

RICHARD CLAYTON TOMASELLA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE BUTANOL NA
BIODEGRADABILIDADE DA GASOLINA E DO ÓLEO
DIESEL**

*Monografia apresentada à Comissão do Trabalho de Formatura do
Curso de Graduação em Engenharia Ambiental do Instituto de
Geociências e Ciências Exatas – Unesp, Campus de Rio Claro (SP),
como parte das exigências para o cumprimento da disciplina
Trabalho de Formatura no ano letivo de 2009*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dejanira de Franceschi de Angelis

Rio Claro (SP)
2009

RICHARD CLAYTON TOMASELLA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE BUTANOL NA BIODEGRADABILIDADE DA
GASOLINA E DO ÓLEO DIESEL**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dejanira de Franceschi de Angelis

Supervisor/Pesquisador: Dr. Adriano Pinto Mariano

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, para
obtenção do grau de Bacharel em Engenharia
Ambiental.

Rio Claro
2009

628.092 Tomasella, Richard Clayton

T655e Efeito da adição de butanol na biodegradabilidade da gasolina e do óleo diesel / Richard Clayton Tomasella. - Rio Claro - SP : [s.n.], 2009
60 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Ambiental) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis
Co-Orientador: Adriano Pinto Mariano

1. Engenharia ambiental. 2. Biodegradabilidade de combustíveis. 3.
Butanol. 4. Gasolina. 5. Óleo diesel. 6. Biodegradação. 7. Misturas. I.
Título.

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

Comissão examinadora

Prof^a. Dr^a. Dejanira de Franceschi de Angelis
Unesp/IB/Rio Claro

Dr. Adriano Pinto Mariano
Unicamp/FEC/Campinas

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

Richard Clayton Tomasella

Rio Claro, 14 de Dezembro de 2009.

Resultado: Aprovado com Louvor

À Deus e a minha família, os maiores responsáveis pela realização deste sonho, por tudo o que representam, pelo amor, carinho, dedicação, incentivo e apoio oferecidos em todos os momentos desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me presenteado com uma família maravilhosa, ter me dado saúde, paciência e me ajudado nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus pais Sergio e Leonice por serem exemplos de determinação, luta, trabalho, dedicação e honestidade, além de confiarem sempre em meu potencial.

Aos meus irmãos Sergio e Peterson que sempre estiveram comigo nas horas de dificuldade, me auxiliando com palavras sábias a tomadas de decisões corretas.

A minha avó Júlia que sempre esteve presente durante essa jornada, me apoiando e confiando em meu trabalho. A minha tia Lúcia devido à disposição em me acompanhar nessa jornada, me apresentando em suas orações para que eu pudesse caminhar com passos firmes e corretos durante esses anos.

A Prof^a. Dr^a. Dejanira de Franceschi de Angelis pela orientação nesse trabalho, além da imensa sabedoria e paciência que teve para me auxiliar em minha pesquisa e em minha formação acadêmica e pessoal (um exemplo de pessoa a ser seguido por todos).

Ao Engenheiro Dr. Adriano Pinto Mariano que foi um dos principais pilares nesse trabalho e esteve sempre presente para me auxiliar e a orientar, com sua experiência e dedicação, a resolver os problemas que surgiram durante o desenvolvimento do trabalho.

À Prof^a. Dr^a Aurora M. G. de França Souza pela supervisão em meu estágio obrigatório e por integrar a banca examinadora do meu TCC.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo nº 2007/07049-4) pelo auxílio, me concedendo uma bolsa para a realização do projeto.

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (PRH-05), ao Prof. Dr. Dimas Dias Brito, coordenador do PRH-05, e ao José Maria Cazonatto, secretário do PRH-05 que acreditaram em meu desempenho como aluno não-bolsista do programa, permitindo que meu trabalho fosse elaborado com perfeição.

À Dilza por me ajudar em tudo que eu precisava, sempre paciente e muito atenciosa.

Ao pessoal do laboratório e do Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada Inês, Márcio, Márcio Ramos, Letícia, Ângela, Rodrigo, Zito, Beto, Lu, Guerra, Héliid, Roberta, Clara, em fim, todas as pessoas que me ajudaram no desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores do curso de Engenharia Ambiental que me deram à base e o auxílio em minha formação acadêmica.

As amigas Marcella e Fernanda, companheiras de classe e laboratório, que estiveram presentes me apoiando e ajudando durante minhas análises e estudos.

