenciado pelos tratamentos (ANOVA), como observado por Bento et al. (2003). Hickman e Novak (1989) concluíram que a biomassa microbiológica total pode ser um parâmetro ineficiente para se determinar o potencial de biodegradação, principalmente porque a biomassa ativa pode diferir na composição de espécies e nos regimes metabólicos.

Na contagem de bactérias heterotróficas totais após o término deste experimento, foi observado nas placas de Petri o domínio, em termos de número de unidades formadoras de colônia, de duas colônias que diferiam pela cor (branca e amarela). As colônias brancas foram classificadas como *Staphylococcus hominis* e as amarelas como *Kocuria palustris*, ambas cocus gram-positivos. Na literatura consultada, não foram encontrados estudos que relacionassem a presença dessas espécies em solos contaminados com hidrocarbonetos. Contudo, Gomes et al. (2004) isolaram *Staphylococcus aureus* de amostras de óleo pesado.

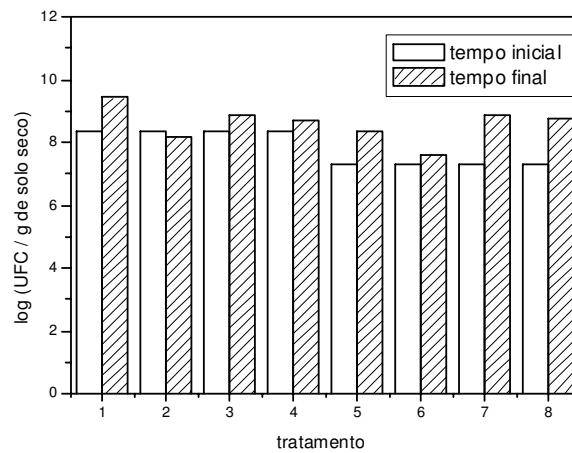


Figura 4.8 - População de bactérias heterotróficas totais presentes no solo nos tempos inicial e final do experimento respirométrico.

Tratamentos: 1 – NP/S/CB; 2 – S/CB; 3 – NP/CB; 4 – CB; 5 – NP/S; 6 – S; 7 – NP; 8 – controle. NP: nitrogênio e fósforo; S: surfactante; CB: consórcio bacteriano.

A Tabela 4.5 expressa os valores de pH e consumo de nitrogênio e fósforo no final dos tratamentos. Os valores de pH nos tratamentos sem adição de nutrientes aumentaram em comparação ao valor inicial de 6,7. Segundo Rhaman et al. (2003), um aumento no valor de pH sugere a formação de sub-produtos durante a degradação dos hidrocarbonetos. Este comportamento não foi observado nos tratamentos com adição de nutrientes, pois, o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tem a propriedade de aumentar a acidez do solo. É importante ressaltar que nenhum dos valores finais de pH é considerado prejudicial à atividade biológica.

Em relação aos nutrientes, o consumo de N apresentou uma relação linear com a eficiência de biodegradação ($r = 0,7485$; $p = 0,0326$); o baixo consumo de P nos tratamentos sem ajuste de nutrientes sugere que esse elemento, quando em baixas concentrações, não está disponível para a população bacteriana.

Tabela 4.5 - Valores de pH e consumo de nitrogênio e fósforo no final do experimento respirométrico.

tratamento	pH final (CaCl ₂)	N (mg.Kg ⁻¹)	P (mg.Kg ⁻¹)
1	6,5	760	73
2	7,4	310	1
3	6,7	970	69
4	7,5	310	0
5	6,7	1110	71
6	7,5	380	0
7	6,8	900	59
8	7,5	450	0

Tratamentos: 1 – NP/S/CB; 2 – S/CB; 3 – NP/CB; 4 – CB; 5 – NP/S; 6 – S; 7 – NP; 8 – controle. NP: nitrogênio e fósforo; S: surfactante; CB: consórcio bacteriano.

Os resultados obtidos com o teste biológico de toxicidade aguda com *Daphnia similis* estão listados na Tabela 4.6. Inicialmente, somente tratamentos com adição de nutrientes apresentaram algum grau de toxicidade e no final dos tratamentos ocorreram diferentes graus de toxicidade, independentemente das estratégias e eficiência de biodegradação alcançada. Mediante os dados da Tabela 4.6, é razoável rejeitar qualquer efeito tóxico derivado dos nutrientes e do surfactante Tween 80. Pelo fato do teste ser baseado na extração aquosa dos poluentes, a maioria dos hidrocarbonetos iniciais, que tem baixa solubilidade em água, foi limitadamente transferida para a água. Assim, uma possível explicação para o aumento da toxicidade durante a conversão microbiana dos hidrocarbonetos é a formação de metabólitos intermediários mais solúveis.

Tabela 4.6 - Teste de toxicidade aguda empregando *Daphnia similis*.

	CE50, 48h dos tratamentos							
tempo	1	2	3	4	5	6	7	8
inicial	7,16	- ¹	7,16	-	7,16	-	7,16	-
final	6,91	6,32	7,03	0,83	4,17	1,78	0,73	0,17

¹ não tóxico

Tratamentos: 1 – NP/S/CB; 2 – S/CB; 3 – NP/CB; 4 – CB; 5 – NP/S; 6 – S; 7 – NP; 8 – controle. NP: nitrogênio e fósforo; S: surfactante; CB: consórcio bacteriano.

4.4 – Avaliação da técnica de bioaumento aplicada a solos

4.4.1 – Teste de biodegradabilidade do óleo diesel

Os resultados obtidos com o teste de biodegradabilidade usando o indicador DCPIP (Tabela 4.7) mostram que os inóculos usados nos tratamentos são capazes de degradar óleo diesel (comercial). Além disso, os testes realizados com os microrganismos nativos indicam que os solos têm uma microbiota adaptada para degradar hidrocarbonetos.

Tabela 4.7 - Teste de biodegradabilidade do óleo diesel (comercial) usando o indicador DCPIP

cultura	descoloração
<i>S. hominis</i>	sim (após 3 dias)
<i>K. palustris</i>	sim (após 3 dias)
<i>S. hominis</i> + <i>K. palustris</i>	sim (após 3 dias)
<i>O. anthropi</i>	sim (após 3 dias)
consórcio microbiano - R	sim (após 4 dias)
inóculo comercial - EM	sim (após 13 dias)
microrganismos nativos - ASP	sim (após 3 dias)
microrganismos nativos - SB	sim (após 6 dias)
microrganismos nativos - RC	sim (após 2 dias)

Obs: durante o teste não foi observado descoloração do controle do substrato (sem inóculo) ou do controle do inóculo (sem óleo diesel).

4.4.2 – Experimentos respirométricos

A produção diária e acumulada de CO₂ nos tratamentos 1, 2 e 3 (solo ASP) são mostrados, respectivamente, nas Figuras 4.9 e 4.10. Não houve fase de adaptação em nenhum dos tratamentos, provavelmente devido a uma adaptação prévia dos microrganismos aos poluentes (o inóculo consistiu de microrganismos indígenas) e a favoráveis condições experimentais. Inicialmente a produção de CO₂ nos tratamentos 2 e 3 (Figura 4.9) é claramente superior ao 1, contudo, aproximadamente depois do 15º dia, estas curvas mostram uma tendência de alcançar valores iguais ao do controle (tratamento 1), supostamente devido à exaustão dos hidrocarbonetos prontamente degradáveis e ao consumo de nutrientes (Tabela 4.12).

A produção de CO₂ nos tratamentos com o solo SB (4 ao 6), representada nas Figuras 4.11 e 4.12, demonstram que também não houve fase de adaptação nesses casos, apesar do inóculo ser constituído por microrganismos exógenos. A adição de nutrientes no solo SB teve um efeito positivo menos pronunciado. De acordo com Bosma et al. (1997), a taxa em que as células microbianas podem converter compostos químicos durante a biorremediação depende de dois fatores: a velocidade do metabolismo (a atividade intrínseca da célula) e a taxa de transferência do contaminante para a célula (transferência de massa), a chamada biodisponibilidade. A correção nutricional está relacionada ao primeiro fator, mas esta pode não ter efeito quando a transferência de massa é um fator limitante.

A diminuição da biodisponibilidade pode ser um resultado de dois fatores no caso do solo SB. Como relatado por Löser et al. (1999), a presença de partículas finas no solo e baixos níveis de concentração de hidrocarbonetos influenciam negativamente a biodisponibilidade. O solo SB tem uma porcentagem de argila três vezes maior que o solo ASP (Tabela 4.4) e concentrações menores de hidrocarbonetos, respectivamente, 7198 e 22607 mg.kg⁻¹.

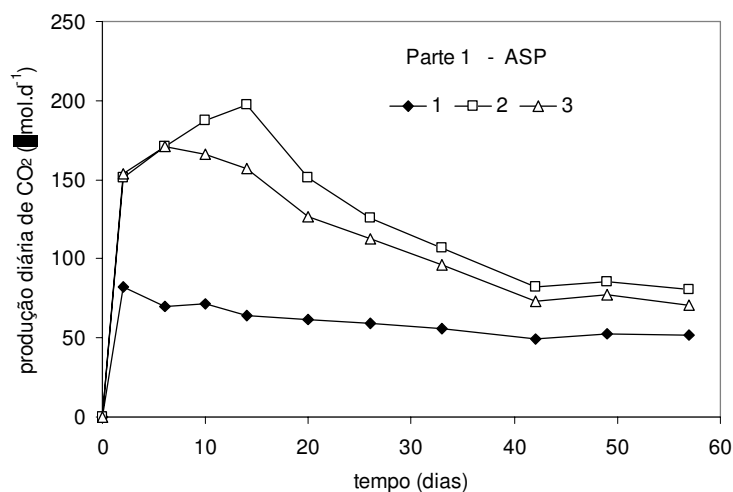


Figura 4.9 - Produção diária de CO₂ durante a incubação dos tratamentos (ASP – parte 1).

Tratamentos: 1 – controle (nenhum tratamento); 2 - bioestimulação (adição de N e P); 3 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumentação (consórcio bacteriano).

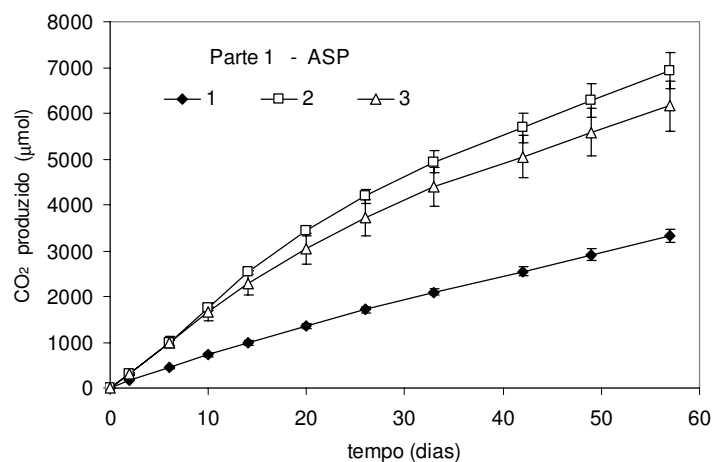


Figura 4.10 - Produção acumulada de CO₂ durante incubação dos tratamentos (ASP – parte 1). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.

Tratamentos: 1 – controle (nenhum tratamento); 2 - bioestimulação (adição de N e P); 3 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumentação (consórcio bacteriano).

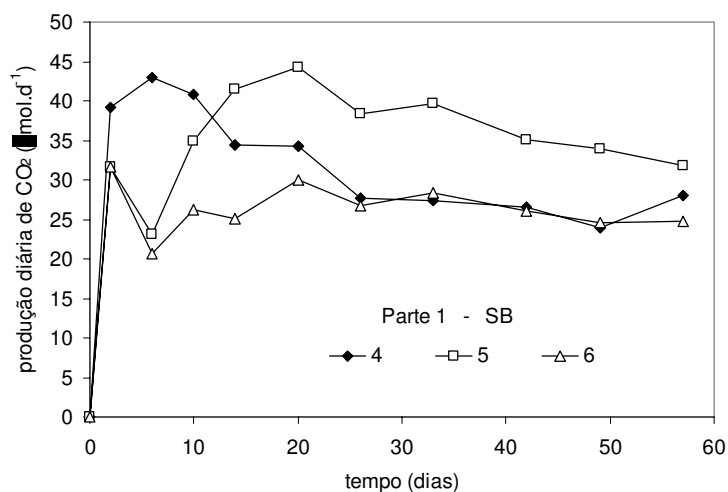


Figura 4.11 - Produção diária de CO₂ durante a incubação dos tratamentos (SB – parte 1).

Tratamentos: 4 – controle (nenhum tratamento); 5 - bioestimulação (adição de N e P); 6 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumento (consórcio bacteriano).

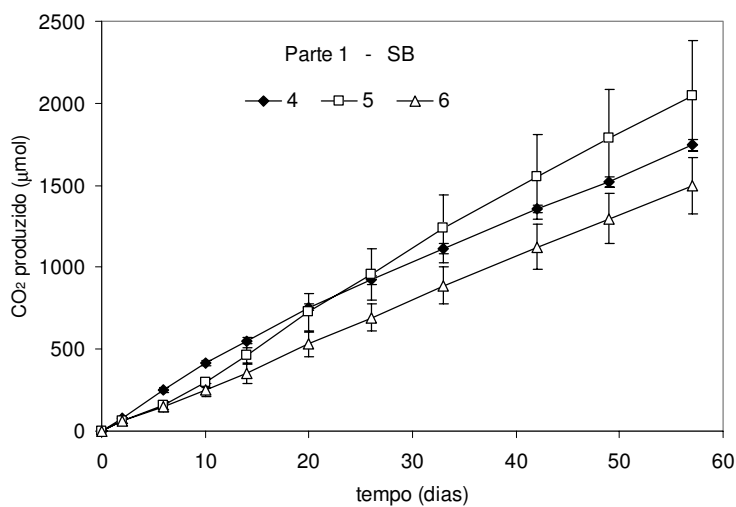


Figura 4.12 - Produção acumulada de CO₂ durante a incubação dos tratamentos (SB – parte 1). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.

Tratamentos: 4 – controle (nenhum tratamento); 5 - bioestimulação (adição de N e P); 6 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumento (consórcio bacteriano).

Baseado na produção de CO₂, a eficiência de biodegradação (EB) foi calculada usando a Equação 3.3 (Figuras 4.13 e 4.14). Esta eficiência está relacionada à mineralização dos hidrocarbonetos, portanto, não considera a formação de intermediários. Para ambos os solos, a adição de nutrientes teve um efeito positivo na eficiência de biodegradação (ANOVA, nível de confiança de 95%). O bioestímulo com a adição de nutrientes (N e P) tem sido

reportado como um importante fator para aumentar a eficiência da biorremediação (GALLEGO et al., 2001; CARDONA e ITURBE, 2003). Contudo, quando considerado o foco principal desse experimento, isto é, o estímulo da biorremediação mediante a injeção de inóculo, no solo ASP isto não teve efeito, e no solo SB a influência negativa do inóculo diminuiu o efeito positivo alcançado com a injeção de nutrientes, de maneira que este tratamento obteve uma eficiência de biodegradação com nenhuma diferença em relação ao controle.

Em alguns estudos, com o bioaumento da população bacteriana que está presente no solo, a degradação de óleo diesel e outros hidrocarbonetos presente no solo foi favorecida (KATAOKA, 2001; BENTO et al., 2003). No entanto, alguns pesquisadores reportam que a injeção de inóculos não tem efeitos positivos ou são pouco significativos (MÁRQUES-ROCHA et al., 2001), um comportamento verificado no caso do solo ASP. O resultado obtido com o solo SB sugere que a competição por regimes metabólicos entre as culturas inoculadas e nativas e as diferentes condições do solo (a adaptação do inóculo a condições mais ácidas no solo SB, Tabela 4.4) podem ter influenciado negativamente. Este efeito prejudicial obtido com a técnica de bioaumento também foi observado por Pala et al. (2002) e Trindade et al. (2002).

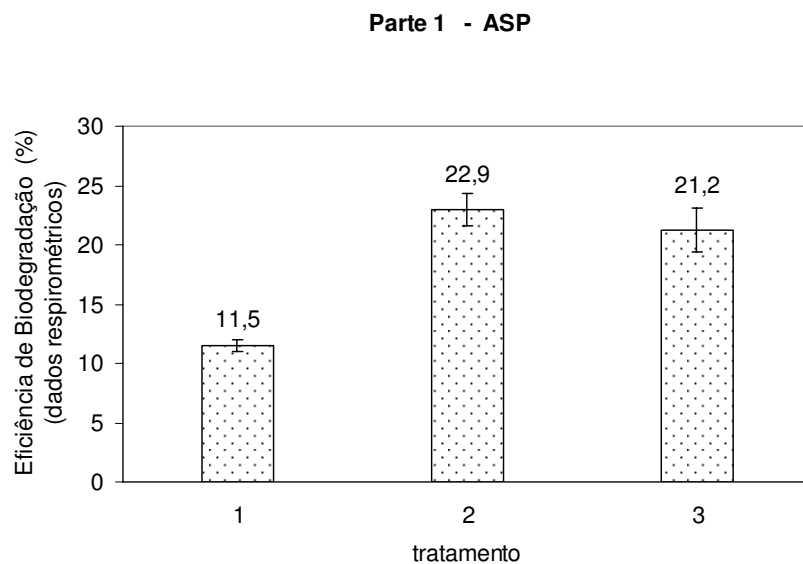


Figura 4.13 - Eficiência de biodegradação obtida com os dados respirométricos dos tratamentos (ASP – parte 1). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.

Tratamentos: 1 – controle (nenhum tratamento); 2 - bioestimulação (adição de N e P); 3 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumento (consórcio bacteriano).

Parte 1 - SB

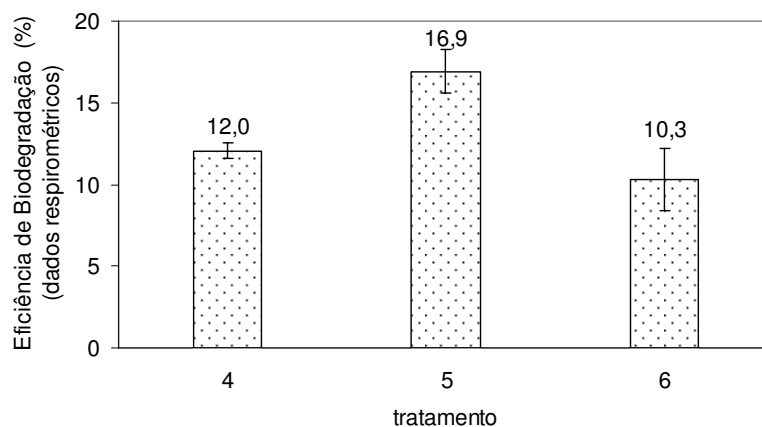


Figura 4.14 - Eficiência de biodegradação obtida com os dados respirométricos dos tratamentos (SB – parte 1). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.

Tratamentos: 4 – controle (nenhum tratamento); 5 - bioestimulação (adição de N e P); 6 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumento (consórcio bacteriano).

Na Figura 4.23 está representada a contagem de bactérias heterotróficas totais realizada antes e após os tratamentos. Em relação ao solo ASP, os tratamentos com adição de nutrientes (2 e 3) tiveram a população bacteriana final maior que a do controle e é possível verificar a ineficiência do inóculo no tratamento 3, pois, a contagem final foi igual ao do tratamento 2, apesar de uma população inicial maior. No solo SB, o valor final no tratamento 5 é maior que no tratamento 4, confirmando o efeito positivo dos nutrientes que proporcionaram um crescimento significativo em relação ao tempo inicial. Este comportamento não foi observado no tratamento 6, possivelmente devido à competição causada pelos microrganismos exógenos.

Análises cromatográficas de amostras dos solos ASP e SB (Tabela 4.8) revelam que nesses locais o óleo diesel sofreu um processo de intemperização, isto é, o combustível teve suas características alteradas por mecanismos físico-químicos e biológicos devido ao longo período de exposição às condições naturais.