Ao Lucas Fuess que sempre esteve disposto a me ajudar nos estudos e a emprestar suas anotações quando eu mais precisava.

Aos colegas e amigos de classe por conviverem comigo nesses 5 anos de graduação.

A minha namorada por agüentar com paciência e conviver ao meu lado durante esses anos de estudo.

A todos que contribuíram positivamente, estando ao meu lado durante a graduação.

*“O segredo é não correr atrás das borboletas ...
... é cuidar do jardim para que elas venham até você”*

Mario Quintana

INDÍCE

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
2.1 Objetivos Específicos.....	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
3.1 Combustíveis Derivados do Petróleo.....	04
3.1.1 Butanol.....	04
3.2 Degradação e Biodegradação.....	06
3.3 Avaliação da Biodegradação.....	06
3.3.1 Métodos de avaliação da biodegradação em laboratório.....	07
3.4 Biodegradabilidade dos Hidrocarbonetos BTEX.....	09
3.5 Microrganismos Degradores de Hidrocarbonetos.....	11
3.6 Conceitos Envolvidos na Biorremediação.....	14
3.6.1 Ação dos microrganismos.....	14
3.6.2 Processos de biorremediação “in situ”.....	15
3.6.3 Biorremediação intrínseca (natural).....	15
3.6.4 Biodegradação aeróbia.....	16
3.7 Considerações sobre o Método Respirométrico e o Teste do Indicador 2,6-Diclorofenol Indofenol (DCPIP).....	17
3.7.1 Método respirométrico de Bartha e Pramer.....	17
3.7.2 Teste do indicador 2,6-Diclorofenol Indofenol (DCPIP).....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Caracterização e Amostragem do Solo e da Água.....	20
4.2 Experimentos Respirométricos.....	22
4.3 Teste de Biodegradabilidade – Indicador DCPIP.....	23
4.3.1 Microrganismos.....	23
4.3.2 Preparo dos inóculos e do teste com o indicador DCPIP.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Mistura Butanol/Gasolina em Comparação com a Mistura Etanol/Gasolina.....	24
5.1.1 Experimentos respirométricos de Bartha e Pramer.....	24
5.1.2 Teste de biodegradabilidade com o indicador redox DCPIP.....	29

5.2 Mistura Butanol/Diesel em Comparação com a Mistura Biodiesel/Diesel.....	30
5.2.1 Experimentos respirométricos de Bartha e Pramer.....	30
5.2.2 Teste de biodegradabilidade com o indicador redox DCPIP.....	33
6. CONCLUSÕES.....	35
7. RECOMENDAÇÕES.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

INDÍCE DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Características da amostra do solo.....	21
Tabela 2: Características da amostra da água (1º Experimento).....	21
Tabela 3: Características da amostra da água (2º Experimento).....	21
Tabela 4: Protocolos dos experimentos respirométricos.....	22
Tabela 5: Tempo para a descoloração do indicador DCPIP (1º Experimento).....	29
Tabela 6: Tempo para a descoloração do indicador DCPIP (2º Experimento).....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Características de alguns componentes do petróleo.....	05
Figura 2: Esquema de um respirômetro de Bartha e Pramer.....	18
Figura 3: Respirômetros de Bartha e Pramer.....	18
Figura 4: Teste com o indicador 2,6-diclorofenol indofenol.....	19
Figura 5: Produção diária de CO ₂ durante incubação (150 dias) do experimento respirométrico 1 (contaminação do solo).....	24
Figura 6: Produção diária de CO ₂ durante incubação (132 dias) do experimento respirométrico 2 (contaminação da água).....	25
Figura 7: Quantidade total acumulada de CO ₂ produzida no experimento respirométrico 1 (contaminação do solo) durante a incubação.....	27
Figura 8: Quantidade total acumulada de CO ₂ produzida no experimento respirométrico 2 (contaminação da água) durante a incubação.....	27
Figura 9: Produção diária de CO ₂ durante incubação (92 dias) do experimento respirométrico 3 (contaminação do solo).....	30
Figura 10: Quantidade total acumulada de CO ₂ produzida no experimento respirométrico 3 (contaminação do solo) durante a incubação.....	31
Figura 11: Produção diária de CO ₂ durante incubação (53 dias) do experimento respirométrico 4 (contaminação da água).....	31
Figura 12: Quantidade total acumulada de CO ₂ produzida no experimento respirométrico 4 (contaminação do solo) durante a incubação.....	32

RESUMO

O aumento do preço do petróleo e a tendência atual do uso de matérias-primas renováveis para a produção de produtos químicos renovam o interesse na produção de biobutanol que, produzido via fermentação de matérias-primas agrícolas, pode ser utilizado como um componente da gasolina e do óleo diesel. Com a comercialização desse novo biocombustível, poderão ocorrer danos ambientais devido ao derramamento dessas substâncias. Entre outras técnicas, a limpeza dessas áreas contaminadas pode ser alcançada com biorremediação, uma técnica baseada na ação de microrganismos, que tem a vantagem de transformar contaminantes perigosos em substâncias não tóxicas, como o CO₂, água e biomassa. Assim, tendo em mente a utilização de biobutanol no futuro próximo como um aditivo gasolina e devido à falta de conhecimento dos efeitos de butanol sobre a biodegradação de gasolina, este trabalho visou avaliar a biodegradação aeróbia da concentração da mistura butanol/gasolina e butanol/diesel (20% v/v), em comparação com a concentração da mistura etanol/gasolina e biodiesel/diesel (20% v/v), respectivamente. Para tanto, foram empregadas duas técnicas, o método respirométrico e o teste do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). No primeiro, experimentos simulando a contaminação de um ambiente natural foram realizados em respirômetros de Bartha, usados para medir a produção microbiana de CO₂. Com o teste do indicador, a capacidade de quatro inóculos em biodegradar as misturas de 20 % foi testada. Nos experimentos butanol/gasolina, a adição de álcoois na gasolina resultou em efeitos sinérgicos positivos na biodegradação dos combustíveis no solo e na água. Além disso, resultados sugerem que o butanol promoveu uma melhor biodegradação da gasolina do que o etanol. No entanto, nos experimentos butanol/diesel, a concentração e a solubilidade foram fatores importantes para avaliar a biodegradação dos compostos. A biodegradação dos combustíveis puros determinou a ordem de biodegradabilidade: diesel>butanol>gasolina. Com isso, o efeito de biodegradabilidade quando o butanol estava presente foi positivo na gasolina e negativo no óleo diesel (solo).

Palavras-chave: butanol, etanol, gasolina, diesel, biodiesel, biodegradação, misturas, solo, água

ABSTRACT

The increase in the oil price and the current trend of using renewable raw materials for the production of chemicals renew the interest in the production of biobutanol that, produced by fermentation of agricultural raw materials, can be used as a component of gasoline and diesel. With the commercialization of new fuels, environmental damages due to spills can occur. Among other techniques, the clean-up of these contaminated areas can be achieved with bioremediation, a technique based on the action of microorganisms, which has the advantage of turning hazardous contaminants into non toxic substances such as CO₂, water and biomass. Thus, bearing in mind the use of biobutanol in the near future as a gasoline extender and due to the lack of knowledge of the effects of butanol on the biodegradation of gasoline, this work aimed to assess the aerobic biodegradation of butanol/gasoline blends and butanol/diesel (20% v/v), being the latter compared to the ethanol/gasoline blend and biodiesel/diesel (20% v/v), respectively. Two experimental techniques were employed, namely the respirometric method and the redox indicator 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) test. In the former, experiments simulating the contamination of natural environments were carried out in biometer flasks, used to measure the microbial CO₂ production. The DCPIP test assessed the capability of four inocula to biodegrade the fuel blends. In butanol/gasoline experiments the addition of the alcohols to the gasoline resulted in positive synergic effects on the biodegradation of the fuels in soil and water matrices. Furthermore, results suggest that butanol better enhanced the biodegradation of gasoline than ethanol. However, in butanol/diesel experiments, concentration and solubility were important factors to evaluate the biodegradation of compounds. The biodegradation of the pure fuels determined the order of biodegradability: diesel>butanol>gasoline. Thus, the effect of the biodegradability when the butanol was present was positive in gasoline and negative in diesel oil (soil).

Key-words: butanol, ethanol, gasoline, diesel, biodiesel, biodegradation, blends, soil, water

1. INTRODUÇÃO

As preocupações ambientais e a escassez do óleo derivado do petróleo em um futuro próximo levaram vários países a adotar uma legislação que permite a adição de biocombustíveis na formulação da gasolina e do diesel. O etanol e o biodiesel estão sendo produzidos em grande escala e em países como o Brasil os carros flex já podem ser abastecidos com etanol puro ou em qualquer proporção de gasolina e etanol.