O óleo diesel contém de 2000 a 4000 hidrocarbonetos, que compõem uma mistura complexa de alcanos normais, ramificados e cíclicos e compostos aromáticos (GALLEGO et al., 2001), os quais não podem ser totalmente separados pela cromatografia gasosa. De fato,

somente os n-alcenos e alguns hidrocarbonetos ramificados podem ser identificados separadamente. Perfis cromatográficos de um óleo diesel comercial, como usado nos tratamentos 7 ao 12 (Figura 4.19), geralmente apresentam uma resolução satisfatória para todos os n-alcenos e alguns outros alcanos isoprenóides, como o pristano (2,6,10,14-tetrametil-pentadecano) e o fitano (2,6,10,14-tetrametil-hexadecano). Contudo, a maior fração do óleo diesel não é caracterizada, porque a maioria dos componentes não pode ser resolvida e estes aparecem nos cromatogramas como uma “lombada”, que é chamada a “mistura complexa não resolvida (MCNR)”, que presumivelmente inclui alcanos ramificados e cíclicos e subprodutos das transformações dos hidrocarbonetos (MARCHAL et al., 2003; BREGNARD et al., 1996). Os hidrocarbonetos resolvidos são chamados “hidrocarbonetos totais resolvidos (HTR)” e os “hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP)” são a soma dos HTR e da MCNR. Os HTR são hidrocarbonetos não degradados e aparecem como picos nos cromatogramas.

Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos usualmente degradam alcanos ramificados e compostos isoprenóides em velocidades menores que os alcanos de cadeias lineares. Portanto, a razão de alcanos lineares em relação aos compostos altamente ramificados pode refletir a extensão de degradação do óleo diesel causada por microrganismos (BALBA et al., 1998). Nos cromatogramas, a “lombada” correspondente à MCNR torna-se maior e os picos dos HTR diminuem devido à biodegradação.

Os hidrocarbonetos nos solos ASP e SB são principalmente caracterizados como alcanos isoprenóides e MCNR, os quais são mais recalcitrantes que os n-alcenos (GALLEGO et al., 2001), e esta composição é característica de um óleo diesel intemperizado.

Tabela 4.8 - Concentração de hidrocarbonetos nos solos ASP e SB

solo	n-alcenos totais	pristano	fitano	HTR	MCNR	HTP
(mg.kg ⁻¹)						
ASP	<LD	266	162	2844	19763	22607
SB	81,8	65,0	43,8	941	6256	7198

LD (limite de detecção) = 0,4 mg.kg⁻¹

HTR – Hidrocarbonetos Totais Resolvidos; MCNR – Mistura Complexa não Resolvida; HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
Análises realizadas por Analytical Technology .

A concentração de hidrocarbonetos determinada no início e fim dos tratamentos 1 ao 6 é mostrada na Tabela 4.9. Somente a fração HTR foi determinada inicialmente e as concentrações do pristano e fitano não foram aferidas para esses tratamentos. Os resultados estão de acordo com os dados respirométricos, isto é, maiores eficiência de remoção de HTR e menor concentração final das outras frações de hidrocarbonetos nos tratamentos com

melhores eficiências de biodegradação. Estes resultados também indicam que os microrganismos autóctones estavam adaptados ao óleo diesel intemperizado presente nos solos ASP e SB e que um conteúdo desbalanceado de nutrientes era um fator limitante. Cromatogramas das análises finais podem ser vistos na Figura 4.15.

Tabela 4.9 - Concentração de hidrocarbonetos no início (1) e final (2) dos tratamentos 1 ao 6. Valores entre parênteses indicam a eficiência de remoção (%)

tratamento	HTR		n-alcenos totais	MCNR	HTP
	1	2	2	2	2
	mg.kg⁻¹				
1	4084	3620 (11)	<LD ¹	20112	23732
2	4084	2650 (35)	<LD ¹	15970	18620
3	4084	2988 (27)	<LD ¹	17157	20145
4	877	565 (36)	<LD ²	3287	3851
5	877	383 (56)	<LD ²	2185	2568
6	877	752 (14)	<LD ²	4423	5175

LD (limite de detecção) = (1) 21 mg.kg⁻¹; (2) 8 mg.kg⁻¹

HTR – Hidrocarbonetos Totais Resolvidos; MCNR – Mistura Complexa não Resolvida;

HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo;

Análises realizadas por Analytical Technology, exceto HTR no tempo inicial (Bioagri Ambiental).

Tratamentos: (ASP – parte 1) 1 – controle (nenhum tratamento); 2 - bioestimulação (adição de N e P); 3 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumentamento (consórcio bacteriano). (SB – parte 1) 4 – controle (nenhum tratamento); 5 - bioestimulação (adição de N e P); 6 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumentamento (consórcio bacteriano).

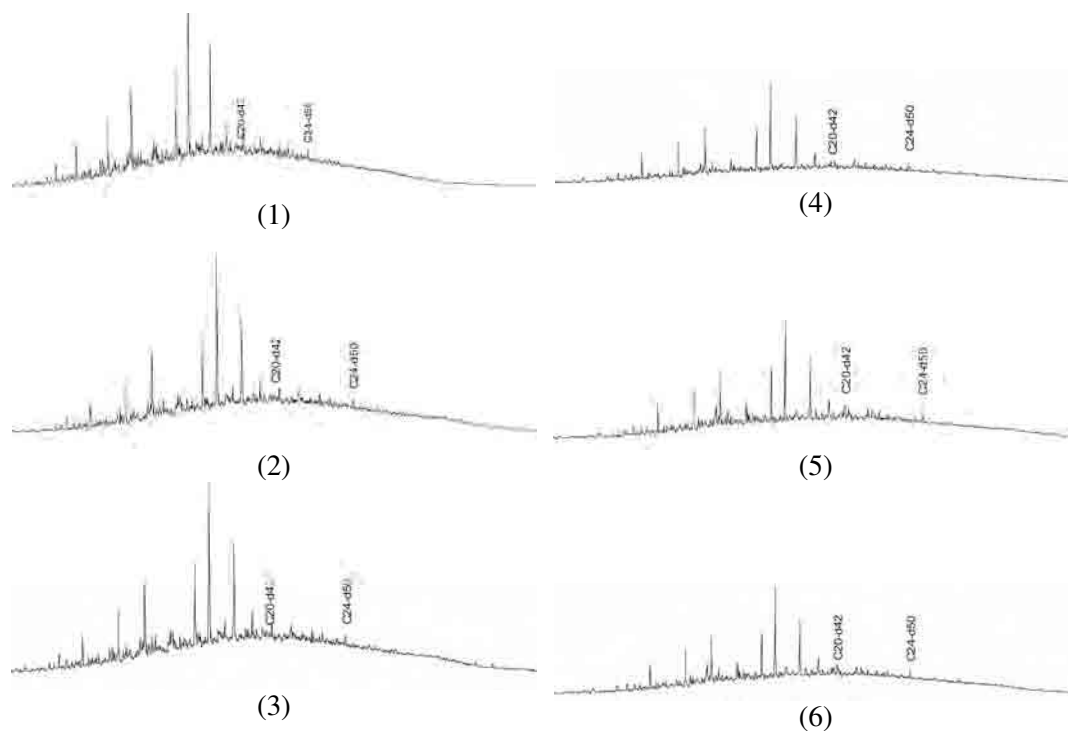


Figura 4.15 - Análise cromatográfica (HTP) no tempo final dos tratamentos com os solos ASP (1 a 3) e SB (4 a 5). Fatores de diluição: 50x (1; 2 e 3); 20x (4 e 6); 10x (5).

Tratamentos: (ASP – parte 1) 1 – controle (nenhum tratamento); 2 - bioestimulação (adição de N e P); 3 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumento (consórcio bacteriano). (SB – parte 1) 4 – controle (nenhum tratamento); 5 - bioestimulação (adição de N e P); 6 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumento (consórcio bacteriano).

A produção de CO_2 nos tratamentos 7 a 12 (segunda parte dos experimentos respirométricos – solo RC) e seus valores acumulados são mostrados, respectivamente, nas Figuras 4.16 e 4.17. Não houve fase de adaptação (*lag phase*) nos tratamentos, provavelmente pela adaptação prévia dos microrganismos aos hidrocarbonetos, pois o solo RC já mostrava baixo nível de contaminação antes da adição artificial de óleo diesel (Tabela 4.10), possivelmente devido a vazamentos nas tubulações subterrâneas e infiltrações no piso. Aproximadamente após o 20º dia, a produção de CO_2 em todos os tratamentos onde o óleo diesel foi adicionado, começa a diminuir, o que pode representar uma falta de fontes de carbono facilmente assimiláveis como os n-alcenos, presumidamente consumidos no início dos tratamentos.

Nos tratamentos com adição de inóculo, a eficiência de biodegradação (Figura 4.18) não foi afetada (ANOVA, nível de confiança de 95%) em comparação ao controle (tratamento 8).

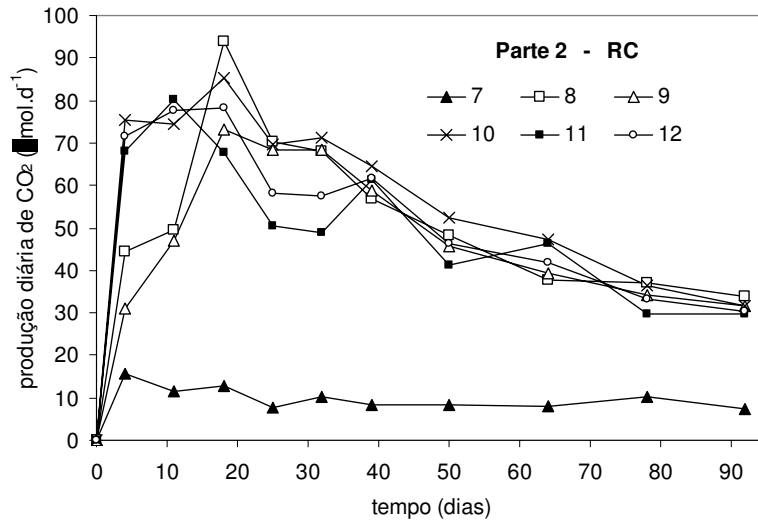


Figura 4.16 - Produção diária de CO₂ durante a incubação dos tratamentos (RC – parte 2).

Tratamentos: 7 - controle 1 - (apenas solo); 8 – controle 2 - (contaminação sem bioaumento); 9 - bioaumento (*S. hominis* / *K. palustris*) antes de contaminação; 10 - bioaumento (*S. hominis* / *K. palustris*) depois de contaminação; 11 - bioaumento (*Ochrobactrum anthropi*) depois de contaminação; 12 - bioaumento (consórcio - R) depois de contaminação.

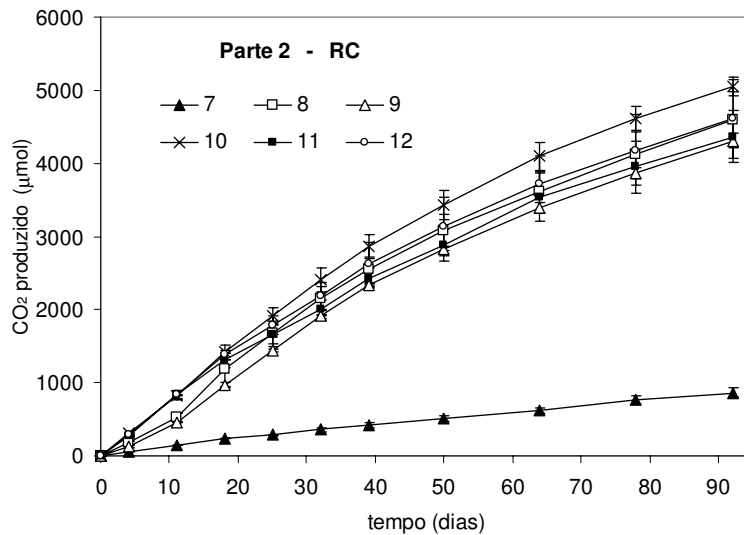


Figura 4.17 - Produção acumulada de CO₂ durante a incubação dos tratamentos (RC – parte 2). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.

Tratamentos: 7 - controle 1 - (apenas solo); 8 – controle 2 - (contaminação sem bioaumento); 9 - bioaumento (*S. hominis* / *K. palustris*) antes de contaminação; 10 - bioaumento (*S. hominis* / *K. palustris*) depois de contaminação; 11 - bioaumento (*Ochrobactrum anthropi*) depois de contaminação; 12 - bioaumento (consórcio - R) depois de contaminação.

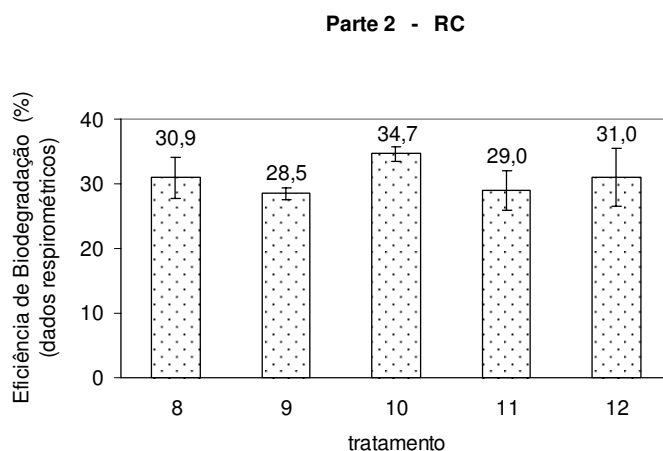


Figura 4.18 - Eficiência de biodegradação obtida com os dados respirométricos dos tratamentos (RC – parte 2). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.

Tratamentos: 8 – controle 2 - (contaminação sem bioaumentação); 9 - bioaumentação (*S. hominis* / *K. palustris*) antes de contaminação; 10 - bioaumentação (*S. hominis* / *K. palustris*) depois de contaminação; 11 - bioaumentação (*Ochrobactrum anthropi*) depois de contaminação; 12 - bioaumentação (consórcio - R) depois de contaminação.

A eficiência de biodegradação em termos de remoção de HTP (Tabela 4.10) mostrou comportamento similar aos dados respirométricos. As eficiências respirométricas foram aproximadamente de 30 % para todos os tratamentos (8 ao 12) e seguindo esta tendência de nenhuma diferença entre os tratamentos, a remoção de HTP foi aproximadamente 50 % para todos os tratamentos, embora no tratamento 10 a remoção foi ligeiramente maior (58,6 %).

Comparando os cromatogramas do tempo inicial com os do tempo final (Figura 4.19), é bastante clara a diminuição dos picos referentes aos HTR. A Tabela 4.10 mostra que os componentes do óleo diesel foram degradados na ordem decrescente esperada de susceptibilidade (GALLEGO et al., 2001): n-alcenos, alcenos isoprenóides (pristano e fitano) e MCNR. Nos tratamentos 9 ao 12 (especialmente no 10), onde os inóculos foram adicionados, a remoção de componentes mais recalcitrantes foi maior comparada ao tratamento 8, enquanto que a remoção dos n-alcenos teve um comportamento inverso. Estas informações obtidas com as análises cromatográficas mostram que, apesar dos dados respirométricos similares, a injeção de microrganismos oriundos de ambientes poluídos aumentaram a biodegradação de compostos recalcitrantes. Resultados similares foram obtidos por Marchal et al. (2003).

Tabela 4.10 - Concentração de hidrocarbonetos no início (1) e final (2) dos tratamentos com o solo RC. Valores entre parênteses indicam a eficiência de remoção (%)

tratamento	n-alcenos totais		pristano		fitano		HTR		MCNR		HTP	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	(mg.kg ⁻¹)											
7	- ^a	-	-	-	-	-	104	-	-	-	-	-
8	499	38 (92,0)	44	25 (43,2)	24	15 (39,1)	1232	341	4199	2717 (35,3)	5431	3058 (43,7)
9	499	90 (81,9)	44	22 (50,1)	24	13 (45,8)	1232	339	4199	2564 (38,9)	5431	2903 (46,5)
10	499	86 (82,7)	44	15 (66,4)	24	9 (64,3)	1232	262	4199	1984 (52,8)	5431	2246 (58,6)
11	499	186 (62,8)	44	21 (52,9)	24	11 (52,5)	1232	463	4199	2292 (45,4)	5431	2755 (49,3)
12	499	194 (61,1)	44	21 (50,8)	24	12 (45,4)	1232	503	4199	2449 (41,7)	5431	2952 (45,6)

^a não analisado

HTR – Hidrocarbonetos Totais Resolvidos; MCNR – Mistura Complexa não Resolvida; HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

Análises realizadas por Analytical Technology, exceto tratamento 7 (Bioagri Ambiental).

Tratamentos: 7 - controle 1 - (apenas solo); 8 – controle 2 - (contaminação sem bioaumentação); 9 - bioaumentação (*S. hominis* / *K. palustris*) antes de contaminação; 10 - bioaumentação (*S. hominis* / *K. palustris*) depois de contaminação; 11 - bioaumentação (*Ochrobactrum anthropi*) depois de contaminação; 12 - bioaumentação (consórcio - R) depois de contaminação.

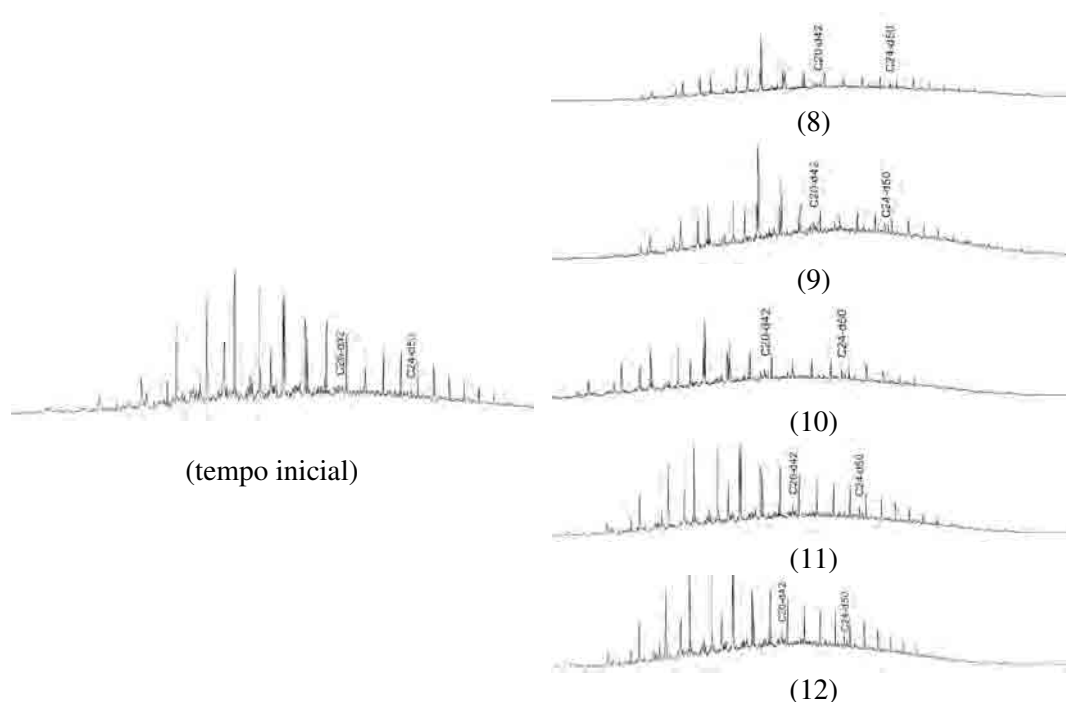


Figura 4.19 - Análise cromatográfica (HTP) nos tempos inicial e final dos tratamentos com o solo RC (8 a 11). Fatores de diluição: 20x (inicial e 8); 10x (9 a 12).

Tratamentos: 8 – controle 2 - (contaminação sem bioaumentação); 9 - bioaumentação (*S. hominis* / *K. palustris*) antes de contaminação; 10 - bioaumentação (*S. hominis* / *K. palustris*) depois de contaminação; 11 - bioaumentação (*Ochrobactrum anthropi*) depois de contaminação; 12 - bioaumentação (consórcio - R) depois de contaminação.

Valores similares de populações bacterianas iniciais nos tratamentos 7 a 9 (Figura 4.23) indicam que os microrganismos adicionados previamente à contaminação (tratamento 9)

não aumentaram consideravelmente a população microbiana, talvez devido à falta de fontes de carbono adicionais. Esta observação e o fato de que não houve nenhum aumento na taxa de biodegradação sugerem que esta estratégia de bioaumento antes de ocorrer a contaminação tem ainda maiores chances de falhar em situações reais, pois, durante o possível longo período entre a injeção do inóculo e o vazamento, os microrganismos têm que sobreviver perante predadores, competir por nutrientes escassos e manter suas habilidades degradadoras. Além disso, como demonstrado no item 4.4.1, microrganismos hidrocarbonoclasticos sempre estão presentes em solos, mesmo aqueles não contaminados (VENKATESWARAN e HARAYAMA, 1995; RON e ROSENBERG, 2002 *apud* LEE et al., 2006).

Nos tratamentos 11 e 12, a adição de inóculos mais concentrados fez com que a população microbiana inicial aumentasse para valores entre 10^8 e 10^9 UFC por grama de solo seco. Contudo, como nos outros tratamentos, incluindo o tratamento 7 (controle sem adição de óleo diesel), a contagem foi de aproximadamente 10^7 no tempo final. Esta similaridade mostra que geralmente a biomassa microbiana pode ser um indicativo fraco para se determinar o potencial de biodegradação como observado por Hickman e Novak (1989), principalmente porque a biomassa ativa pode diferir na composição de espécies e nos regimes metabólicos.

A Tabela 4.12 mostra os valores de pH e consumo de nitrogênio e fósforo no final dos tratamentos. O pH manteve-se estável em valores neutros em todos os tratamentos (7 ao 12), o que é uma condição favorável à biodegradação. Em relação aos nutrientes, não houve consumo de N ou P. Isto sugere que a maioria das formas químicas destes compostos não estavam disponíveis aos microrganismos. Provavelmente, a adição balanceada de formas facilmente assimiláveis, como aquelas empregadas nos solos ASP e SB ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4) (item 4.3), aumentaria a eficiência de biodegradação.

A produção de CO_2 nos tratamentos 13 e 14 (terceira parte dos experimentos respirométricos – solo ASP) e seus valores acumulados são mostrados, respectivamente, nas Figuras 4.20 e 4.21. Não houve fase de adaptação nos tratamentos. Após aproximadamente o 10º dia, a produção de CO_2 , em ambos os tratamentos, começa a diminuir, o que pode representar uma falta de fontes de carbonos mais facilmente assimiláveis como os n-alcenos.

Análises estatísticas (ANOVA, nível de confiança de 95%) das eficiências de biodegradação (Figura 4.22) mostram que a adição do inóculo comercial EM não teve influência em comparação ao controle (tratamento 13). Este comportamento é também observado na concentração de hidrocarbonetos (Tabela 4.11), cujos cromatogramas são

apresentados na Figura 4.24. A ineficiência do inóculo EM pode ser relacionado a sua incapacidade de sobreviver no solo ASP, fato indicado pelo valor mais baixo de contagem de bactérias em relação ao controle (tratamento 13) (Figura 4.23) sendo também importante ressaltar que o consórcio comercial EM nunca havia sido empregado na biorremediação de hidrocarbonetos.

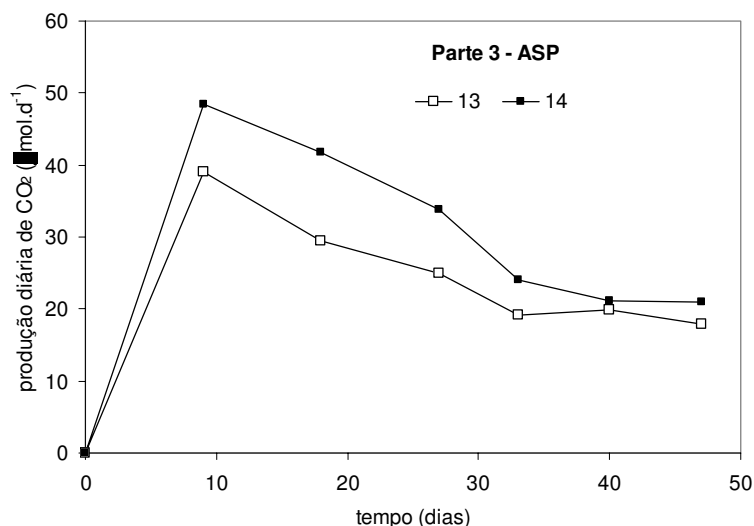


Figura 4.20 - Produção diária de CO₂ durante a incubação dos tratamentos (ASP – parte 3).

Tratamentos: 13 - controle (nenhum tratamento); 14 - bioaumento (inóculo comercial).

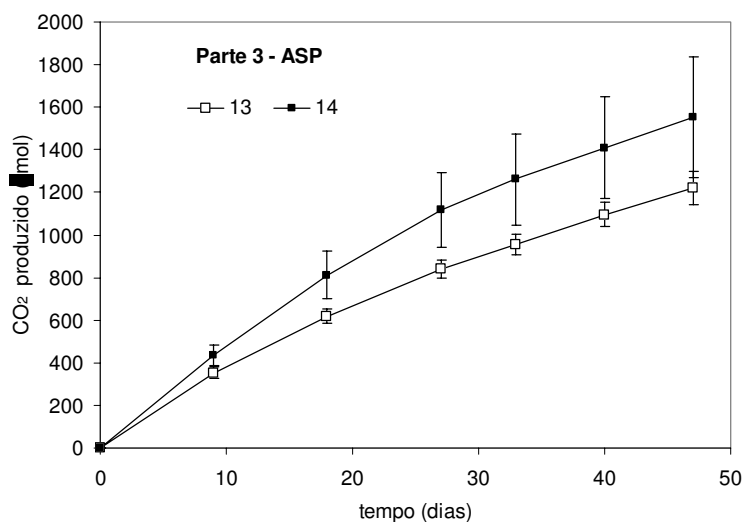


Figura 4.21 - Produção acumulada de CO₂ durante a incubação dos tratamentos (ASP – parte 3). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.

Tratamentos: 13 - controle (nenhum tratamento); 14 - bioaumento (inóculo comercial).

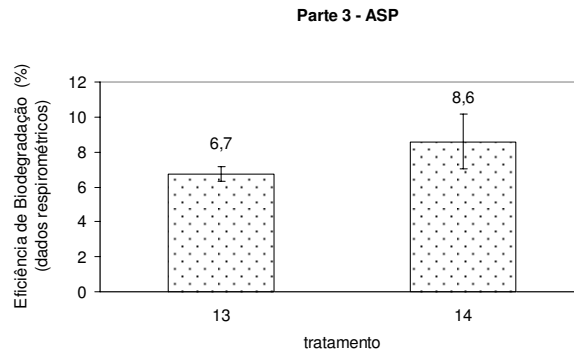


Figura 4.22 - Eficiência de biodegradação obtida com os dados respirométricos dos tratamentos (ASP – parte 3). Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.

Tratamentos: 13 - controle (nenhum tratamento); 14 - bioaumentação (inóculo comercial).

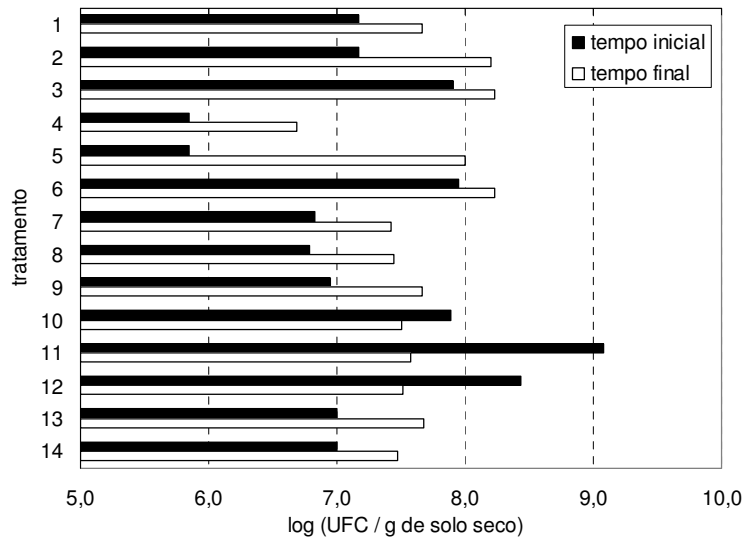


Figura 4.23 - Contagem de bactérias heterotróficas totais no início e final dos experimentos respirométricos.

Tratamentos: (ASP – parte 1) 1 – controle (nenhum tratamento); 2 - bioestimulação (adição de N e P); 3 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumentação (consórcio bacteriano). (SB – parte 1) 4 – controle (nenhum tratamento); 5 - bioestimulação (adição de N e P); 6 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumentação (consórcio bacteriano). (RC – parte 2) 7 - controle 1 - (apenas solo); 8 – controle 2 - (contaminação sem bioaumentação); 9 - bioaumentação (*S. hominis* / *K. palustris*) antes de contaminação; 10 - bioaumentação (*S. hominis* / *K. palustris*) depois de contaminação; 11 - bioaumentação (*Ochrobactrum anthropi*) depois de contaminação; 12 - bioaumentação (consórcio - R) depois de contaminação. (ASP – parte 3) 13 - controle (nenhum tratamento); 14 - bioaumentação (inóculo comercial).

Tabela 4.11 - Concentração de hidrocarbonetos no início (1) e final (2) dos tratamentos com o solo ASP (parte - 3). Valores entre parênteses indicam a eficiência de remoção (%)

tratamento	n-alcenos totais		pristano		fitano		HTR		MCNR		HTP	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	(mg.kg ⁻¹)											
13	<LD	4,1	<LD	2,4	<LD	1,3	62	35 (43,5)	722	228 (68,4)	784	263 (66,4)
14	<LD	3,5	<LD	1,9	<LD	1,1	62	38 (38,7)	722	260 (64,0)	784	297 (62,1)

LD (limite de detecção) = 4,0 mg.kg⁻¹

HTR – Hidrocarbonetos Totais Resolvidos; MCNR – Mistura Complexa não Resolvida; HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

Análises realizadas por Analytical Technology.

Tratamentos: 13 - controle (nenhum tratamento); 14 - bioaumento (inóculo comercial).

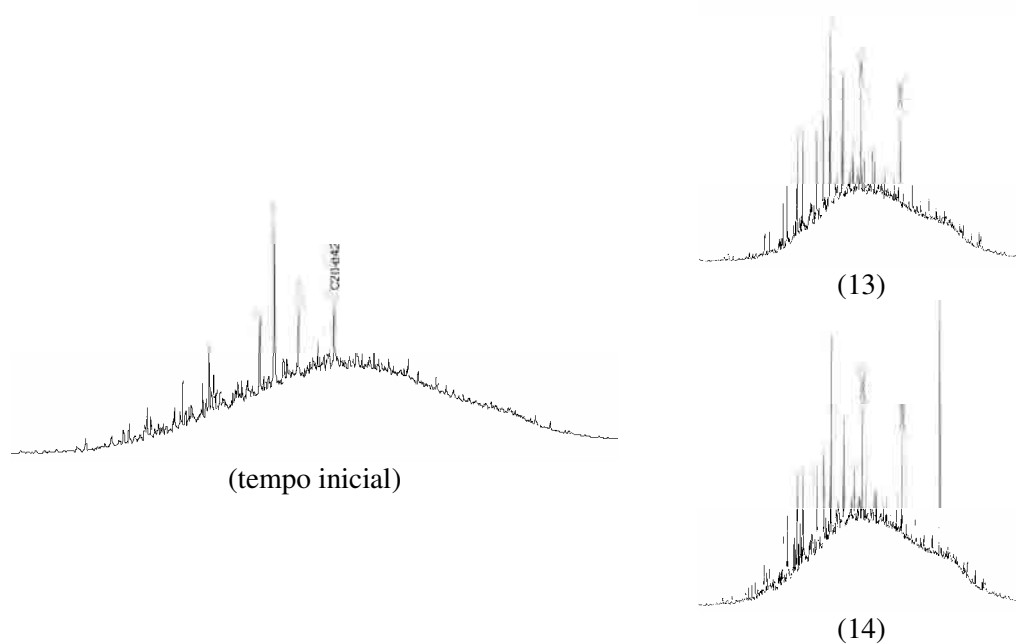


Figura 4.24 - Análise cromatográfica (HTP) no início e final dos tratamentos com o solo ASP (13 e 14). Fatores de diluição: 10x (inicial); 1x (13 e 14).

Tratamentos: 13 - controle (nenhum tratamento); 14 - bioaumento (inóculo comercial).

Tabela 4.12 - Valores de pH, nitrogênio e fósforo nos experimentos respirométricos

tratamento	solo	pH ¹		N		P	
		inicial	final	inicial	final	inicial	final
				(mg.kg ⁻¹)			
1	ASP	6,7	7,5	800	210	6	6
2	ASP	6,7	6,5	2090	1050	139	66
3	ASP	6,7	7,1	2090	1050	139	56
4	SB	5,0	4,9	700	350	3	2
5	SB	5,0	5,0	1480	1260	99	55
6	SB	5,0	5,0	1480	1260	99	48
7	RC	7,4	7,1	210	210	2	2
8	RC	7,1	7,3	210	210	2	2
9	RC	7,2	7,2	210	210	2	2
10	RC	7,3	7,3	210	210	2	2
11	RC	7,1	7,3	210	210	2	2
12	RC	7,1	7,4	210	210	2	2
13	ASP	4,6	4,5	350	350	- ²	-
14	ASP	4,6	4,5	350	350	-	-

¹ CaCl₂² não analisado

Tratamentos: (ASP – parte 1) 1 – controle (nenhum tratamento); 2 - bioestimulação (adição de N e P); 3 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumento (consórcio bacteriano). (SB – parte 1) 4 – controle (nenhum tratamento); 5 - bioestimulação (adição de N e P); 6 - bioestimulação (adição de N e P) e bioaumento (consórcio bacteriano). (RC – parte 2) 7 - controle 1 - (apenas solo); 8 – controle 2 - (contaminação sem bioaumento); 9 - bioaumento (*S. hominis* / *K. palustris*) antes de contaminação; 10 - bioaumento (*S. hominis* / *K. palustris*) depois de contaminação; 11 - bioaumento (*Ochrobactrum anthropi*) depois de contaminação; 12 - bioaumento (consórcio - R) depois de contaminação. (ASP – parte 3) 13 - controle (nenhum tratamento); 14 - bioaumento (inóculo comercial).

4.5 – Avaliação do efeito da adição da vinhaça na biorremediação de solos e águas subterrâneas

4.5.1 – Caracterização da vinhaça

A caracterização físico-química da vinhaça é apresentada na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Caracterização físico-química da vinhaça

N	%	0,22	Cd	ppm	1,06
P total (P ₂ O ₅)	ppm	65,00	Cr	ppm	0,15
K	K ₂ O %	0,32	Ni	ppm	0,26
Ca	ppm	740,00	Pb	ppm	- ^a
Mg	ppm	210,00	material orgânica	%	3,96
S	ppm	835,00	razão C/N		10,00
Fe	ppm	97,50	massa específica	g/mL	1,00
Mn	ppm	- ^a			
Cu	ppm	- ^a	pH		3,85
Zn	ppm	7,50	OD	mg/L	4,3
B	ppm	5,00	DQO	mg/L	32000
Na	ppm	113,00	Eh	mV	260
Co	ppm	- ^a	condutividade	mS	8,52
Mo	ppm	2,00			
Al	ppm	72,50			
Ba	ppm	0,54			

^a não detectado.

4.5.2 - Experimento respirométrico

As produções diárias de CO₂ no experimento respirométrico são apresentadas nas Figuras 4.25 a 4.29, onde cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas. A evolução da produção de CO₂ no tratamento 2 (Figura 4.25) mostra que a vinhaça foi quase totalmente biodegradada em 20 dias após ter sido aplicada ao solo RC (sem adição de óleo diesel). Um comportamento similar foi observado nos tratamentos com solos contaminados (Figuras 4.26 a 4.29), isto é, a produção de CO₂ nos tratamentos com vinhaça inicialmente se diferenciaram dos controles e após aproximadamente o mesmo período, a produção declina até valores próximos aos dos controles.

A contagem de bactérias heterotróficas totais nos tempos inicial e final da incubação (Figura 4.30) mostra que nos tratamentos com vinhaça a população bacteriana foi maior que os controles no tempo final. Este aumento da população microbiana causada pela vinhaça também foi verificada por Prata et al. (2001) e Crivelaro (2005) nos seus experimentos de biodegradação. Contudo, como observado por Hickman e Novak (1989), a biomassa microbiana total pode ser um fraco indicador para se determinar o potencial de biodegradação, principalmente porque a biomassa ativa pode diferir na composição de espécies e em regimes metabólicos. Certamente estes microrganismos adicionais preferencialmente biodegradaram as fontes de carbono mais assimiláveis como o glicerol presente na vinhaça (RODELLA et al., 1983; PRATA et al., 2001); caso contrário, não seria observado um acentuado decréscimo da produção de CO₂ depois do consumo da vinhaça. Além disso, em relação aos solos RC e ASP, não há praticamente nenhuma diferença de eficiência de biodegradação em termos de concentração de hidrocarbonetos entre os tratamentos com adição de vinhaça e os controles (Tabela 4.14). Os resultados com o solo SB, onde a eficiência de biodegradação foi claramente superior no controle, indicam que o consumo preferencial da vinhaça pode também atrasar o processo de biorremediação.

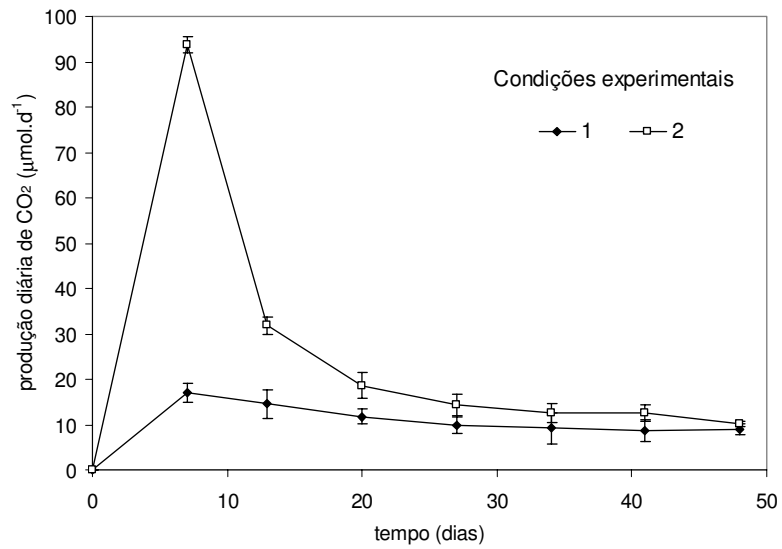


Figura 4.25 - Produção diária de CO₂ durante a incubação dos tratamentos 1 (solo RC) e 2 (solo RC + vinhaça).

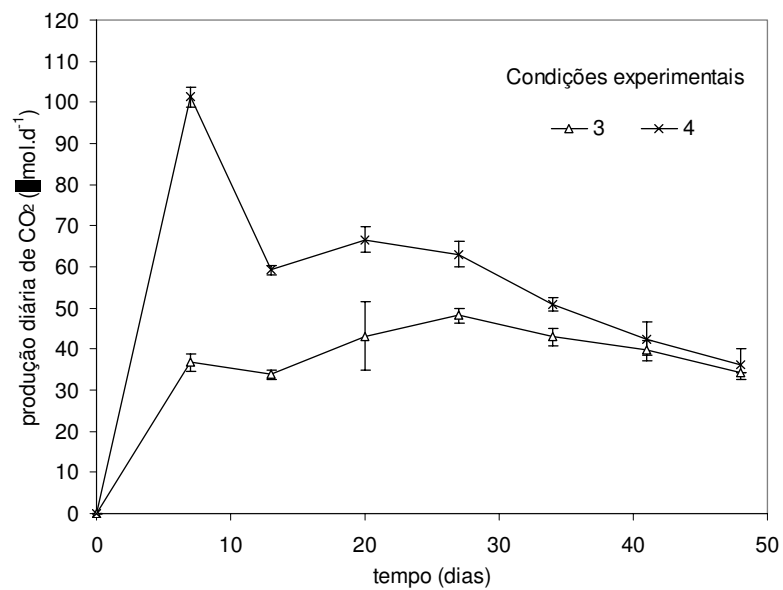


Figura 4.26 - Produção diária de CO₂ durante a incubação dos tratamentos 3 (solo RC + óleo diesel intemperizado) e 4 (solo RC + óleo diesel intemperizado + vinhaça).