O processo fermentativo em escala industrial não é recente, sendo que, a produção de acetona e butanol foi um dos primeiros processos de fermentação industrial desenvolvidos em larga escala. A interrupção da produção pela fermentação foi dada na década 60 devido à desvantagem econômica desse processo em relação à rota petroquímica. Contudo, desenvolvimentos recentes em biotecnologia, o aumento no preço do petróleo e o forte interesse no uso de matérias-primas renováveis para a produção de químicos, proporcionaram a renovação do interesse pela rota fermentativa (SHI et al., 2005; EZEJI et al., 2007; MARIANO et al., 2008a). Além do etanol, a demanda de butanol pode aumentar significativamente devido à proposta atual do uso desse composto, produzido via fermentação, como um biocombustível.

O biobutanol é um álcool de 4-carbonos proveniente da fermentação de açúcares e tem muitas características que o tornam um melhor aditivo de combustível do que o etanol. O butanol possui um alto conteúdo energético, miscibilidade total com gasolina e diesel, uma baixa pressão de vapor e é menos explosivo e corrosivo que o etanol (QURESHI & BLASCHEK, 1999). Devido à sua característica não-polar, o butanol também pode ser misturado com o diesel. Apesar destas vantagens, há desvantagens inerentes relacionados com o processo produtivo de fermentação, o que torna ainda a produção de biobutanol, em escala industrial, economicamente inviável. No entanto, as melhorias da tecnologia para a produção de biobutanol estão em ritmo acelerado (QURESHI, 2009) e por esta razão a comercialização

de biobutanol está prevista para a próxima década. Nesse contexto, em 2007, a DuPont (Estados Unidos) e a BP (Reino Unido) anunciaram seus planos para a produção de biobutanol para ser usado como um novo aditivo da gasolina (EZEJI et al., 2007).

Com a comercialização do butanol ou das misturas de butanol/gasolina e butanol/diesel, podem ocorrer danos ambientais devido ao derramamento dessas substâncias. No entanto, entre outras técnicas, a limpeza destas áreas contaminadas pode ser alcançada com a biorremediação, uma técnica baseada na ação de microrganismos, os quais transformam contaminantes perigosos em substâncias não tóxicas como CO₂, água e biomassa.

Como o etanol está no mercado de combustíveis desde as últimas décadas, diversos trabalhos avaliando seu efeito na biodegradação da gasolina foram publicados (CORSEUIL e HUNT, 1998; POWERS et al., 2001; SILVA e ALVAREZ, 2004; MACKAY et al., 2006; NARDI et al., 2007). De acordo com estes estudos, o etanol aumenta a solubilização e a migração dos mono-aromáticos benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos (BTEX) no aquífero, e seu uso como substrato preferencial pelas bactérias do solo, torna difícil a biodegradação aeróbia dos BTEX no meio ambiente (POWERS et al., 2001; CORSEUIL et al., 2004). Por outro lado, não foi encontrado nenhum relato sobre os efeitos do butanol na biodegradação da gasolina.

Assim como o etanol é adicionado à gasolina, o biodiesel, por sua vez, é adicionado ao óleo diesel em vários países. Assim, uma vez que o biodiesel está no mercado há alguns anos, vários trabalhos avaliando o seu efeito na biodegradação do diesel foram publicados (MAKAREVICIENE e JANULIS, 2003; PASQUALINO et al., 2006; LAPINSKIENÉ et al., 2006; MARIANO et al., 2008a). Estes estudos demonstraram que biodiesel é mais facilmente biodegradado e menos tóxico que óleo diesel e que o biodiesel pode promover e acelerar a biodegradação do diesel pelo cometabolismo. Por outro lado, também não foi encontrado nenhum relato sobre os efeitos do butanol na biodegradação do diesel. Até o momento, os estudos de biodegradação concentraram-se principalmente na remoção do butanol de efluentes industriais (HEINZE e FRIEDRICH, 1997; VEERANAGOUDA et al., 2006). Além disso, USEPA (1989) relatou que o butanol foi biodegradado prontamente em solos agrícolas e em água, sendo a biodegradação o processo de remoção mais importante.

Deste modo, tendo em mente o uso do biobutanol em um futuro próximo como um aditivo da gasolina e até mesmo do óleo diesel, e devido à falta de conhecimentos dos efeitos do butanol na biodegradação da gasolina e do óleo diesel, este trabalho visou avaliar a biodegradação aeróbia desses compostos utilizando duas técnicas experimentais, a respirometria de Bartha e a técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol.