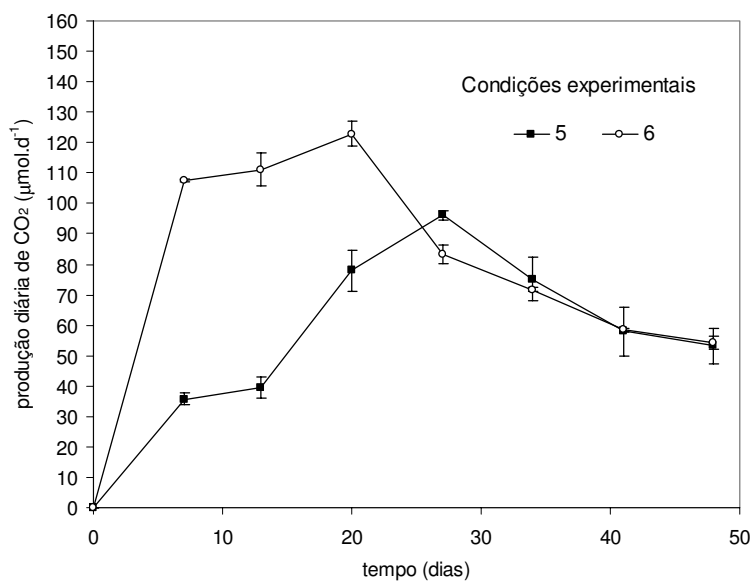


Figura 4.27 - Produção diária de CO₂ durante a incubação dos tratamentos 5 (solo RC + óleo diesel comercial) e 6 (solo RC + óleo diesel comercial + vinhaça).

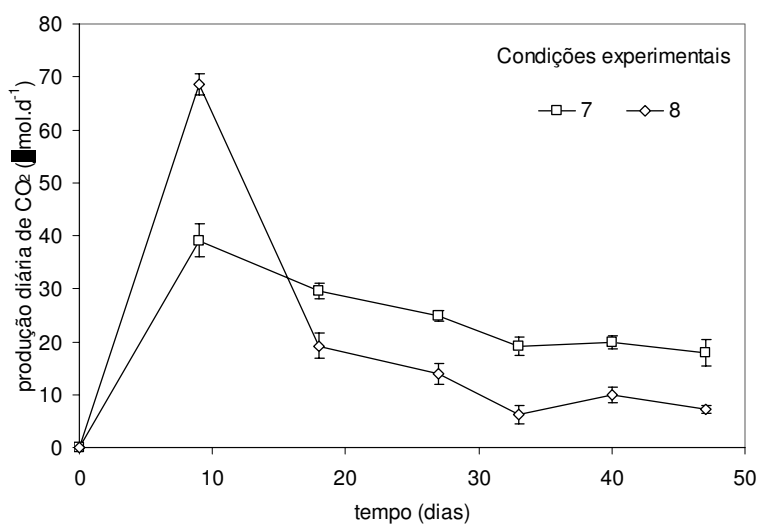


Figura 4.28 - Produção diária de CO₂ durante a incubação dos tratamentos 7 (solo ASP) e 8 (solo ASP + vinhaça).

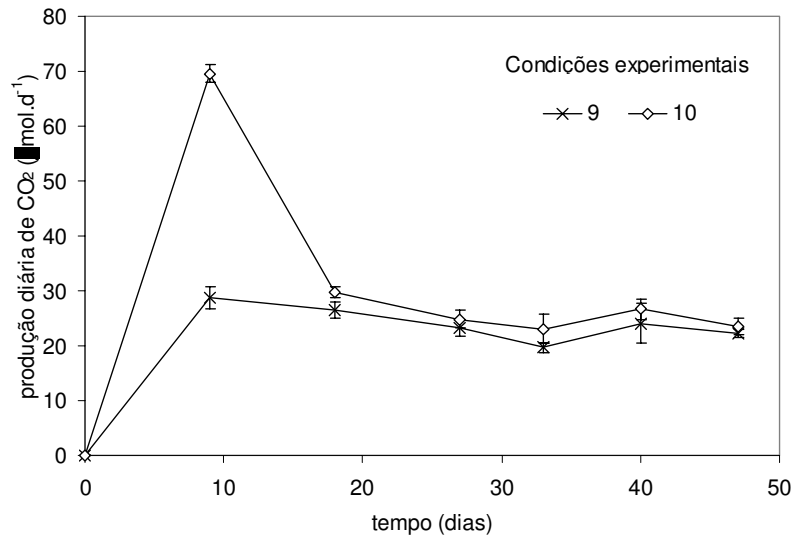


Figura 4.29 - Produção diária de CO₂ durante incubação dos tratamentos 9 (solo SB) e 10 (solo SB + vinhaça).

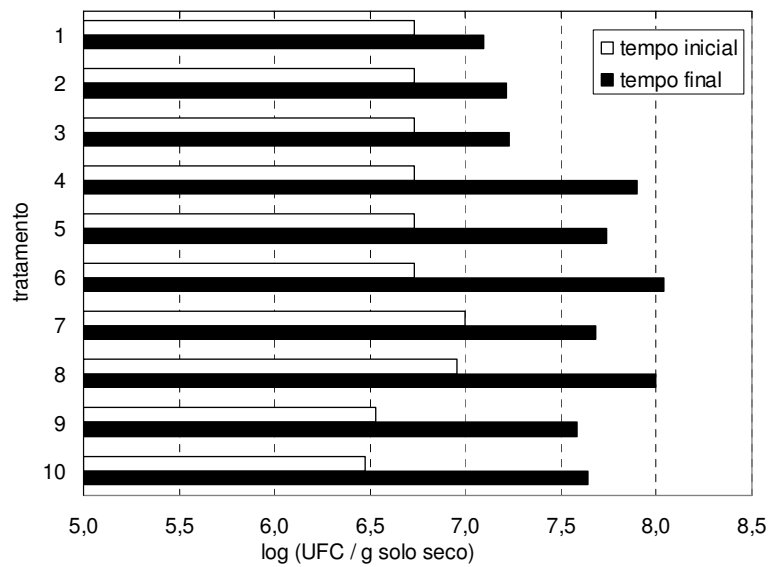


Figura 4.30 - Contagem de bactérias heterotróficas totais nos tempos inicial e final do experimento respirométrico.

Tratamentos: 1 (solo RC); 2 (solo RC + vinhaça); 3 (solo RC + óleo diesel intemperizado); 4 (solo RC + óleo diesel intemperizado + vinhaça); 5 (solo RC + óleo diesel comercial); 6 (solo RC + óleo diesel comercial + vinhaça); 7 (solo ASP); 8 (solo ASP + vinhaça); 9 (solo SB); 10 (solo SB + vinhaça).

Tabela 4.14 - Concentração de hidrocarbonetos no início (1) e final (2) dos tratamentos. Valores entre parênteses indicam a eficiência de remoção (%)

trat.	n-alcenos totais		pristano		fitano		HTR		MCNR		HTP		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
	(mg.kg ⁻¹)												
1	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	104,3	-
2	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	<LD ¹	<LD ²	59,0	67,0	35,7	38,0	711	550 (22,6)	4444	4313 (2,9)	5155	4864 (5,6)	
4	<LD ¹	<LD ²	59,0	63,0	35,7	36,0	711	546 (23,2)	4444	4326 (2,7)	5155	4872 (5,5)	
5	499,2	<LD ² (>96,3)	43,5	38,3 (11,5)	23,8	22,0 (7,6)	1231	519 (57,8)	4199	4131 (1,6)	5431	4650 (14,4)	
6	499,2	<LD ² (>96,3)	43,5	35,0 (19,5)	23,8	21,1 (11,3)	1231	502 (59,2)	4199	4160 (0,9)	5431	4663 (14,1)	
7	<LD ³	4,1	<LD ³	2,4	<LD ³	1,3	61,9	35,0 (43,5)	722	228 (68,4)	784	263,2 (66,4)	
8	<LD ³	3,4	<LD ³	2,0	<LD ³	1,1	61,9	37,4 (39,6)	722	204 (71,7)	784	241,0 (69,3)	
9	<LD ⁴	<LD ⁴	32,5	35,7	27,5	31,8	510	587	3277	1903 (41,9)	3787	2489 (34,3)	
10	<LD ⁴	<LD ⁵	32,5	<LD ⁵ (>39,7)	27,5	<LD ⁵ (>28,7)	510	349 (31,6)	3277	3183 (2,9)	3787	3532 (6,7)	

^a não analisado

LD (limite de detecção) = (1) 3,6 mg.kg⁻¹; (2) 18,5 mg.kg⁻¹; (3) 4,0 mg.kg⁻¹; (4) 2,0 mg.kg⁻¹; (5) 19,6 mg.kg⁻¹

HTR – Hidrocarbonetos Totais Resolvidos; MCNR – Mistura Complexa não Resolvida; HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

Análises realizadas por Analytical Technology

Tratamentos: 1 (solo RC); 2 (solo RC + vinhaça); 3 (solo RC + óleo diesel intemperizado); 4 (solo RC + óleo diesel intemperizado + vinhaça); 5 (solo RC + óleo diesel comercial); 6 (solo RC + óleo diesel comercial + vinhaça); 7 (solo ASP); 8 (solo ASP + vinhaça); 9 (solo SB); 10 (solo SB + vinhaça).

A Tabela 4.15 mostra os valores de pH e concentração de matéria orgânica, nitrogênio e potássio nos tempos inicial e final dos tratamentos. Comparando os tratamentos com adição de vinhaça com os controles, os valores de pH não foram praticamente alterados; a matéria orgânica e o conteúdo de nitrogênio (somente no solo RC) e potássio aumentaram com a adição da vinhaça. A concentração de potássio no solo e a capacidade de troca catiônica são parâmetros usados para calcular a dosagem de vinhaça a ser aplicada nos campos agrícolas de acordo com as especificações do órgão ambiental paulista (CETESB, 2005b), uma vez que este resíduo apresenta alta concentração desse elemento.

Tabela 4.15 - Valores de pH, e conteúdo de nitrogênio e potássio no experimento respirométrico

tratamento	pH ¹		matéria orgânica		N		K	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final
			(mg.kg ⁻¹)		(mg.kg ⁻¹)		(mmolc/dm ³)	
2	7,1	6,9	6,0	5,0	210	210	3,9	3,9
3	7,2	7,2	8,0	8,0	210	350	1,3	1,4
4	7,2	7,0	10,0	8,0	280	280	4,0	3,7
5	7,1	6,7	8,0	8,0	210	350	1,3	1,2
6	7,3	7,0	8,0	8,0	280	280	3,9	3,8
7	4,6	4,5	15,0	13,0	350	420	1,3	1,5
8	4,7	4,5	18,0	17,0	350	420	3,5	3,8
9	4,7	4,7	18,0	22,0	350	280	1,4	1,7
10	4,8	4,9	20,0	18,0	350	280	3,7	3,8

¹CaCl₂

Tratamentos: 2 (solo RC + vinhaça); 3 (solo RC + óleo diesel intemperizado); 4 (solo RC + óleo diesel intemperizado + vinhaça); 5 (solo RC + óleo diesel comercial); 6 (solo RC + óleo diesel comercial + vinhaça); 7 (solo ASP); 8 (solo ASP + vinhaça); 9 (solo SB); 10 (solo SB + vinhaça).

4.5.3 - Experimento com a água subterrânea

A Tabela 4.16 mostra os parâmetros físico-químicos medidos durante a incubação dos frascos de DBO. Em geral, os tratamentos com adição de nutrientes tiveram comportamento similar ao dos controles, exceto o oxigênio dissolvido que foi mais consumido nos primeiros, indicando uma intensificação das taxas de biodegradação. É possível observar que com a adição de vinhaça, surgiram uma série de fatores inibitórios à eficiência de biodegradação: valores de pH abaixo de 5 (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996); os tratamentos rapidamente alcançaram condições anaeróbias (indicado pelo quase total consumo do oxigênio dissolvido e pelos valores negativos de potencial redox) devido à grande quantidade de matéria orgânica presente na vinhaça, o que causou grande aumento na demanda química de oxigênio (DQO); aumento de condutividade relacionado à alta concentração de sais dissolvidos na vinhaça, principalmente o potássio. A vinhaça também foi responsável pelo aumento na concentração de nitrato acima do limite (10 mg.L⁻¹) determinado pela legislação em relação às águas potáveis para consumo público (Portaria n.518/2004 MS).

Em termos de concentração dos hidrocarbonetos BTEX (Tabela 4.17), as concentrações remanescentes principalmente dos xilenos, os mais recalcitrantes (Kaplan et al., 1997), mostram que os tratamentos com vinhaça tiveram os piores desempenhos. As concentrações dos hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) estão listadas na Tabela 4.18. Como a maioria destes valores está abaixo do limite de detecção, não é possível identificar qualquer influência dos tratamentos na biodegradação desses hidrocarbonetos.

Tabela 4.16 - Experimento com a água subterrânea – condição não aerada

	tratamento		tempo (dias)			
			0	5	10	20
pH	ASP	1	7,4	7,1	6,9	6,3
		2	7,4	7,3	7,2	6,6
		3	5,8	5,0	4,0	4,4
	SB	4	6,7	6,5	6,3	5,5
		5	6,7	6,6	6,5	6,0
		6	3,9	4,1	4,6	4,6
Eh (mV)	ASP	1	230	158	52	61
		2	234	169	50	62
		3	254	-18	65	-58
	SB	4	229	216	92	204
		5	231	208	76	184
		6	270	-396	-408	-98
cond. (mS.cm⁻¹)	ASP	1	0,440	0,490	0,500	0,530
		2	0,480	0,520	0,540	0,570
		3	1,02	1,17	1,23	1,25
	SB	4	0,250	0,260	0,290	0,300
		5	0,290	0,310	0,320	0,340
		6	0,870	0,970	0,970	1,04
DQO (mg.L⁻¹)	ASP	1	41,5	41,9	24,1	24,5
		2	41,5	41,9	20,4	22,4
		3	1699	1714	1111	816
	SB	4	37,8	36,2	13,0	14,3
		5	35,9	30,5	11,1	14,3
		6	1888	1904	926	612,2
OD (mg.L⁻¹)	ASP	1	8,6	7,1	4,2	1,4
		2	8,5	4,9	2,0	0,5
		3	7,9	0,8	0,8	0,5
	SB	4	8,6	7,6	5,6	5,4
		5	8,4	6,9	3,9	1,1
		6	8,3	1,0	0,7	0,8
NO₃⁻ (mg.L⁻¹)	ASP	1	3,52	<LD	0,88	- ^a
		2	<LD	<LD	1,32	-
		3	19,8	17,2	52,8	-
	SB	4	3,52	0,88	1,32	-
		5	0,44	<LD	0,88	-
		6	20,2	4,4	39,6	-
K (mg.L⁻¹)	ASP	1	16,1	16,7	17,0	15,8
		2	17,0	17,5	17,3	16,2
		3	372	371	370	370
	SB	4	4,49	4,10	4,66	4,09
		5	5,32	5,54	5,20	5,18
		6	361	360	361	359

^a não analisado

LD (limite de detecção) = 0,04 mg.L⁻¹

Tratamentos: (ASP) 1 - água subterrânea (controle); 2 - água subterrânea + nutrientes; 3 - água subterrânea + vinhaça; (SB) 4 - água subterrânea (controle); 5 - água subterrânea + nutrientes; 6 - água subterrânea + vinhaça.

Tabela 4.17 - Experimento com a água subterrânea – condição não aerada – concentração de BTEX ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

		tempo (dias)				
		0	5	10	20	
ASP	1	B	105,23	<LD	<LD	<LD
		T	<LD	9,07	<LD	<LD
		E	231,35	110,18	<LD	<LD
		X	290,38	493,04	396,65	<LD
	2	B	105,23	<LD	400,69	<LD
		T	<LD	<LD	<LD	<LD
		E	231,35	452,7	<LD	<LD
		X	290,38	166,67	254,63	<LD
	3	B	105,23	<LD	<LD	9,081
		T	<LD	<LD	<LD	1,08
		E	231,35	449,59	1775,73	0,06
		X	290,38	730,65	2545,67	98,12
SB	4	B	<LD	<LD	<LD	60,33
		T	<LD	<LD	<LD	1,09
		E	<LD	<LD	<LD	<LD
		X	<LD	149,57	<LD	1,23
	5	B	<LD	<LD	<LD	1,04
		T	<LD	<LD	<LD	<LD
		E	<LD	<LD	<LD	<LD
		X	<LD	<LD	<LD	<LD
	6	B	<LD	658,24	731,22	3,12
		T	<LD	<LD	<LD	0,092
		E	<LD	<LD	694,49	<LD
		X	<LD	1610,85	1163,25	134,02

B-benzeno; T-tolueno; E-etilbenzeno; X-xilenos

LD (limite de detecção) = $0,004 \mu\text{g.L}^{-1}$

Tratamentos: (ASP) 1 - água subterrânea (controle); 2 - água subterrânea + nutrientes; 3 - água subterrânea + vinhaça; (SB) 4 - água subterrânea (controle); 5 - água subterrânea + nutrientes; 6 - água subterrânea + vinhaça.

Tabela 4.18 - Experimento com a água subterrânea – condição não aerada – concentração de HPA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

	ASP				SB							
	1		2		3		4		5		6	
	tempo (dias)											
	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20
Naftaleno	<LD	0,12	<LD	1,04	<LD	0,03	<LD	<LD	<LD	1,66	<LD	2,07
Acenaftileno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,19	<LD	<LD
Fluoreno	<LD	<LD	<LD	0,74	<LD	0,94	<LD	2,09	<LD	0,06	<LD	0,13
Antraceno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Pireno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[a]antraceno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Criseno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[k]fluoranteno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[a]pireno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Dibenz[a,h]antraceno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,01	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[g,h,i]perileno	<LD	<LD	<LD	0,07	<LD	1,14	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,23
Indeno(1,2,3)pireno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Fenantreno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Fluoranteno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[b]fluoranteno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

LD (limite de detecção) = $0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$

Tratamentos: (ASP) 1 - água subterrânea (controle); 2 - água subterrânea + nutrientes; 3 - água subterrânea + vinhaça; (SB) 4 - água subterrânea (controle); 5 - água subterrânea + nutrientes; 6 - água subterrânea + vinhaça.

Os resultados anteriores mostraram que a alta concentração de matéria orgânica na vinhaça causou um rápido consumo do oxigênio dissolvido na água subterrânea. Assim, objetivando superar essa deficiência do processo, a segunda parte dos experimentos com a água subterrânea foi baseada num sistema aerado. Os resultados obtidos com os biorreatores aerados são mostrados nas Tabelas 4.19 a 4.21. Tratamentos com adição de vinhaça tiveram o melhor desempenho em termos de diminuição da demanda química de oxigênio (DQO) (Tabela 4.19), no entanto, os valores finais ainda são bastante altos (até 40 vezes em relação aos controles), indicando que, mesmo em 20 dias, a vinhaça não foi totalmente biodegradada. Assim como no experimento com frascos DBO, a adição de vinhaça teve um efeito negativo na biodegradação dos hidrocarbonetos, como sugere as concentrações de benzeno (ASP) e xilenos (ASP e SB) (Tabela 4.20). Nenhuma influência da vinhaça na concentração dos hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) (Tabela 4.21) pôde ser identificada, uma vez que a maioria destes valores está abaixo do limite de detecção.

Tabela 4.19 - Experimento com a água subterrânea – condição aerada

	tratamento		tempo (dias)		redução
			0	20	%
DQO (mg.L ⁻¹)	ASP	1	41,5	16,3	60,7
		2	1699	408,2	76,0
	SB	3	37,8	12,2	67,7
		4	1888	510,2	73,0

Tratamentos: (ASP) 1 - água subterrânea (controle); 2 - água subterrânea + vinhaça; (SB) 3 - água subterrânea (controle); 4 - água subterrânea + vinhaça.

Tabela 4.20 - Experimento com a água subterrânea – condição aerada – concentração de BTEX (µg.L⁻¹)

		tempo (dias)				
		0	5	10	20	
ASP	1	B	105,23	<LD	<LD	<LD
		T	<LD	<LD	<LD	<LD
		E	231,35	78,44	<LD	<LD
		X	290,38	111,32	996,13	3,35
	2	B	105,23	<LD	1167,78	276,02
		T	<LD	<LD	<LD	0,08
		E	231,35	75,76	<LD	<LD
		X	290,38	97,79	<LD	111,87
SB	3	B	<LD	<LD	<LD	0,07
		T	<LD	<LD	<LD	<LD
		E	<LD	<LD	<LD	3,02
		X	<LD	<LD	<LD	10,34
	4	B	<LD	<LD	<LD	0,21
		T	<LD	<LD	<LD	<LD
		E	<LD	922,53	<LD	1,32
		X	<LD	<LD	1051,65	123,09

B-benzeno; T-tolueno; E-etilbenzeno; X-xilenos

LD (limite de detecção) = 0,004 µg.L⁻¹

Tratamentos: (ASP) 1 - água subterrânea (controle); 2 - água subterrânea + vinhaça; (SB) 3 - água subterrânea (controle); 4 - água subterrânea + vinhaça.