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram avaliar a biodegradabilidade das misturas butanol/gasolina e butanol/diesel em comparação, respectivamente, com as misturas etanol/gasolina e biodiesel/diesel utilizando duas técnicas experimentais: o método respirométrico e o teste de biodegradabilidade com o indicador 2,6-diclorofenol indofenol.

2.1 Objetivos Específicos

- (1) Através dessas duas técnicas experimentais avaliar se o butanol, como um aditivo da gasolina e do óleo diesel, representa alguma vantagem em termos ambientais quando comparado com os atuais aditivos utilizados no Brasil, o etanol e o biodiesel.
- (2) Para se comercializar um novo biocombustível faz-se necessário avaliar os impactos que esse novo produto pode causar no meio ambiente.
- (3) Os resultados obtidos nesse trabalho servirão como informação importante para elaborar projetos de descontaminação de áreas afetadas por vazamentos, além de fornecerem dados a respeito da concentração das misturas de combustíveis no solo e na água.
- (4) A comprovação de que as concentrações das misturas de combustíveis, butanol com gasolina e butanol com diesel, são biodegradáveis, será um subsídio importante para a aprovação governamental da comercialização desse novo biocombustível.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica enfocou-se na biodegradabilidade de hidrocarbonetos presentes em combustíveis derivados do petróleo, devido ao tema do estudo abordado nesta pesquisa.

3.1 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).

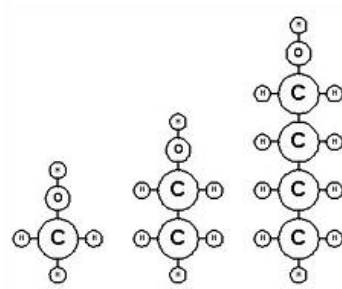
No Brasil, cerca de 20% do petróleo processado é convertido em gasolina automotiva e 36% em óleo diesel (MME-DNC, 1995). A gasolina é uma mistura complexa de hidrocarbonetos hidrofóbicos relativamente voláteis. Os hidrocarbonetos típicos são os compostos alifáticos (alcanos, cicloalcanos, alcenos), aromáticos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

3.1.1 Butanol

O Butanol é um álcool de quatro carbonos e representado por $C_4H_{10}O$. É utilizado com solvente e combustível. O álcool é uma família de compostos químicos que também incluem metanol (1-carbono), etanol (2-carbono) e propanol (3-carbono). O propanol é usado geralmente para álcool, solventes químicos - diluentes e combustíveis. Atualmente, o butanol é utilizado, principalmente, como solvente, mas com a intenção futura de ser produzido em larga escala como combustível. Atualmente fabricado a partir de petróleo, o butanol em meados dos anos de 1900 a 1950 era fabricado a partir do milho e melaço através de um processo de fermentação que também produzia acetona e etanol. Esse processo fermentativo

era conhecido como ABE (acetona, butanol, etanol). A interrupção da produção pela fermentação foi dada na década 60 devido à desvantagem econômica desse processo em relação à rota petroquímica. Contudo, desenvolvimentos recentes em biotecnologia, o aumento no preço do petróleo e o forte interesse no uso de matérias-primas renováveis para a produção de químicos, proporcionaram a renovação do interesse pela rota fermentativa (Shi et al., 2005; Ezeji et al., 2007; Mariano et al., 2008a). Além do etanol, a demanda de butanol pode aumentar significativamente devido à proposta atual do uso desse composto, produzido via fermentação, como um biocombustível.

O butanol como combustível pode substituir ou ser usado como aditivo da gasolina, devido suas propriedades como combustível alternativo ser superiores em relação ao etanol. Algumas das características favoráveis são: o Teor energético superior (110.000 BTU / galão para butanol contra 84.000 BTU / galão de etanol, sendo que a gasolina contém cerca de 115.000 BTU / galão); a evaporação do butanol é seis vezes menor em relação a evaporação do etanol e 13,5 vezes menor do que a gasolina, tornando-o mais seguro para uso como um aditivo. Outro aspecto relevante é que o butanol pode ser enviado através de dutos de combustíveis existente, sendo que o etanol deve ser transportado via ferroviária, fluvial ou caminhão devido seu poder corrosivo e finalizando o etanol pode ser usado apenas como um aditivo da gasolina para até cerca de 85% e, em seguida, só depois de modificações significativas no motor, enquanto a gasolina pode ser substituída pelo butanol em 100% sem modificações no motor automotivo (ButylFuel, LLC).



The image shows the chemical structures of three alcohols: Methanol (CH₃OH), Ethanol (C₂H₅OH), and Butanol (C₄H₉OH). Each structure consists of a carbon atom (C) bonded to hydrogen atoms (H) and a hydroxyl group (OH). Methanol has one carbon, ethanol has two, and butanol has four.

Metanol	Etanol	Butanol	Gasolina
CH ₃ OH	C ₂ H ₅ OH	C ₄ H ₉ OH	Muitos (C)
Conteúdo Energético (BTU's / galão)			
63 K	84 K	110 K	115 K
Octanagem Motor			
91	92	94	96
Relação Ar / Combustível			
6,6	9	11 - 12	12 - 15
Pressão de Vapor (psi/100F) - Segurança			
4,6	2	0,33	4,5

Fonte: www.butanol.com (modificado)

Figura 1: Características de alguns componentes do petróleo

3.2 Degradação e Biodegradação

A degradação é um processo por meio do qual uma substância química de estrutura complexa é convertida em moléculas mais simples. Esse processo engloba principalmente a degradação biótica ou biodegradação, no qual por meio da ação de microrganismos presentes no meio ambiente, substâncias são utilizadas diretamente como substrato, fornecendo energia necessária ao crescimento e ao metabolismo desses. Os processos de degradação biótica ou biodegradação aeróbia geralmente são mais rápidos, devido ao predomínio de microrganismos aeróbios no meio, com crescimento acelerado (ZAGATTO, 2006).

Em relação aos processos de degradação de substâncias compostas por cadeias carbônicas, a biodegradação pode envolver mudanças relativamente pequenas da molécula original, como a substituição ou a modificação de um grupo funcional, ou a completa destruição do composto complexo, tendo como resultado final a sua conversão em CO₂, água e sais inorgânicos, num processo conhecido como mineralização (MANAHAN, 1992).

A biodegradação de um composto orgânico é resultante da participação de uma cadeia de microrganismos, a qual atua sinergisticamente, utilizando diferentes vias metabólicas e processos enzimáticos. Assim, um tipo de interação populacional importante, sobretudo na biodegradação de hidrocarbonetos alicíclicos, é o cometabolismo. Este processo ocorre quando um microrganismo, por meio da utilização de determinado substrato, oxida um segundo substrato que será utilizado por suas populações microbianas (MANAHAN, 1992).

Tendo em vista o processo de biodegradação, a tendência da suscetibilidade de um composto à ação dos microrganismos denomina-se biodegradabilidade, a qual é influenciada por 3 (três) principais fatores: as características físicas do composto (solubilidade em água e pressão de vapor); as características químicas (massa molecular, estrutura molecular e presença e tipos de grupos funcionais) e a disponibilidade de microrganismos (adequada presença e biomassa de microrganismos).

3.3 Avaliação da Biodegradação

Com o intuito de obter maior eficácia na biodegradação de determinadas substâncias, a utilização de melhores métodos de avaliação da biodegradabilidade são aplicados em buscas de melhores resultados de biodegradação dos compostos.

Basicamente, existem dois testes de biodegradabilidade, o teste imediato e o teste intrínseco. Normalmente, o período-limite de duração dos ensaios é de 28 dias para testes de biodegradabilidade imediata (rápida degradação da substância) enquanto que para o teste de biodegradabilidade intrínseca, o período de exposição pode se estender até 120 dias ou mais.

O período de 28 dias estabelecido constitui tempo suficiente para aclimação ou adaptação da população microbiana ao substrato. Assim, em muitos casos, a biodegradação se inicia após um determinado tempo, denominado de fase *lag* (período de adaptação do inóculo, em que o processo é lento). Nesse processo segue-se um período de degradação exponencial e, finalmente, quando o substrato é consumido ou não pode ser mais degradado, o processo cessa, atingindo um platô, que por sua vez, deve ser de no mínimo 60% ou 70%, dentro de um período de tempo específico (10 dias para a biodegradabilidade imediata e superior a 28 dias para a biodegradabilidade intrínseca) (STAATSUITGEVERIJ, 1980).