Tabela 4.21 - Experimento com a água subterrânea – biorreatores aerados – concentração de HPA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

	ASP				SB			
	1		2		3		4	
	tempo (dias)							
	0	20	0	20	0	20	0	20
Naftaleno	<LD	0,08	<LD	2,02	<LD	2,1	<LD	0,17
Acenaftileno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Fluoreno	<LD	0,14	<LD	1,17	<LD	0,02	<LD	<LD
Antraceno	<LD	0,72	<LD	1,09	<LD	0,04	<LD	0,12
Pireno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,01	<LD	<LD
Benzo[a]antraceno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Criseno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[k]fluoranteno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[a]pireno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,01	<LD	<LD
Dibenz[a,h]antraceno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[g,h,i]perileno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Indeno(1,2,3)pireno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Fenantreno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,43	<LD	<LD
Fluoranteno	<LD	<LD	<LD	0,16	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[b]fluoranteno	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

LD (limite de detecção) = $0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$

Tratamentos: (ASP) 1 - água subterrânea (controle); 2 - água subterrânea + vinhaça; (SB) 3 - água subterrânea (controle); 4 - água subterrânea + vinhaça.

4.6 – Comparação da biodegradabilidade de óleo diesel comercial e intemperizado

4.6.1 - Composição dos óleos diesel

O óleo diesel foi coletado de uma espessa camada acima da água subterrânea, onde se encontrava devido a um vazamento que ocorrera há aproximadamente dez anos. De acordo com Kaplan (1997), nesta situação onde há uma espessa camada de produto em fase livre, a taxa de alteração do óleo é lenta porque os processos responsáveis por esses fenômenos somente ocorrem nas interfaces combustível/água e combustível/ar. A biodegradação na região interna do produto é extremamente lenta devido à limitação de oxigênio, água e nutrientes. Assim, o combustível pode permanecer relativamente inalterado por um longo período de tempo, como décadas. As alterações mais prováveis a acontecer nesta situação são a evaporação dos hidrocarbonetos mais voláteis e a dissolução dos componentes mais solúveis. Apesar dessas considerações, as análises mostram que o óleo diesel no posto ASP teve algumas de suas características alteradas, e provavelmente devido a processos biológicos e físico-químicos.

O óleo diesel intemperizado tem uma coloração verde escura e um odor diferente em relação ao óleo diesel comercial. A mudança de cor é resultado da deterioração dos corantes presentes no combustível (KAPLAN, 1997). A Tabela 4.22 mostra que o óleo diesel

comercial tem concentração maior de BTEX. A comparação dos cromatogramas encontra-se na Figura 4.31. Isto reflete principalmente o efeito da exposição do óleo diesel a um ambiente aquoso e volatilização. No poço de monitoramento onde o óleo foi coletado, a água subterrânea apresentou as seguintes concentrações de BTEX: 112,1; 98,5; 115,7 e 865,8 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

As concentrações dos HPA estão listadas na Tabela 4.23. Estas moléculas recalcitrantes são lentamente degradadas, e na medida que os outros processos de alteração dos demais hidrocarbonetos avançam mais rapidamente, o óleo diesel torna-se enriquecido com a fração dos HPA. Assim, o óleo intemperizado mostrou um significativo aumento da concentração de HPA. A Figura 4.32 mostra os cromatogramas comparativos.

Analisando a concentração dos HTP (Tabela 4.24), o óleo intemperizado não apresenta n-alcenos detectáveis e tem uma alta abundância dos recalcitrantes pristano e fitano, o que está de acordo com o processo de intemperização. Além disso, as frações HTR e MCNR, respectivamente, são menor e maior no óleo intemperizado, o que é outro indicativo de biodegradação. Nos cromatogramas (Figura 4.33), é possível observar que a “lombada” característica da MCNR torna-se maior e os picos dos HTR diminuem no óleo intemperizado.

Tabela 4.22 – Concentração de BTEX nos óleos diesel

	comercial	intemperizado
	$\mu\text{g.Kg}^{-1}$	
Benzeno	<LD	<LD
Tolueno	84,90	<LD
Etilbenzeno	171,71	69,78
m,p-Xilenos	565,24	112,86
o-Xileno	321,41	14,52
Total	1143,26	197,16

LD (limite de detecção) = 1,58 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$

Análises realizadas por Analytical Technology

Tabela 4.23 – Concentração de HPA nos óleos diesel

	comercial	intemperizado
	$\mu\text{g.Kg}^{-1}$	
Naftaleno	578,31	4276,21
Acenaftileno	<LD ⁽¹⁾	<LD ⁽²⁾
Acenaftiteno	257,32	822,63
Fluoreno	534,84	1221,17
Fenantreno	257,65	2024,41
Antraceno	13,88	<LD
Fluoranteno	<LD	<LD
Pireno	<LD	<LD
Benzo(a)antraceno	<LD	<LD
Criseno	<LD	<LD
Benzo[b]fluoranteno	<LD	<LD
Benzo[k] fluoranteno	<LD	<LD
Benzo[a]pireno	<LD	<LD
Indeno(1,2,3-cd)pireno	<LD	<LD
Dibenz[a,h]antraceno	<LD	<LD
Benzo[g,h,i]perileno	<LD	<LD
Total	1641,99	8344,42

LD (limite de detecção) = (1) 3,16 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$; (2) 31,9 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$

Análises realizadas por Analytical Technology

Tabela 4.24 – Concentração de HTP nos óleos diesel

	comercial	intemperizado
	$\mu\text{g.Kg}^{-1}$	
C10	<LD	<LD
C11	<LD	<LD
C12	<LD	<LD
C13	21703,5	<LD
C14	21654,5	<LD
C15	29535,3	<LD
C16	25213,5	<LD
C17	20737,7	<LD
pristano	26837,2	37916,4
C18	<LD	<LD
fitano	<LD	18833,5
C19	<LD	<LD
C20	<LD	<LD
C21	<LD	<LD
C22	<LD	<LD
C23	<LD	<LD
C24	<LD	<LD
C25	<LD	<LD
C26	<LD	<LD
C27	<LD	<LD
C28	<LD	<LD
C29	<LD	<LD
C30	<LD	<LD
C31	<LD	<LD
C32	<LD	<LD
C33	<LD	<LD
C34	<LD	<LD
C35	<LD	<LD
C36	<LD	<LD

Tabela 4.24 – Concentração de HTP nos óleos diesel (cont.)

HTR	592987,1	424207,6
MCNR	2601550,3	2900513,6
Total (HTP)	3194537,4	3324721,2

LD (limite de detecção) = 17712,8 µg/Kg.

HTR - Hidrocarbonetos Totais Resolvidos; MCNR – Mistura Complexa não Resolvida;

HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

Análises realizadas por Analytical Technology

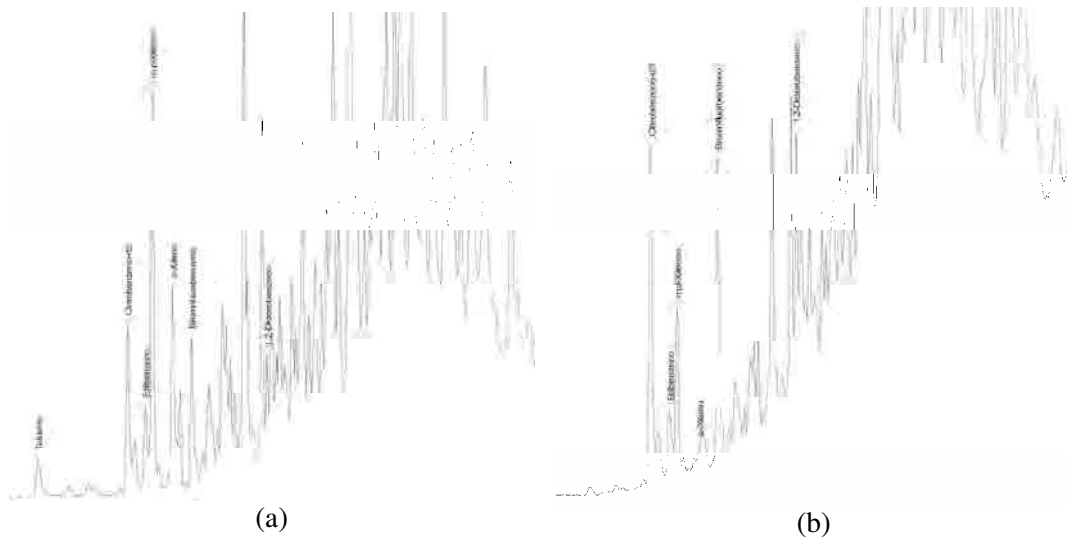


Figura 4.31 - Análise cromatográfica (BTEX) dos óleos diesel (a) comercial e (b) intemperizado. Fator de diluição: 1x.

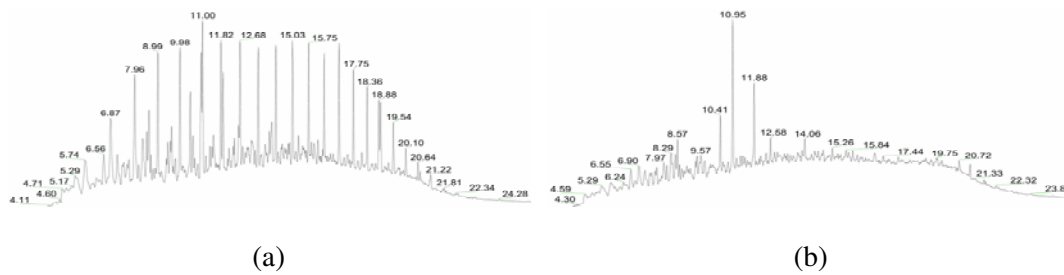


Figura 4.32 - Análise cromatográfica (HPA) dos óleos diesel (a) comercial e (b) intemperizado. Fator de diluição: respectivamente: 1x e 10x.

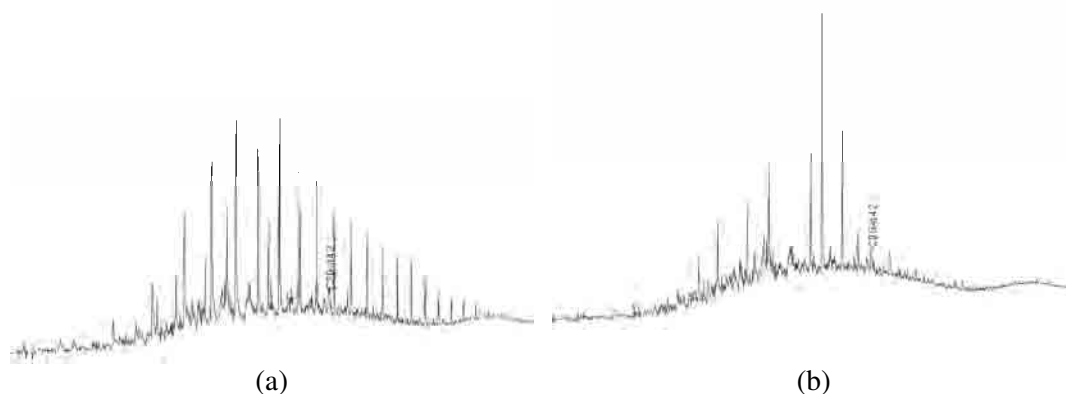


Figura 4.33 - Análise cromatográfica (HTP) dos óleos diesel (a) comercial e (b) intemperizado. Fator de diluição: 50x.

4.6.2 - Teste de biodegradabilidade: indicador redox DCPIP

Os resultados obtidos com o teste de biodegradabilidade usando o indicador redox DCPIP estão listados nas Tabelas 4.25 e 4.26, que expressam os testes realizados em tubos de ensaio e em frascos erlenmeyers, respectivamente.

Inicialmente, como nos tubos de ensaio os inóculos foram adicionados em concentrações iguais, a habilidade relativa das diferentes culturas pode ser avaliada dependendo do tempo despendido para a descoloração do meio de cultivo (HANSON et al., 1993). Assim, todas as culturas tiveram capacidade similar para biodegradar o óleo diesel comercial, mas somente o consórcio R, oriundo da água residuária da refinaria Replan, degradou o óleo intemperizado (Tabela 4.25). Mesmo culturas nativas (*S. hominis* e *K. palustris*) e os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, conhecidos por serem degradadores de hidrocarbonetos (BALBA et al., 1998), não foram capazes de biodegradar o óleo intemperizado. Nenhum estudo relacionando as culturas *S. hominis* e *K. palustris* à biodegradação de hidrocarbonetos foi encontrado. No entanto, Gomes et al. (2004) descrevem a produção de biossurfactante por uma linhagem de *S. aureus*. As outras culturas vêm demonstrando serem capazes de degradar hidrocarbonetos. *P. aeruginosa* é um reconhecido produtor do biossurfactante raminolipídio (MAIER e SOBERON-CHAVEZ, 2000). A linhagem *P. aeruginosa* LBI foi capaz de produzir biossurfactante utilizando a borra resultante do refino da soja (*soapstock*) (MORAES et al., 2002), manitol e glicerol (SILVA, 2005) e querosene, óleo diesel comercial, petróleo e borra oleosa (PIRÔLLO, 2006). A mesma cultura *O. anthropi* melhorou a biodegradação de borra oleosa e foi capaz de biodegradar hexano, heptano, hexadecano e óleo diesel comercial (KATAOKA, 2001).

Tabela 4.25 – Teste de biodegradabilidade (DCPIP) em tubos de ensaio

cultura	descoloração	
	comercial	intemperizado
(1) <i>O. anthropi</i>	sim (após 3 dias)	não
(2) <i>B. cereus</i>	sim (após 3 dias)	não
(3) <i>S. hominis</i>	sim (após 3 dias)	não
(4) <i>K. palustris</i>	sim (após 3 dias)	não
(5) consórcio R	sim (após 4 dias)	sim (após 15 dias)
(6) <i>P. aeruginosa</i> LBI	sim (após 3 dias)	não
(1) + (2)	sim (após 3 dias)	não
(3) + (4)	sim (após 3 dias)	não
(1) + (2) + (3) + (4)	sim (após 3 dias)	não

Obs: durante os 18 dias de teste, não foi observado descoloração do controle do substrato (sem inóculo) ou do controle do inóculo (sem óleo diesel).

Nos testes realizados em frascos erlenmeyer (Tabela 4.26) (Figura 4.34), novamente *P. aeruginosa* LBI não demonstrou habilidade para degradar o óleo intemperizado. Todos os consórcios conseguiram degradar ambos os óleos diesel, exceto o inóculo comercial EM. Como mencionado anteriormente, EM nunca havia sido testado em hidrocarbonetos. Neste experimento, este inóculo foi capaz de biodegradar somente o óleo comercial, assim como os outros microrganismos com reconhecida habilidade de biodegradação desses compostos. A Figura 4.34 mostra o resultado do teste com a *P. aeruginosa* LBI (óleo diesel comercial); a coloração verde do frasco 2 é característica dessa espécie de bactéria.

Os testes realizados com os microrganismos nativos (ASP-S, SB-S, RC-S, ASP-AS e SB-AS) indicam que nos solos ou águas subterrâneas contaminados já se encontra uma microbiota adaptada para degradar hidrocarbonetos recalcitrantes. Além disso, o resultado obtido com o consórcio U mostra, como em outros trabalhos (VENKATESWARAN e HARAYAMA, 1995; RON e ROSENBERG, 2002 *apud* LEE et al., 2006), que microrganismos hidrocarbonoclasticos sempre estão presentes em solos, mesmos aqueles não poluídos.

O melhor desempenho dos consórcios demonstra a importância de se considerar o papel do co-metabolismo no tratamento de poluentes recalcitrantes como o óleo diesel

intemperizado, onde cada espécie tem uma função específica nas seqüências de reações enzimáticas responsáveis pela quebra de cadeias complexas de hidrocarbonetos.

Tabela 4.26 – Teste de biodegradabilidade (DCPIP) em frascos erlenmeyer

cultura	descoloração	
	comercial	intemperizado
<i>P. aeruginosa</i> LBI	sim (após 3 dias)	não
EM	sim (após 13 dias)	não
L	sim (após 5 dias)	sim (após 5 dias)
ASP-S	sim (após 3 dias)	sim (após 9 dias)
SB-S	sim (após 6 dias)	sim (após 6 dias)
RC-S	sim (após 2 dias)	sim (após 2 dias)
U	sim (após 2 dias)	sim (após 4 dias)
ASP-AS	sim (após 1 dia)	sim (após <1 dia)
SB-AS	sim (após 3 dias)	sim (após 3 dias)

Obs: não foi observado descoloração do controle do substrato (sem inóculo) ou do controle do inóculo (sem óleo diesel).

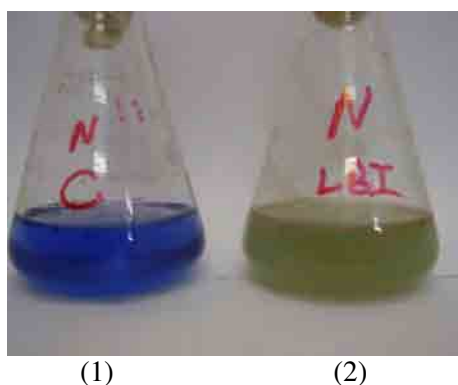


Figura 4.34 - Descoloração do indicador redox DCPIP durante teste de biodegradabilidade do óleo diesel comercial pela bactéria *P. aeruginosa* LBI (frasco 2). Frasco 1: controle do substrato (sem inóculo).

4.6.3 - Experimento respirométrico

A produção diária de CO₂ no experimento 1 e seu valor acumulado estão representados, respectivamente, nas Figuras 4.35 e 4.36. Estes resultados mostram que até aproximadamente o 10º dia as taxas de biodegradação foram bastante similares, mas após este

período, a velocidade de consumo do óleo comercial aumenta até o 27º dia (valor máximo), enquanto que a taxa em relação ao óleo intemperizado mantem-se quase constante. Certamente os hidrocarbonetos mais facilmente assimiláveis, em maior quantidade no óleo comercial, foram responsáveis por essa diferença.

Os resultados do experimento 2, que foi realizado nas mesmas condições mas por um período mais longo, foram colocados nos mesmos gráficos contendo os resultados do experimento 1 (Figuras 4.37 e 4.38). Esta comparação confirma que, após 70 dias, as taxas tornam-se iguais, indicando o consumo dos hidrocarbonetos mais facilmente assimiláveis presentes no óleo comercial durante esse período. Além disso, a similaridade entre as curvas mostra que o experimento respirométrico tem uma boa reprodutibilidade.

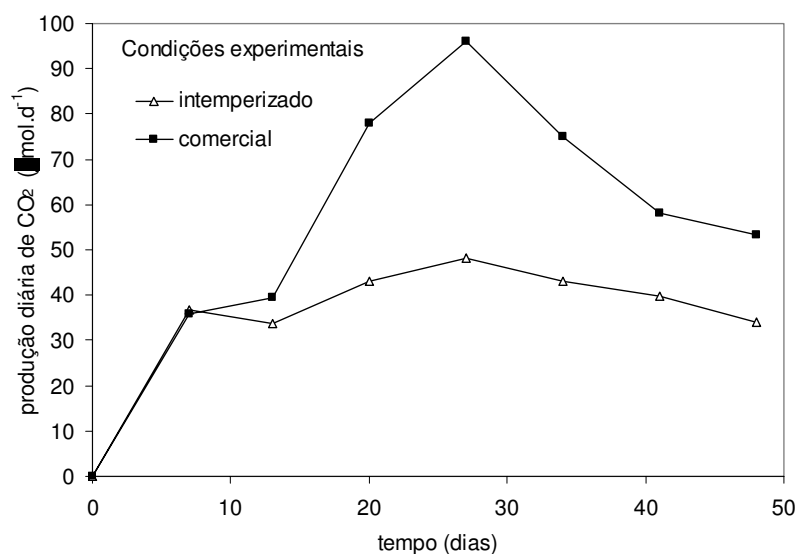


Figura 4.35 - Produção diária de CO₂ durante a incubação (experimento 1).