Segundo Hales et al. (apud KAISER, 1998), os testes de biodegradabilidade imediata são bastante restritivos, pois provêm oportunidades limitadas para aclimação, tendo por princípio a utilização do composto como única fonte de carbono orgânico, e exposto a um número pequeno de bactérias, sob condições aeróbias, resultando na formação de CO₂, biomassa bacteriana e produtos inorgânicos. Já os testes de biodegradabilidade intrínseca provêm condições experimentais mais favoráveis, como maior densidade microbiana e maior período de adaptação ou aclimação do inóculo, induzindo assim, junto à presença de outros nutrientes e substratos contendo carbono, o aumento da biomassa bacteriana e o co-metabolismo, e, desta maneira, conduzindo a uma degradação mais rápida ou mais completa da substância-teste.

3.3.1 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 poluente 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 do Benzeno, Tolueno, Etil-benzeno e Xileno (BTEX) e Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs) é o detector de ionização por chama (DIF) (CETESB, 2003).

3.4 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* CCM1 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 plasmídio 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.

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 verificado 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.

3.5 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*.

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*, *Rhodospiridium*, *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.

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).

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 hidrocarbonoclásticos 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 hidrocarbonoclásticas e que somente 4 % dessas bactérias foram isoladas em uma área não poluída.

3.6 Conceitos Envolvidos na Biorremediação

3.6.1 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 aceptor final de elétrons, que é reduzido (ganha elétrons). O oxigênio comumente atua como aceptor 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).

3.6.2 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.

3.6.3 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, 1993; 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).

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). O processo aeróbios de biodegradação é melhor apresentados a seguir:

3.6.4 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.

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 O₂ por grama de hidrocarboneto. Usando-se essa taxa, o O₂ 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 microbológica 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).

3.7 Considerações sobre o Método Respirométrico de Bartha e Pramer e o Teste do Indicador 2,6-Diclorofenol Indofenol (DCPIP)

Através destas técnicas experimentais, se torna possível avaliar e comparar a biodegradabilidade das diferentes concentrações das misturas de butanol com gasolina e com diesel, assim, analisando se a utilização do butanol como aditivo da gasolina e do diesel representará algum ganho em termos ambientais quando comparado com os atuais aditivos utilizados no Brasil, o etanol e o biodiesel.

3.7.1 Método respirométrico de Bartha e Pramer

O método respirométrico (BARTHA e PRAMER, 1965) (Figuras 2 e 3) é utilizado para medir a produção microbiana de CO₂, a qual indica a mineralização dos poluentes.

A quantidade de CO₂ produzido é proporcional à porcentagem do substrato biodegradado. Estudos de mineralização que envolvem medidas da produção total do CO₂ podem fornecer uma informação precisa sobre o potencial de biodegradabilidade dos hidrocarbonetos (BALBA et al., 1998). A evolução do CO₂ mede a degradação final (mineralização), estágio no qual uma substância é transformada nos produtos finais, enquanto que, por exemplo, a análise de cromatografia gasosa (CG) mede somente a degradação preliminar, na qual a substância não está transformada necessariamente em produtos finais.