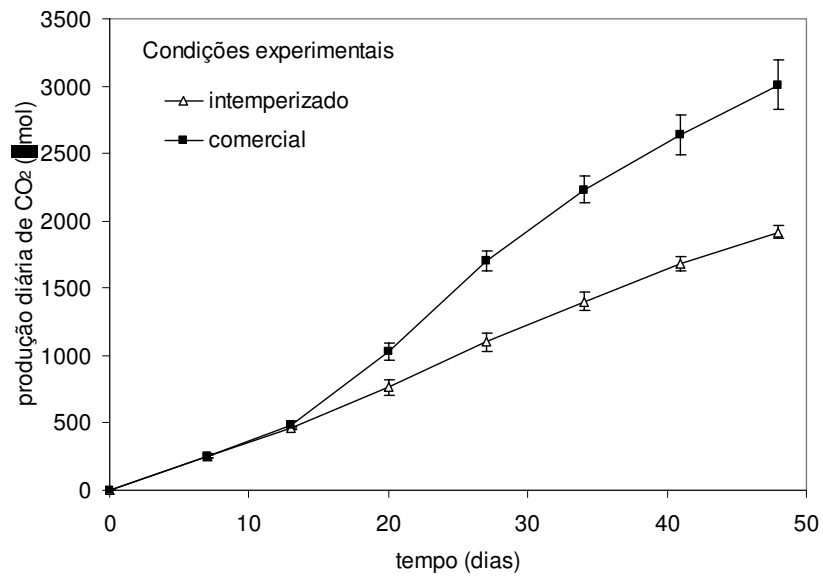


Figura 4.36 - Produção acumulada de CO₂ (experimento 1) durante a incubação. Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.

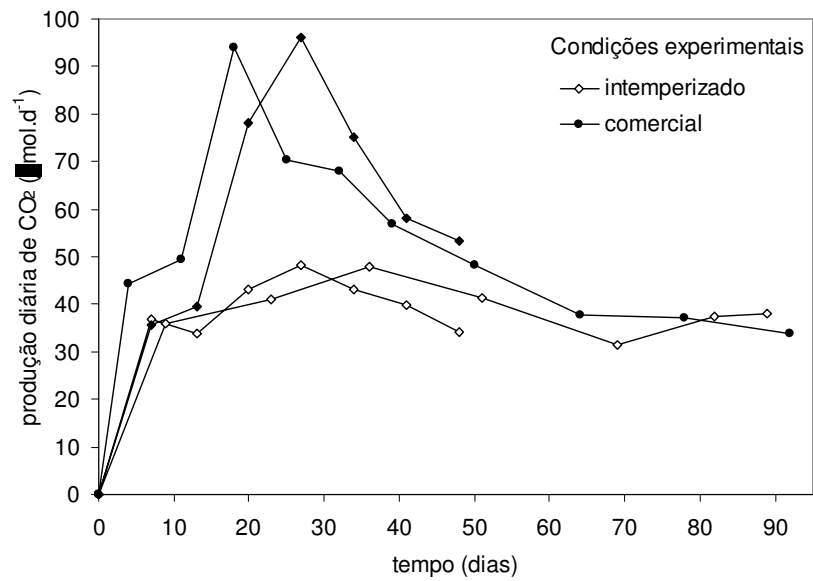


Figura 4.37 - Produção diária de CO₂ durante a incubação: 48 dias (experimento 1) e 92 dias (experimento 2).

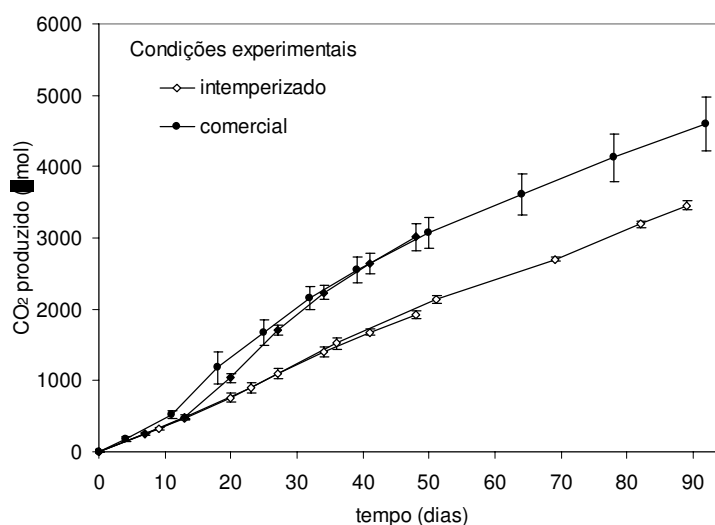


Figura 4.38 - Produção acumulada de CO₂ nos experimentos 1 (48 dias) e 2 (92 dias) durante a incubação. Cada barra de erro representa um desvio padrão de três réplicas.

As concentrações de hidrocarbonetos no começo e final do experimento respirométrico 1 são listadas na Tabela 4.27. Estes valores estão de acordo com os resultados respirométricos. As eficiências de biodegradação em relação aos hidrocarbonetos não recalcitrantes (n-alcanos totais e a fração HTR) são claramente maiores no óleo comercial, o que explica o aumento da taxa de produção de CO₂; as concentrações das frações principais (HTR e MCNR) são similares no final do experimento, confirmando a tendência de equalização das taxas de produção de CO₂. A Figura 4.39 mostra que a população de bactérias heterotróficas totais foi favorecida pela relativa maior abundância de hidrocarbonetos não recalcitrantes no óleo diesel comercial.

Embora os microrganismos nativos do solo RC (consórcio RC-S) fossem capazes de biodegradar ambos os óleos diesel, como demonstrado no teste do indicador redox, numa condição de contaminação simulada (experimento respirométrico), a eficiência de biodegradação dos HTP foi aproximadamente 2,5 vezes maior quando o óleo comercial foi utilizado; essa diferença pode ser significativa na estimativa de tempo necessário para a limpeza de uma área contaminada antiga.

Tabela 4.27 - Concentração de hidrocarbonetos no início (1) e final (2) do experimento respirométrico 1. Valores entre parênteses indicam a eficiência de remoção (%)

óleo diesel	n-alcenos totais		pristano		fitano		HTR		MCNR		HTP	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	(mg.kg ⁻¹)											
comercial	499	< LD ¹ (>96,3)	43,5	38,3 (12,0)	23,8	22,0 (7,6)	1231	519 (57,8)	4199	4131 (1,6)	5431	4650 (14,4)
intemp.	< LD ²	< LD ¹	58,9	67,0 (-13,8)	35,7	38,0 (-6,4)	711	550 (22,6)	4444	4313 (2,9)	5155	4864 (5,6)

LD (limite de detecção) = (1) 18,5 mg.kg⁻¹; (2) 3,6 mg.kg⁻¹

HTR – Hidrocarbonetos Totais Resolvidos; MCNR – Mistura Complexa não Resolvida; HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

Análises realizadas por Analytical Technology

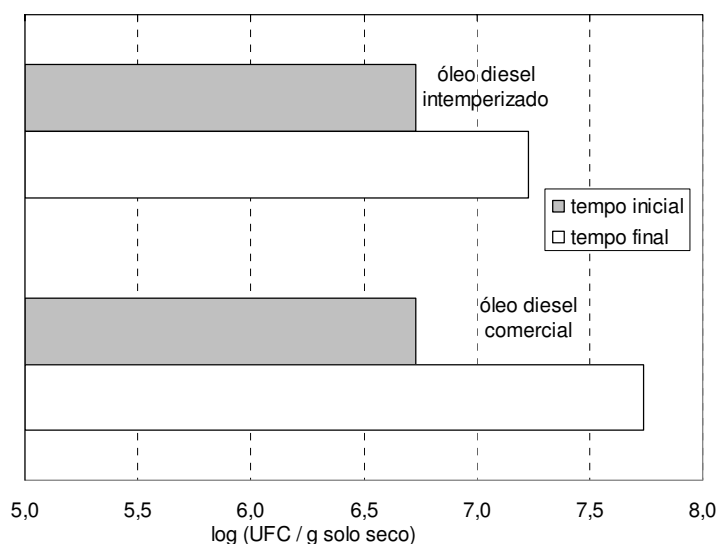


Figura 4.39 - Contagem de bactérias heterotróficas totais nos tempos inicial e final do experimento respirométrico 1.

4.7 – Produção de biossurfactante utilizando-se óleo diesel intemperizado

A Tabela 4.28 mostra os resultados das medidas de tensão superficial dos meios de cultivo sem inóculo (tensão superficial inicial) e após o período de incubação (tensão superficial final) de acordo com as condições experimentais descritas na Tabela 3.9. Foi avaliada a influência do meio de cultura (Robert ou BH) e da fonte de carbono (diesel intemperizado (D-I) ou comercial (D-C)) em diferentes concentrações, na produção de biossurfactante. A irradiação de ultrassom em alguns experimentos foi realizada objetivando verificar um possível armazenamento de biossurfactante na parede celular das culturas *S. hominis* e *K. palustris*.

Os resultados demonstram que em todos os experimentos, nenhuma diminuição significativa na tensão superficial foi verificada. De acordo com Haba et al. (2000), são considerados bons produtores de biossurfactante aqueles que reduzem a tensão superficial a 40 mN.m^{-1} ou menos. Assim, nenhuma produção de biossurfactante foi obtida nos experimentos.

Tabela 4.28 – Medidas de tensão superficial

experimento	tensão superficial	
	inicial	final
	(mN.m ⁻¹)	
1	53,0	62,0
2	52,4	51,2
3	52,4	53,3
4	54,0	53,0
5	52,0	51,5
6	50,0	55,5
7	51,5	56,0
8	51,5	57,0
9	50,0	55,5
10	50,0	59,9
11	53,0	52,5
12	52,4	49,1
13	52,4	51,2
14	54,0	53,0
15	52,0	51,0
16	50,0	57,0
17	51,5	53,5
18	51,5	57,5
19	50,0	49,0
20	50,0	57,0
21	52,0	48,5
22	61,0	58,0
23	52,5	45,0

Testes de emulsificação nos experimentos 1; 4; 5; 11; 14 e 15 demonstraram que nenhum bioemulsificador foi produzido pelas culturas *S. hominis* e *K. palustris*, uma vez que o parâmetro E24 (Equação 3.4) para ambos os óleos diesel e querosene foi igual a zero. O biossurfactante raminolipídio produzido pela linhagem *P. aeruginosa* LBI utilizando-se óleo diesel comercial (PIRÔLLO, 2006) foi capaz de emulsificar diferentes compostos como benzeno, querosene, óleo diesel comercial e petróleo.

Os testes de biodegradabilidade utilizando-se o indicador redox DCPIP (item 4.6.2) estão de acordo com os resultados obtidos pela *P. aeruginosa* LBI em relação à produção de biossurfactantes, isto é, esta cultura somente foi capaz de produzir biossurfactante

(PIRÔLLO, 2006) utilizando uma fonte de carbono que pudesse ser biodegradada (óleo diesel comercial).

Ambas as culturas *S. hominis* e *K. palustris* demonstraram capacidade de biodegradar óleo diesel comercial (item 4.6.2), contudo, é conhecido que nem todos os microrganismos hidrocarbonoclasticos são capazes de produzir biossurfactantes. Algumas células microbianas mostram alta hidrofobicidade superficial, sendo consideradas elas mesmas um biossurfactante, por exemplo, microrganismos hidrocarbonoclasticos, algumas espécies de Cyanobacteria e alguns patógenos como *S. aureus* e *Serratia* sp. (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Nenhum estudo relacionando as culturas *S. hominis* e *K. palustris* à biodegradação de hidrocarbonetos e à produção de biossurfactantes foi encontrado. No entanto, Gomes et al. (2004) relatam o armazenamento de biossurfactante na parede celular de uma linhagem de *S. aureus*.

Analisando a influência do meio de cultivo na produção de biossurfactante, a cultura *P. aeruginosa* LBI foi capaz de produzir biossurfactante em meio Robert usando óleo diesel comercial como fonte de carbono (PIRÔLLO, 2006). Isto sugere que o meio BH (como empregado no experimento 23) pode não ser adequado à produção de biossurfactantes, especialmente nos casos em que são utilizados hidrocarbonetos como matéria prima. Este meio não apresenta nenhuma fonte de carbono facilmente biodegradável como o extrato de levedura, que pode ser utilizado como um inicializador (*start-up*) pelos microrganismos. Além disso, o meio BH contém altas concentrações de ferro. Ramana e Karanth (1989) observaram que a presença de ferro no meio inibia a produção de glicolipídios pela *P. aeruginosa* CFTR-6, principalmente em concentrações de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ maiores que $0,01 \text{ g.L}^{-1}$. Este fato também foi observado por Silva (2005) com a linhagem *P. aeruginosa* LBI.

Outra questão a ser considerada é que mesmo culturas com provada capacidade de produzir biossurfactantes, por exemplo a *P. aeruginosa* LBI, pode não demonstrar uma resposta positiva imediata a matérias primas que tenham suas características alteradas por mecanismos físico-químicos e biológicos devido ao longo período de exposição desses compostos a condições ambientais, a exemplo do óleo intemperizado utilizado nesse experimento, no qual estão presentes maiores quantidade de hidrocarbonetos recalcitrantes. Este fato pode em alguns casos diminuir a produção de biossurfactante *in-situ* em processos de biorremediação baseados na adição desses microrganismos em áreas onde a contaminação ocorreu há vários anos.

5 - CONCLUSÕES

A partir de ensaios laboratoriais e do monitoramento da água subterrânea, ainda que através de um número pequeno de poços de monitoramento, foi possível identificar fatores que corroboram a eficiência da técnica de biorremediação natural para o tratamento da água subterrânea contaminada em decorrência do vazamento de óleo diesel no posto de combustíveis SB. A presença de microrganismos capazes de biodegradar hidrocarbonetos, a disponibilidade de oxigênio dissolvido e a diminuição da concentração de hidrocarbonetos ao longo do sentido do fluxo da água subterrânea são indicativos de que está ocorrendo a biodegradação. Contudo, a presença de hidrocarbonetos retidos no solo representam uma fonte contínua de contaminação, e por isso o monitoramento a longo prazo faz-se necessário.

A combinação das técnicas de biorremediação (bioestimulação com a adição de nutrientes e de um surfactante e bioaumento) aplicadas ao solo ASP aproximadamente dobrou a eficiência de biodegradação em termos de mineralização (19,8%) com uma remoção de hidrocarbonetos de 45,5%. Observou-se que a deficiência de nutrientes foi o fator limitante principal do processo e o aumento da eficiência de biodegradação com o surfactante Tween 80 sugere que este produto foi efetivo em aumentar a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos. O escasso efeito do bioaumento com bactérias alóctones está de acordo com outros estudos que recomendam o uso dessa técnica em casos de poluentes mais recalcitrantes ou quando a microbiota local é insuficiente ou inadequada.

Com a aplicação da técnica do bioaumento em diferentes solos, foi verificado que nenhum ganho foi obtido com esta técnica de biorremediação, embora o bioaumento tenha sido realizado com microrganismos com comprovada capacidade de degradar óleo diesel. Uma explicação razoável para esta ineficiência é que, quando adicionados ao solo, microrganismos estão sujeitos a princípios ecológicos de competição e predação, o que

diminui significativamente as suas chances de sobrevivência em ambiente naturais. Além disso, os solos coletados dos três postos de combustíveis apresentaram uma microbiota nativa já adaptada para degradar hidrocarbonetos, o que sugere que o uso do bioaumento com o objetivo de acelerar o processo de biorremediação, alcançaria melhores resultados no caso de substâncias mais recalcitrantes ou quando a população microbiana local é insuficiente ou inadequada. De qualquer modo, o desenvolvimento de técnicas para assegurar a sobrevivência dos microrganismos no ambiente natural é essencial.

Embora a adição da vinhaça tenha proporcionado certa fertilização dos solos e um aumento da população microbiana, esta não se mostrou adequada para aumentar a eficiência de biodegradação do óleo diesel. A adição de vinhaça nas águas subterrâneas contaminadas teve um efeito negativo na biodegradação dos hidrocarbonetos, uma vez que a vinhaça, como uma fonte de carbono facilmente assimilável, foi preferencialmente consumida. Assim, o uso da vinhaça em processos de biorremediação mostrou-se ineficiente nas condições estudadas. É importante ressaltar a necessidade de atenção em qualquer tentativa de utilizar-se resíduos como agentes estimulantes da biorremediação, porque eles representam uma fonte potencial de poluição; assim, o uso deveria ser restrito a tratamentos *ex-situ*, pois, processos controlados minimizariam qualquer risco de contaminação adicional.

Estudos de biodegradabilidade que não consideram o efeito de intemperização dos poluentes podem superestimar a taxa de biodegradação; assim, quando a técnica do bioaumento é necessária, a melhor estratégia seria aquela baseada na injeção de consórcios, pois, mesmo culturas com reconhecida habilidade de biodegradar hidrocarbonetos podem falhar quando aplicadas isoladamente.

As culturas *Staphylococcus hominis*, *Kocuria palustris* e *Pseudomonas aeruginosa* LBI, nas condições estudadas, não foram capazes de produzir biossurfactante utilizando óleo diesel intemperizado proveniente de um vazamento. Apesar disso, tentativas para empregar resíduos hidrofóbicos como substratos de baixo custo não podem ser descartadas, uma vez que outros estudos vêm demonstrando que isto é possível. Além disso, o uso de matérias primas de baixo custo pode não somente melhorar o aproveitamento de resíduos, mas também simultaneamente gerar produtos com alto valor agregado de extrema importância. Finalmente, culturas com demonstrada capacidade para produzir biossurfactantes, como *P. aeruginosa* LBI, podem não apresentar um bom desempenho quando matérias primas alternativas são empregadas, por exemplo, óleo diesel intemperizado. Este fato também pode comprometer a produção *in-situ* de biossurfactantes em processos de biorremediação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONSON, S. **Experimental Microbial Ecology**. London, Academic Press, 1970.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **Norma-7181**: Solo - Análise Granulométrica. Rio de Janeiro, 13p, 1984.

_____. **Norma-6502**: Rochas e Solos. Rio de Janeiro, 18p, 1995.

_____. **Norma-10006**: Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, 3 p., 2004.

ABRAMOWICZ, D. A. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: A review. **Critical Reviews in Biotechnology** , v.10, p. 241–251, 1990.

AGRIFANUAL **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP, 2004.

AHEARN, D. G.; MEYRES, S. P.; STANDARD, P. G. The role of yeasts in the decomposition of oils in marine environments. **Dev. Ind. Microbiol.**, v. 12, p.126-134, 1971.

AL-HADHRAMI, M. N.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; FISHER, P. J. Bacterial survival and n-alkane degradation within Omani crude oil and a mousse. **Marine Pollution Bull.**, v.30, n.6, p. 403-408, 1995.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**, 302 p, Academic Press, 1994.

ALVAREZ, P. J. J.; ANID, P. J.; VOGEL, T. M. Kinetics of aerobic biodegradation of benzene and toluene in sandy aquifer material. **Biodegradation** v. 2, p. 43-51, 1991.

_____. Kinetics of toluene degradation by denitrifying aquifer microorganisms. *ASCE J. Environ. Eng.*, v.120, p.1327-1336, 1994.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO **Anuário estatístico 2005**, 2005. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/conheca/auanario_2005.asp>. Acesso em: 16 jun. 2006.

API – AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE Field study of enhanced subsurface biodegradation of hydrocarbons using hydrogen peroxide as an oxygen source. **American Petroleum Institute**, Pub.4448, Washington, DC, 1987.

APS - APPLIED BIOTREATMENT ASSOCIATION **Case history compendium**. Applied Biotreatment Association, Washington, DC, 1989.

_____. **The role of biotreatment of oil spills**. Applied Biotreatment Association, Washington, DC., 1990.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiol. Rev.**, v. 45, n.1, p.180-208, 1981.

_____. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bull.**, v. 31, n.4-12, p. 178-182, 1995.

_____. Applicability of bioremediation to eastern European pollution problems. In: TRAINING WORKSHOP OF ICS-UNIDO ON "SOIL ENVIRONMENTAL ASSESSMENT AND BIOREMEDIATION TECHNOLOGIES", 1997. Disponível em: www.ics.trieste.it/documents/chemistry/remediation/publications/Soil1997/.%5C10_Atlas.pdf Acesso em: 08 Maio 2004.

AZADPOUR-KEELEY, A.; RUSSELL, H. H.; SEWELL, G. W. **Microbial Processes Affecting Monitored Natural Attenuation of Contaminants in the Subsurface**. EPA-Ground Water Issue. 18p., 1999.

AZAMBUJA, E.; CANCELIER, D.; NANNI, A. S. Contaminação dos solos por LNAPL: Discussão sobre diagnóstico e remediação. In: II SIMPÓSIO DE PRÁTICA DE ENGENHARIA GEOTÉCNICA DA REGIÃO SUL, Porto Alegre. p. 185-202, 2000.

BABU, P. S.; VAIDYA, A. N.; BAL, A. S.; KAPUR, R.; JUWARKAR, A.; KHANNA, P. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. **Biotechnology Letters**, v.18, p. 263–268, 1996.

BAILEY, N. J. L.; JOBSON, A. M.; ROGERS, M. A. Bacterial degradation of crude oil: comparison of field and experimental data. **Chemical Geology**, v.11, p. 203-221, 1973.

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

BARKER, J. F.; PATRICK, G. C.; MAJOR, D. Natural attenuation of aromatic hydrocarbons in a shallow sand aquifer. **Ground Water Monitoring Review**, Columbus, v. 7, n. 1, p. 64-71, 1987.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of flask and method for measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Sci.**, v.100, n.1, p.68-70, 1965.

BAUGHMAN, G. L.; PARIS, D. F. Microbial bioconcentration of organic pollutants from aquatic systems – a critical review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 8(3), p. 205-228, 1981.

BAZYLINSKI, D. A.; WIRSEN, C. O.; JANNASCH, H. W. Microbial utilization of naturally occurring hydrocarbons at the Guaymas Basin hydrothermal vent site. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 2832-2836, 1989.

BELLER, H. R.; GRBIC-GALIC, D.; REINHARD, M. Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.786-793, 1992.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the carbon source. **Journal of Food Engineering**, v.54, p.283-288, 2002.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34 (Suppl.1), p. 65-68, 2003.

BERRY, D. F.; FRANCIS, A. J.; BOLLAG, J. M. Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. **Microbiol. Rev.**, v.51, p.43-59, 1987.

BERTRAND, J. C.; RAMBELOARISOA, E.; RONTANI, J. F.; GIUSTI, G.; MATTEI, G. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. **Biotechnology Letters**, v.5, p. 567-572, 1983.

BERWANGER, D. J.; BARKER, J. F. Aerobic biodegradation of aromatic and chlorinated hydrocarbons commonly detected in landfill leachate. **Water Pollution Research Journal of Canada**, v.23, p. 460-475, 1988.

BHUPATHIRAJU, V. K.; KRAUTER, P.; HOLMAN, H. N.; CONRAD, M. E.; DALEY, P. F.; TEMPLETON, A. S.; HUNT, J. R.; HERNANDEZ, M.; ALVAREZ-COHEN, L. Assessment of in-situ bioremediation at a refinery waste-contaminated site and an aviation gasoline contaminated site. **Biodegradation**, v. 13, p. 79–90, 2002.

BITTON, G.; GERBA, C. P. **Ground water. Pollution Microbiology**. John Wiley & Sons. N.Y. 377p., 1984.

BLACKBURN, J. W.; HARNER, E. J.; ROBBINS, W. K.; PRINCE, R. C.; CLARK, J. R.; ATLAS, R. M.; WILKINSON, J. B. Experimental linkage issues of petroleum site bioremediation. **Biodegradation**, v.4, p. 207-230, 1993.

BORDEN, R. C. Natural bioremediation of hydrocarbon-contaminated ground water. Em: **Handbook of Bioremediation**. CRC Press, Boca Ratón, FL. Pp. 177-199, 1994.

BORDEN, R. C.; GOMEZ, C. A.; BECKER, M. T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. **Ground Water**, v.33(2), p. 180-189, 1995.

BOSMA, T. N. P.; MIDDELDORP, P. J. M.; SHRAA, G.; ZEHNDER, A. J. B. Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. **Environ. Sci. Technol.**, v. 31, p. 248-252, 1997.

BOULDING, J. R. **Practical handbook of soil, vadose zone, and ground-water contamination. Assessment, prevention, and remediation**. Boca Raton: Lewis, 948p., 1995.

BRASIL, Leis, etc. **Lei n. 8.974 de 05 de Janeiro de 1995**. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/legis/leis/8974_95.htm>. Acesso em: 12 maio 2004.

_____. **Portaria n. 518 de 25 de março de 2004**. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/sitefunasa/legis/pdfs/portarias_m/pm_518_2004.pdf> Acesso em: 23 jul. 2004.

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

BRODKORB, T. S.; LEGGE, R. Enhanced biodegradation of phenantrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, n. 9, p.3117-3121, 1992.

BROWN, R. A.; NORRIS, R. D.; BRUBAKER, G. R. Aquifer restoration with enhanced bioreclamation. **Pollution Engineering**, v. 17(11), p. 25-28, 1985.

BROWN, R. A.; HICKS, R. J.; HICKS, P. M. Use of Air Sparging for In-Situ Bioremediation. Em: **Air Sparging for Site Remediation**: Lewis Publishers, Inc., p. 38-55, 1994.

BRUBAKER, G. R. The boom in *in situ* bioremediation. **Civil Engineering**, v.65, p. 38-42, 1995.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **J. Bacteriol.**, v. 41, p. 653-673, 1941.

CAMARGO, O. A.; VALADARES, J. M. A. S.; BERTON, R. S.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; MENK, J. R. F. Alteração de características químicas de um latossolo vermelho-escuro distrófico pela aplicação de vinhaça. **Boletim Científico do Instituto Agrônomo de Campinas**, Campinas, n. 9, p. 23, 1987.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.

CARDONA, S.; ITURBE, R., 2003. Biodegradación de diesel mexicano por un consorcio de bacterias de un suelo agrícola. **DYNA**, v.138, p. 13-26, 2003.

CARDOSO, A. N. **Influência da aplicação de vinhaça em propriedades físicas e químicas de um latossolo vermelho-escuro alico, fase cerrado**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

CASARINI, C. P.; SPILBORGHS, M. C. F. Biorrecuperação de locais contaminados com hidrocarbonetos. In: FIRST LABS. LATIM AMERICAM BIODETERIORATION SYMPOSIUM. 12p., 1992.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL **Norma Técnica L 6.350** - Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha. São Paulo. 9p, 1990.

_____. **Norma Técnica L5.018** – Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*. São Paulo, 33p., 1991.

_____. **Norma Técnica L1.022** - Utilização de produtos biotecnológicos para tratamento de efluentes líquidos, resíduos sólidos e recuperação de locais contaminados. São Paulo. 19p., 1994a.

_____. **Norma técnica L5.121** – Demanda Química de oxigênio (DQO) – Método da oxidação por dicromato de potássio em refluxo. São Paulo, 1994b.

_____. **Padrões de qualidade de solos e águas subterrâneas.** Relatório técnico. São Paulo. 8p., 1996.

_____. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas.** Relatório técnico, 2003. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/aguas_final.zip> Acesso em: 26 jul. 2004.

_____. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo.** Relatório técnico, 2005a.

_____. **Norma Técnica P4.231 - Vinhaça - Critérios e Procedimentos para Aplicação no Solo Agrícola.** São Paulo, 2005b.

_____. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>> Acesso em: 20 jun. 2006.

CHAPELLE, F. H. **Ground water microbiology & geochemistry.** N.Y. John Wiley & Sons Inc. 424p., 1993.

_____. **Assessing the efficiency of intrinsic bioremediation.** Washington: Environmental Protection Agency, 9 p. (EPA 540 R – 94/515), 1994.

CHEN, Y. M.; ABRIOLA, L. M.; ALVAREZ, P. J. J.; VOGEL, T. M. Biodegradation and transport of benzene and toluene in sandy aquifer material: model experiment comparisons. **Wat. Resour. Res.**, v. 28, p. 1833-1847, 1992.

CHEON, J. Y.; LEE, J. Y.; LEE, K. K. Characterization of the hydrogeologic environment at a petroleum hydrocarbon contaminated site in Korea. **Environmental Geology**, v.45, p. 869-883, 2004.

CHIANG, C. Y.; SALANITRO, J. P.; CHAI, E. Y.; COLTHART, J. D.; KLEIN, C. L. Aerobic biodegradation of benzene, toluene and kylene in a sand aquifer: data analysis and computer modeling. **Ground Water Monitoring Remote and Remediations**, Dublin, v. 27, n. 6, p. 823-834, 1989.

CLU-IN **Hazardous waste clean-up information**, 2004. Disponível em: <<http://clu-in.org/>>. Acesso em: 30 abril 2004.

COPPEDE, J. S.; FERNANDES, R. S; LATANZE, R.; KRONKA, E. A. M.; BENICASA, M. Assessment of biosurfactant produced from agro industrial waste potential for hydrocarbon-contaminated soil bioremediation. In: **FIRST BRAZILIAN SYMPOSIUM ON PETROLEUM BIOTECHNOLOGY**, Natal – RN, Brazil, 2005.

CORAZZA, R. I. Reflexões sobre o papel das políticas ambientais de ciência e tecnologia na modelagem de opções produtivas ‘mais limpas’ numa perspectiva evolucionista: um estudo sobre o problema da disposição da vinhaça. In: III ENCONTRO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA ECOLÓGICA, Recife, 1999.

CORDAZZO, J. **Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas**. Dissertação (mestrado) – Departamento de Engenharia Mecânica, UFSC – Florianópolis, SC, 2000.

CORMACK, W. P. M.; FRAILE, E. R. Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. **Antarctic Science**, v.9, n.2, p.150-155, 1997.

CORSEUIL, H. X. Limitações da Biomassa Autóctone na Degradação de Compostos Tóxicos em Subsolos. **Revista Bio**, v.3, n.2, p.46-56, 1994.

CORSEUIL, H. X.; WEBER, W. J. Jr. Potential biomass limitations on rates of degradation on monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. **Wat. Res.**, v.28., p.1415-1423, 1994.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Wat. Sci. Tech.**, v. 34, p.311-318, 1996.

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M. Contaminação de água subterrânea por derramamento de gasolina: O problema é grave? **Engenharia Sanitária**, v. 2, p.50-54, 1997.

_____. Efeitos causados pela mistura de gasolina e álcool em contaminações de águas subterrâneas. **Boletim Técnico Petrobrás**, v.41, p.133-138, 1998.

CORSEUIL, H. X.; KULKAMP, M. S. Simultaneous Spills of diesel and ethanol – a controlled release experiment. IN: 7TH INTERNATIONAL IN SITU AND ON-SITE BIOREMEDIATION SYMPOSIUM, Orlando, FL. Columbus-Richland: Battele Press, p.1-5, 2003.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canaveira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, v.2(2), 1992.

CRIVELARO, S. H. R. **Associação de borra oleosa de refinaria de petróleo e vinhaça visando a biodegradação**. Monografia (Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2005.

DANIEL, H. J.; OTTO, R. T.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Sophorolipid production with high yields on whey concentrated and rapeseed oil without consumption of lactose. **Biotechnology Letters**, v.20, p.805–807, 1998.

DANIEL, H. J.; OTTO, R. T.; BINDER, M.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Production of sophorolipids from whey: development of a two stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized concentrates as substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.40-45, 1999.

DAVIS, J. W.; KLIER, N. J. Natural biological attenuation of benzene in groundwater beneath a manufacture facility. **Ground Water Monitoring Remote and Remediations**, Dublin, v. 32, n. 2, p. 215-226, 1994.

DEEB, R. A.; ALVAREZ-COHEN, L. Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*. **Biotech. and Bioeng.**, v.62(5), p. 526-536, 1999.

DEVLIN, J. F.; BARKER, J. F. A semipassive nutrient injection scheme for enhanced in situ bioremediation. **Ground Water**, v. 32(3), p. 374-380, 1994.

DEY, J. C. Integrate site remediation combining groundwater treatment, soil vapor extraction and bioremediation. **Hazardous Materials Control**, v. 4(2), p. 32-39, 1991.

DIFCO MANUAL, 10ed. Detroit: Difco Laboratories, 1984.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA **Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos**. Manual de Métodos de Análises de Solos. Rio de Janeiro, 1997.

FERRARI, M. D. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y su aplicación en la biorremediación de suelos y lodos contaminados. **Rev. Argentina Microbiol.**, v. 28, p.83-98, 1996.

FERRAZ, C. A. M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M.; BALLONI, W.; FLORENZANO, G. Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina maxima*. Parte II. Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça). **Rev. Microbiologia**, São Paulo, n. 17, p. 15-25, 1986.

FERREIRA, J.; ZUQUETTE, L. V. Considerações sobre as interações entre contaminantes constituídos de hidrocarbonetos e os compostos do meio físico. **Geociências**, v. 17(2), p. 527-557, 1998.

FETTER, C. W. **Contaminant Hydrogeology**. New York: Macmillan, 1993.

FONTES, L. E. F. **Propriedades físicas e químicas de um latossolo vermelho-escuro de Goianésia (GO), cultivado com cana-de-açúcar, irrigado com vinhaça.** Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 1988.

FREEZE, R. A.; CHERRY, J. A. **Groundwater.** Prentice Hall, Inc. New Jersey. pp. 604, 1979.

FREIJER, J. I.; JONGE, H.; BOUTEN, W.; VERSTRATEN, J. M. Assessing mineralization rates of petroleum hydrocarbons in soils in relation to environmental factors and experimental scale. **Biodegradation.** v. 7, p. 487-500, 1996.

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

GELHAR, L. W.; WELTY, C.; REHFELDT, K. R. A Critical Review of Data on Field-scale Dispersion in Aquifers. **Water Resour. Res.,** v. 28(7), p.1955-1974, 1992.

GHIORSE, W. C.; WILSON, J. L. Microbial ecology of the terrestrial subsurface. **Advances in Applied Microbiology,** v. 33, p. 107-172, 1988.

GIBOTTI, M., J. **Subsídios geológico-geotécnicos para a implantação de tanques de armazenagem subterrânea de combustíveis: estudo de caso em um solo da Formação Rio Claro.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Unesp – Rio Claro, 1999.

GÓMEZ, J.; RODRÍGUEZ, O. Effects of vinasse on sugarcane (*Saccharum officinarum*) productivity. **Rev. Fac. Agron. (LUZ),** v.17, p.318-326, 2000.

GOMES, R. V.; MARTINS, S. C. S.; MELO, V. M. M. Produção de biossurfactante por *Staphylococcus aureus* isolado de uma amostra de petróleo pesado. IN: IX ENAMA – ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, Curitiba, 2004.

GONÇALVES, C. A. S.; SILVA, E. L. Tratamento Físico-Químico da Vinhaça. In: XXVII CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL – ABES. Fortaleza-CE, Brazil, 2000.

GRADY, C. P. L. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. **Biotech. Bioeng.,** v. 27, p. 660-674, 1985.

GRAY, P. H. H.; THORNTON, H. G. Soil bacteria that decompose certain aromatic compounds. **Zentr. Bakt. Parasitenk Abt II.** v. 73, p.74-96, 1928.

GRBIC-GALIC, D.; VOGEL, T. M. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p.254-260, 1987.

GUERRA, R. C.; ANGELIS, D. F. Classificação e biodegradação de lodo de estações de tratamento de água para descarte em aterro sanitário. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p.87-91, 2005.

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

GUTNICK, D. C.; ROSENBERG, E. Oil tankers and pollution: a microbiological approach. **Annual Rev. Microb.**, v.31, p.379-396, 1977.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.

HACH **Water Analysis Handbook**, 2^a ed., Hach Co., Loveland, 831p., 1992.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman – Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol**, v.11(07), p. 714-719, 1978.

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

HENCKLEIN, F. A. **Estabilização de “landfarming” de refinaria de petróleo e aplicabilidade em solos com baixos teores de carbono**. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto de Biociências, Unesp-Rio Claro, 2005.

HICKMAN, G. T.; NOVAK, J. T. Relationship between subsurface biodegradation rates and microbial density. **Environ. Sci. Technol.**, v.23, p.525-532, 1989.

HINCHEE, R. E. (ed.). **Air Sparging for Site Remediation**. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1994.

HUBBARD, C. E.; BARKER, J. F.; O'HANESSIN, S. F.; VANDEGRIENDT, M.; GILLHAM, R. W. **Transport and Fate of Dissolved Methanol, Methyl-Tertiary-Butyl-Ether, and Monoaromatic Hydrocarbons in a shallow Sand Aquifer**, API Publication Number 4601, American Petroleum Institute, Washington, DC, 1994.

HUNKELER, D.; HÖHENER, P.; ZEYER, J. Engineered and subsequent intrinsic in situ bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 59, p. 231– 245, 2002.

HUTCHINS, S. R.; MOOLENAAR, S. W.; RHODES, D. E.; DOWNS, W. C.; WILSON, J. T.; SMITH, G. B.; KOVACS, D. K. Effect of nitrate addition on bioremediation of fuel-contaminated aquifer-field demonstration. **Ground Water**, v.29, p. 571, 1991a.

HUTCHINS, S. R.; SEWELL, G. W.; KOVACS, D. A.; SMITH, G. A. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms using oxygen, nitrate, or nitrous oxide as the terminal electron acceptor. **Environ. Sci. Technol.**, v.25, p. 68-76, 1991b.

HUTCHINS, S. R.; MOOLENAAR, S. W.; RHODES, D. E. Optimization BTEX degradation under denitrifying conditions. **Environ. Toxicol. and Chem.**, v.10, p. 1437-1448, 1991c.

_____. Column studies on BTEX biodegradation under microaerophilic and denitrifying conditions. **Journal of Hazardous Material**, v. 32, p.195-214, 1992.

IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.176-179, 1995.

INAZAKI, T. H.; PIÃO, A. C. S.; BIDOIA, E. D. Treatment of simulated wastewater containing n-phenyl-nisopropyl-p-phenylenediamine using electrolysis system with Ti/TiRuO₂ electrodes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p.983-994, 2004.

ITAMAR, A. **Efeitos da vinhaça em algumas propriedades químicas e físicas de um latossolo vermelho escuro textura média**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo – ESALQ, Piracicaba, 1978.

JACKISCH-MATSURA, A. B.; DURRANT, L. R. Reutilização de resíduo oleoso para produção de biossurfactante microbiano. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, Campinas-SP, Brazil, 2005.

JENSEN, V. Bacterial flora of soil after application of oily waste. **Oikos**, v.26, p-152-158, 1975.

KADRI, M. H., SALEM, A. A., SALMA, M. Oil degrading bacteria in Kuwait Bay. **J. Marine Sci.**, v. 15, p.50-51, 1986.

- KAPLAN, I. R.; GALPERIN, Y.; LU, S.; LEE, R. Forensic environmental geochemistry: differentiation of fuel-types, their sources and release time. **Org. Geochem.**, v. 27, p. 289-317, 1997.
- KAO, C. M.; WANG, C. C. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. **Wat. Res.** v. 34(13), p. 3413 – 3423, 2000.
- KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.
- KIM, P.; OH, D.; KIM, S.; KIM, J. Relationship between emulsifying activity and carbohydrate backbone structure of emulsan from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 457-459, 1997.
- KOMAGATA, K.; NAKASE, T.; KATSUYA, N. Assimilation of hydrocarbons by yeasts – I Preliminary screening. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v.10, p.313-321, 1964.
- KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C.; STECHEY, D.; WOOD, J. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. **JAACS**, v.61, p.1735–1743, 1984.
- KUHN, E. P.; ZEYER, J.; EICHER, P.; SCHWARZENBACH, R. P. Anaerobic degradation of alkylated benzene in denitrifying laboratory aquifer columns. **Appl. Environ. Microbiol.** v.54, p.490-496, 1988.
- KUKOR, J. J.; OLSEN, R. H. Diversity of toluene degradation following long term exposure to BTEX in situ. Em: **Biotechnology and Biodegradation**. Portfolio Publishing, The Woodlands, TX. Pp. 405-421, 1989.
- LEAHY, J. L.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiol. Rev.**, v. 54(3), p.305-315, 1990.
- LEAVITT, M.; BROWN, K. L. Biostimulation versus bioaugmentation – three case studies. In: HINCHEE, R. E., ALLEMAM, B. C., HOEPEL, R. E. E., MILLER, R. N. (1994). **Hydrocarbon bioremediation**. Lewis Publishers. Boca Raton, FL. 72p., 1994.
- LE PETIT, J., N’GUYEN, M. H., TAGGER, S. Quelques donnes sur l’ecologie d’une zone marine litorales recevant les rejets d’une raffinerie de petrole. **Environ. Pollut.**, v.13, p.41-56, 1977.

LEE, J. Y.; ROH, J. R.; KIM, H. S. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene mixture. **Biotech. and Bioeng.**, v. 43, p.1146-1152, 1994.

LEE, M. D.; THOMAS, J. M.; BORDEN, R. C.; BEDIENT, P. B.; WARD, C. H.; WILSON, J. T. Biorestitution of aquifers contaminated with organic compounds. **CRC Critical Reviews in Environmental Control.**, v. 1. p.29-89, 1988.

LEE, M.; KIM, M. K.; SINGLETON, I.; GOODFELLOW, M.; LEE, S. -T. Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikonurensis* EN3 in the presence of mycolic acid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 325–333, 2006.

LIMA, A. S.; DONALD, R. D. M.; CARDOSO, G. B. Influence of carbon source on the biosurfactants produced by bacteria isolated by petroleum contaminated soil. In: FIRST BRAZILIAN SYMPOSIUM ON PETROLEUM BIOTECHNOLOGY, Natal – RN, Brazil, 2005.

LINKFIELD, T. G.; SUFLITA, J. M.; TIEDJE, J. M. Characterization of the acclimation period before anaerobic dehalogenation of chlorobenzoates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p.2773-2778, 1989.

LÖSER, C.; SEIDEL, H.; HOFFMANN, P.; ZEHNSDORF, A. Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.51, p.105-111, 1999.

LOVAGLIO, R. B.; GOMES, E. B.; MIRANDA, R. C. M.; SOUZA, M. F. V. Q. Biodegradação de queresone por leveduras da região portuária de Suape-PE. In: FIRST BRAZILIAN SYMPOSIUM ON PETROLEUM BIOTECHNOLOGY, Natal – RN, Brazil, 2005.

LOVLEY, D. R.; BAEDECKER, M. J.; LONERGAN, D. J.; COZZARELLI, I. M.; PHILLIPS, E. J. P.; SEIGEL, D. I. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. **Nature**. vl. 339. p.297-299, 1989.

LOVLEY, D. R.; LONERGAN, D. J. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by dissimilatory iron-reducin organism, GS-15. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 1858-1864, 1990.

LOVLEY, D. R. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 259-287, 1991.

LYMAN, W. J.; REIDY, P. J.; LEVY, B. **Mobility and degradation of organic contaminants in subsurface environments**. C. K. Smoley, Inc., Chelsea, MI, 395pp, 1992.

MACHADO, K. M. G. **Biodegradação de pentaclorofenol por fungos basidiomicetos lignocelulolíticos em solos contaminados com resíduos industriais**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 1998.

MAIER R. M.; SOBERON-CHAVEZ G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 54, p.625–633, 2000.

MAJOR, D. W.; MAYFIELD, C. I.; BARKER, J. F. Biotransformation of benzene by denitrification in aquifer sand. **Ground Water**. v. 26 (1), p. 8-14, 1988.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.58, p.428–434, 2002.

MANCINI, T. M. **Métodos de caracterização de áreas potencialmente contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo**. Trabalho de Formatura (Geologia) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Unesp – Rio Claro, 2002.

MARCHAL, R.; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J. P. Gasoline and diesel oil biodegradation. **Oil & Gas Science Technology – Ver. IFP**, v. 58(4), p. 441-448, 2003.

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

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Enhancement of Bioremediation Process Applied to Diesel Oil Contaminated Soils. In: ENPROMER - 2th MERCOSUR CONGRESS ON CHEMICAL ENGINEERING, Mangaratiba - RJ, 2005.

MARIANO, A. P.; CRIVELARO, S. H. R.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Use of vinasse, an ethanol distillery waste, as an amendment to bioremediation of diesel oil contaminated soils. In: XXII INTERAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING, Buenos Aires, 2006a.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M.; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. In: XXII INTERAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING, Buenos Aires, 2006b.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Bioaugmentation technique applied to diesel oil contaminated soils. In: XXII INTERAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING, Buenos Aires, 2006c.

MARIANO, A. P.; BONOTTO, D. M.; ANGELIS, D. F.; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. Use of weathered diesel oil as a low-cost raw material to biosurfactant production In: XXII INTERAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING, Buenos Aires, 2006d.

MATHEUS, D. R. **Otimização da biodegradação de hexaclorobenzeno por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais.** Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2003.

MELO, I. S. (ed.) **Microbiologia ambiental.** Jaguariúna. EMBRAPA. pp. 438, 1997.

MERCADÉ, M. E. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **JAACS**, v.71, p.61–64, 1994.

MERCADÉ, M. E.; MONLEON, L.; DE ANDRES, C.; RODON, I.; MARTINEZ, E.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, A. Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. **J. Appl. Bacteriol.**, v.81, p.161–168, 1996.

MERCER, J. W.; COHEN, R. M. A review of immiscible fluids and remediation. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 6, p.107-163, 1990.

MIHELICIC, J. R.; LUTHY, R. G. Sorption and microbial degradation of naphthalene in soil-water suspensions under denitrifications conditions. **Environ. Sci. Tech.**, v.25, p.169-177, 1991.

MINHONI, M. T. A.; CERRI, C. C. Decomposição de vinhaça em solo sob diferentes níveis de umidade: liberação de CO₂, formação de biomassa microbiana e imobilização do nitrogênio adicionado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.11, p. 25-30, 1987.

MME-DNC - MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA, DEPARTAMENTO NACIONAL DE COMBUSTÍVEIS **Anuário estatístico de 1995**, 1995.

MORAES, I. O.; BENINCASA, M; MONTE ALEGRE, R. Production and characterization of rhamnolipids produced by a newly isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz. J. Food Technol.**, v.5, n.145-149, 2002.

MULLIGAN, C. N.; YOUNG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Eng. Geol.**, v. 60, p. 371-380, 2001.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v.25(5), p. 772-776, 2002.

_____. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336–341, 2006.

NORRIS, R. D. **Handbook of bioremediation**. Lewis Publishers, Boca Raton FL, 257p, 1994.

NYER, E. K. **Groundwater treatment technology**. Van Nostrand Reinhold, 2a ed., N.Y., 306p., 1992.

OH, Y. S.; CHOI, W. Y.; LEE, Y. H.; CHOI, S. C.; KIM, S. J. Biological treatment of oil-contaminated sand: comparison of oil degradation based on thin-layer chromatography/flame ionization detector and respirometric analysis. **Biotechnology Letter**, v. 22, n. 595-598, 2000.

OLIVEIRA, F. J. S.; VASQUEZ, L.; FRANÇA, F. P. Production of biosurfactants by *Pseudomonas alcaligenes* using palm oil. In: 2TH MERCOSUR CONGRESS ON CHEMICAL ENGINEERING (ENPROMER), Costa Verde – RJ, Brazil, 2005.

OTENIO, M. H. **Aplicação do processo eletrolítico no tratamento de águas e estudos de biodegradação da gasolina**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2000.

PALA, D. M.; FREIRE, D. D. C.; SANT'ANA JR, G. L. Bioremediation of clay soils impacted by petroleum. **Engenharia Térmica**, v. 2, p. 29-32, 2002.

PALMA, J. B.; ZUQUETTE, L. V. Principais técnicas de remediação – importância dos atributos geológico-geotécnicos. **Geociências**, v. 17, p. 559-590, 1998.

PARALES, R. E.; DITTY, J. L.; HARWOOD, C. S. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene and trichloroethylene. **Applied and Environ. Microb.**, v.66, p.4098-4104, 2000.

PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 91-94, 1997.

PAUL, E. A.; CLARK, F. G. **Soil Microbiology and Biochemistry**. Academic Press. San Diego. p. 340, 1989.

PEARSON, G.; OUDIJK, G. Investigation and remediation of petroleum product releases from residential storage tanks. **Ground Water Monitoring Review**, v.13(3), p. 124-128, 1993.

PEIXOTO, R. M.; VIEIRA, J. D. G. Determination of the degrading potential of bacteria isolated from an environment impacted by petroleum and derivatives using 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP). In: **FIRST BRAZILIAN SYMPOSIUM ON PETROLEUM BIOTECHNOLOGY**, Natal – RN, Brazil, 2005.

PENNER, G. C. **Estudos Laboratoriais da Contaminação do Solo por Gasolina com o Uso de Detetor de Fotoionização**. São Carlos, 2000. 109p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2000.

PINHOLT, Y.; STRUWE, S.; KJOLLER, A. Microbial changes during oil decomposition in soil. **Holarct. Ecol.**, v. 2, p.195-200, 1979.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biosurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2006.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesq. agropec. bras.**, v. 36(7), p. 975-981, 2001.

PRITCHARD, P. H.; COSTA, C. F. EPA's Alaska oil spill bioremediation project. **Environmental Science and Technology**, v.25, p. 372–379, 1991.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, v.11, n.9, p.671 – 674, 1997.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technol.**, v.90, p.159-168, 2003.

RAMALHO, J. F. G. P.; SOBRINHO, N. M. B. A. Metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso de resíduos agroindustriais. **Revista Floresta e Ambiente**. v. 8(1), p. 120-129, 2001.

RAMANA, K. V.; KARANTH, N. G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 45, p. 249 – 257, 1989.

RAMASWAMI, A.; LUTHY, R. Measuring and modeling physicochemical limitations to bioavailability and biodegradation. In HURST, C. J., KNUDSEN, G. R., McINERNEY, M. J., STETZENBACH, L. D., WALTER, M. V. (eds.). **Manual of environmental microbiology**. ASM Press, Washington DC, pp. 721-729, 1997.

RAYMOND, R. L.; HUDSON, J. O.; JAMISON, V. W. Oil degradation in soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.31, p.522-535, 1976.

RISER-ROBERTS, E. **Bioremediation of petroleum contaminated sites**. Boca Ratón, FL. CRC Press, 1992.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; BOSH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v.11, n.12, p. 871-874, 1989.

RODELLA, A. A.; ZAMBELLO JÚNIOR, E.; ORLANDO FILHO, J. Effects of vinasse added to soil on pH and exchangeable aluminum content. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS. Havana, Universidad de La Habana, p. 189-214, 1983.

RÖLING, W. F. M.; VERSEVEL, H. W. Natural attenuation: What does the subsurface have in store? **Biodegradation**, v.13, p. 53-64, 2002.

RON, E. Z.; ROSEMBERG, E. Natural role of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 2001.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D. L. The hydrocarbon-oxidizing bacteria. Em: STARR, M. P., STOLP, H., TRUPER, G. H., BALOWS, A., SCHLEGEL, H. G. **The prokaryotes**. New York, Springer-Verlag, 1981.

ROUSE, J. D.; SABATINI, D. A.; SUFLITA, J. M.; HARWELL, J. H. Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.**, v.24, p. 325-370, 1994.

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

RUDD, L. E.; PERRY, J. J.; HOUK, U. S.; WILLIAMS, R. W.; CLAXTON, L. D. Changes in mutagenicity during crude oil degradation by fungi. **Biodegradation**, v.7, p.335-343, 1996.

SANCHES, L. E. A. **Desativação de empreendimentos industriais: um estudo sobre o passivo ambiental.** Tese (Livre Docência) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 1998.

SANTOS, R. C. **Impacto do Etanol na Biodegradação de Compostos Hidrocarbonetos Monoaromáticos em Aquíferos Contaminados por Derramamento de Gasolina.** Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Ambiental. UFSC, Florianópolis, 1996.

SEKLEMOVA, E.; PAVLOVA, A.; KOVACHEVA, K. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. **Biodegradation**, v.12, p. 311–316, 2001.

SCHAFFNER, I. R.; JUNEAU, A. A. In-Situ Air Sparging Without Inorganic Nutrient Amendment: An Effective Bioremediation Strategy For Treating Petroleum-Contaminated Groundwater Systems. In: THE NINETH NATIONAL OUTDOOR ACTION CONFERENCE ON AQUIFER REMEDIATION, GROUND WATER MONITORING, & GEOPHYSICAL METHODS: NATIONAL GROUND WATER ASSOCIATION, p. 101-115, 1995.

SCHINK, B. Degradation of unsaturated hydrocarbons by methanogenic enrichment cultures. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 31, p. 69-77, 1985.

SHAMSHOOM, S. M.; ZIARA, T. S.; ABDUL-RITHA, A. N.; YACOUB, A. E. Distribution of oil bacteria in the north-west Arabian Gulf. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 21, p.38-40, 1990.

SILVA, J. H. **Isolamento e caracterização de fungos filamentosos capazes de degradar o pentaclorofenol (PCF).** Dissertação (Mestrado) – Esalq, Universidade de São Paulo, 1999.

SILVA, R. L. B.; BARRA, C. M.; MONTEIRO, T. C. N.; BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.18(6), p.1599-1607, 2002.

SILVA, M. R. O.; SOUZA, C. S.; MELO, E. J. V.; SOUZA, M. F. V. Q. Seleção de linhagens, isoladas e em consórcios, com potencialidade para degradar óleo diesel. In: FIRST BRAZILIAN SYMPOSIUM ON PETROLEUM BIOTECHNOLOGY, Natal – RN, Brazil, 2005.

SILVA, B. H. **Influência das fontes: carbono e nitrogênio na produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 31479 e *Pseudomonas aeruginosa* LBI.** Monografia (Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2005.

SINGER, M. E.; FINNERTY, W. R. Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. In **Petroleum Microbiology**, ed. R. Atlas, McMillan Publishing Co., NY, p. 1-60, 1984.

SIVIERO, A. R. **Avaliação da biodegradação em solo de resíduos sólidos de fundição-areia fenólica - utilizando o método respirométrico**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 1999.

SIVIERO, A. R.; CORAUCCI FILHO, B.; ALBUQUERQUE, A. F.; ANGELIS, D. F.; OLIVEIRA, L. F. C.; HONÓRIO, E. F. O ensaio de respirometria na orientação para aplicação de resíduos industriais no solo. In: IX SIMPÓSIO LUSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL (SILUBESA), Porto Seguro - BA, 2000.

SMOLENSKI, W. J.; SUFLITA, J. M. Biodegradation of cresol isomers in anoxic aquifers. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53, p. 710-716, 1987.

SONG, H. G.; WANG, X.; BARTHA, R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p.652-656, 1990.

SONG, H. G.; BARTHA, R. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, Vol. 56, n.3, pp.646-651, 1990.

SORKHOH, N. A.; GHANNOUM, M. A.; IBRAIM, A. S.; STRETTON, R. J.; RADWAN, S. S. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochous* isolated from soil and marine environment in Kuwait. **Environ. Pollution**, v. 65, p.1-17, 1990.

SOUZA, A. M. G. F. **Aplicação de método respirométrico na avaliação do emprego de areia fenólica de fundição, juntamente com solo, na cobertura de aterro sanitário**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2000.

SOUZA, C. S.; MIRANDA, R. C. M.; SENA, K. X. F. R.; ARAÚJO, J. M.; CHIAPPETA, A.; SOUSA, M. F. V. Q. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. In: 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS. Salvador-BA-Brazil, 2005.

SPILBORGHES, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1997.

STOKSTAD, E. Factory study shows low levels of benzene reduce blood cell counts, **Science**, v.306, p.1665, 2004.

SUFLITA, J. M.; HOROWITZ, A.; SHELTON, D. R.; TIEDJE, J. M. Dehalogenation: A novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. **Science**, v.214, p.1115–1117, 1982.

TAUK, S. M. **Efeito de doses cumulativas de vinhaça em algumas propriedades do solo sob cerrado e do solo de culturas do milho e cana-de-açúcar no município de Corumbataí, SP.** Tese (Livre-docência) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1987.

THOMAS, J. M.; LEE, M. D.; BEDIANT, P. B.; BORDEN, R. C.; CARTER, L. W.; WARD, C. H. **Leaking Underground Storage Tanks: Remediation with Emphasis on in situ Bioreclamation.** EPA/600/S2–87/008, 1987.

THOMAS, J. M.; WARD, C. H. In situ bioremediation of organic contaminants in ground water in the subsurface. **Environmental Science and Technology**, v.23(7), p. 760-766, 1989.

TONETTO, E. M.; BONOTTO, D. M. Implementação de metodologia para a análise química de águas e sua aplicação na caracterização das águas subterrâneas de Águas da Prata (SP). **Geociências**, São Paulo, v. 18(2), p. 303 – 325, 1999.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; LEMOS, J. L. S. Evaluation of biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil. In: 9th INTERNATIONAL PETROLEUM ENVIRONMENTAL CONFERENCE, New Mexico, USA, 2002.

UNTERMAN, R. A history of PCB biodegradation. Em: CRAWFORD, R. L., CRAWFORD, D. L. (eds.). **Bioremediation: Principles and Applications.** University Press, Cambridge p. 209–253, 1996.

USEPA – U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY **Assessing UST corrective action technologies: early screenig of clean-up technologies for the saturated zone.** EPA/600/2-90/027. p.124, 1990.

_____. **Engineering bulletin: In situ soil vapor extraction treatment.** EPA/540/2-91/006, 1991.

_____. **Technologies and options for UST corrective actions: Overview of current practices.** EPA/542/R-92/010, 1992.

_____. **Office of Underground Storage Tanks, Markets and Technology Trends.** EPA/510/B99/007, 1999.

_____. **Chapter III-Behavior of hydrocarbons in the subsurface**, 2003a. Disponível em: <http://www.epa.gov/oust/pubs/fpr_c3.pdf> Acesso em: 27 jun. 2003.

_____. **Overview of the federal underground storage tank program**, 2003b. Disponível em: <<http://www.epa.gov/swerust1/overview.htm>> Acesso em: 27 jun. 2003.

VENKATESWARAM, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. **Can. J. Microbiol.**, Vol. 41, pp.767-775, 1995.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; RULKENS, W. H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. **Biodegradation**, v.8, p. 401– 417, 1998.

VROBLESKY, D. A.; CHAPELLE, F. H. Temporal and spatial changes of terminal electronaccepting processes in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer and the significance for contaminant biotransformation, **Water Resource Res.**, v.30(5), p.1561–1570, 1994.

XIE, W. **Effect of Bioventing Remediation by surfactant on in-situ oil-contaminated soil**. Dissertação (Mestrado). NYUST, Taiwan, China, 2003.

WALT, W.; McNAB Jr. Comparisons of geochemical signatures of biotransformation of fuel hydrocarbons in groundwater. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 59, p. 257–274, 1999.

WALWORTH, J. L.; WOOLARD, C. R.; BRADDOCK, J. F.; REYNOLDS, C. M. The Role of Soil Nitrogen Concentration in Bioremediation. In *Situ and On-Site Bioremediation*, v.4(4), p. 283-288, 1997.

WARD, C. H.; THOMAS, J. M.; FIORENZA, S.; RIFAI, H. S.; BEDIANT, P. B.; ARMSTRONG, J. M. A quantitative demonstration of the Raymond process for in situ bioremediation of contaminated aquifers. In: CONFERENCE ON PETROLEUM HYDROCARBONS AND ORGANIC CHEMICALS IN GROUND WATER: PREVENTION, DETECTION AND RESTORATION. National Water Well Assoc., Houston, pp.723-743, 1988.

WATERLOO **Caracterização Geológica, Hidrogeológica e Análise Qualitativa da Contaminação no Solo e na Água Subterrânea**. Relatório Interno da Waterloo Hydrogeologic Brasil, São Paulo, pp.40, 1999.

WEBER, W. J. Jr; CORSEUIL, H. X. Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. **Wat. Res.**, v.28, p.1407-1414, 1994.

WIEDEMEIR, T. H. Approximation of biodegradation rate constants for monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in ground water. **Ground Water Monitoring Remote and Remediations**, Dublin, p.186-194, 1996.

WILSON, S. B.; BROWN, R. A. In situ bioreclamation: a cost-effective technology to remediate subsurface organic contamination. **Groundwater Monitoring Review**, v.9(1), p.173-179, 1989.

YANIGA, P.M.; SMITH, W. Aquifer restoration via accelerated *in situ* biodegradation of organic contaminants. In: CONFERENCE ON PETROLEUM HYDROCARBONS AND ORGANIC CHEMICALS IN GROUND WATER—PREVENTION, DETECTION, AND RESTORATION. National Water Well Association, Worthington, OH., pp. 451–470, 1984.

YOUNG, L. Y. Anaerobic degradation of aromatic compounds. Em: **Microbial degradation of aromatic compounds**. GIBSON, D. T. (ed.). Marcel-Dekker-Inc., New York, pp. 487-523, 1984.

ZEHNDER, A. J. B. Ecology of methane formation. Em: **Water Pollution Microbiology**, Vol. 2, MITCHELL, R. (ed.). Wiley Interscience, New York. pp.349-376, 1978.

ZHENG, Z.; OBBARD, J. P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Removal from Soil by Surfactant Solubilization and *Phanerochaete chrysosporium* Oxidation. **J. of Environ. Quality**, v.31, p. 1842-1847, 2002.

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

_____. **Studies on redox potential of marine sediments**. Bull. Am. Assoc. Petrol. Geologists, Vol. 30, pp 477-509, 1946b.