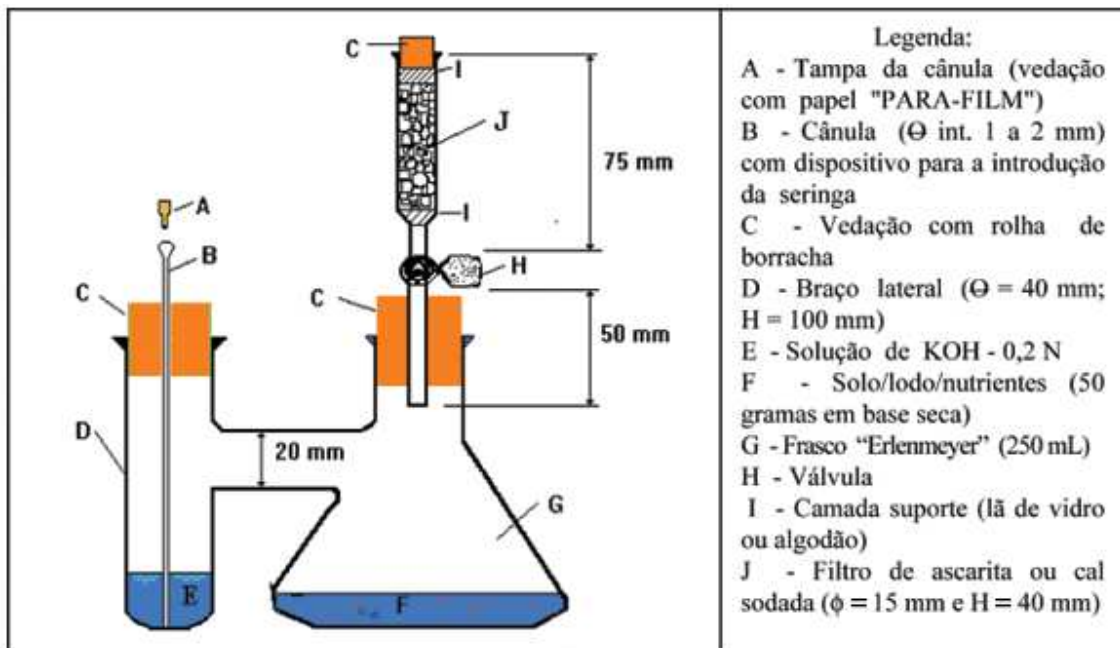


Figura 2 – Esquema de um respirômetro de Bartha e Pramer (ABNT, 1999).



Figura 3: Respirômetros de Bartha e Pramer

3.7.2 Teste do indicador 2,6-Diclorofenol Indofenol (DCPIP)

A capacidade de diferentes microrganismos em biodegradar as misturas de combustíveis foi verificada utilizando-se a técnica baseada no indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (Figura 4). 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).

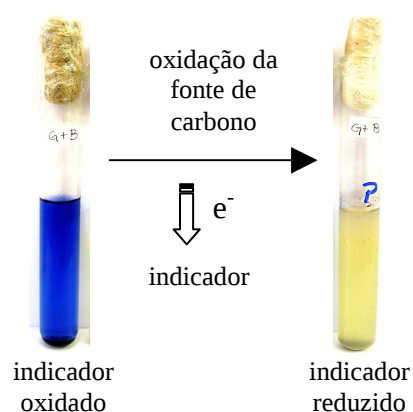


Figura 4 - Teste com o indicador 2,6-diclorofenol indofenol

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização e Amostragem do Solo e da Água

A amostra de solo utilizada nos ensaios respirométricos foi coletada por HENCKLEIN (2008) de acordo com a norma técnica L.6.245 (Solos – Coleta e preparação de amostras, Procedimentos) da CETESB (1984) na Estação Ecológica de Itirapina, localizada entre os municípios de Itirapina e Brotas, no Estado de São Paulo, Brasil (22°13'S e 47°49'W). Essa amostra de solo de cerrado foi retirada da camada superficial de um local não contaminado. Até a execução dos experimentos de biodegradação, a amostra foi armazenada a 5° C. A Tabela 1 traz algumas das características físico-químicas do solo que foi utilizado para a realização dos experimentos respirométricos 1 e 3. As análises do solo foram executadas de acordo com a metodologia proposta por Embrapa (1997). Os valores de concentrações dos metais pesados não estão acima dos níveis mais restritos determinados pela CETESB (Agência Ambiental de São Paulo) e pela lista Holandesa (Cetesb, 2005).

As amostras de água foram coletadas no Rio Atibaia localizado em Paulínia (SP/Brasil) (22°44'25.3"S/47°07'35.2"W). A amostragem composta foi obtida na superfície do rio ao longo de uma seção perpendicular ao sentido do fluxo. Próximo à localização da amostragem, uma refinaria de petróleo (Replan/Petrobras) e estradas representam fontes potenciais de contaminação. A Tabela 2 mostra algumas características da água que foi utilizada na realização do experimento respirométrico 2 (água coletada e início do experimento em 17/07/2008) enquanto a Tabela 3 apresenta algumas características da água para a realização do experimento respirométrico 4 (água coletada e início do experimento em 27/11/2008). A obtenção das características das amostras de água foi determinada por procedimentos descritos em APHA (1998).

Tabela 1 – Características da amostra do solo (Experimentos 1 e 3)

							(mmolc/dm3)				
pH (CaCl ₂)		4,0			K		0,6				
Matéria orgânica (g/dm ³)		8,0			Ca		1,0				
Pres (mg/dm ³)		8,0			Mg		1,0				
Umidade do solo (%)		7,4			SB ^a		2,7				
					Al		1,0				
					CTC ^b		27,7				
Granulometria (%)		areia			silte		argila				
							86,0				
					4,1		9,9				
micronutrientes (ppm)							Metais pesados (ppm)				
S	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	B	Ba	Cd	Cr	Ni	Pb
10	3,0	25	0,6	0,9	0,9	0,2	14,4	<0,01	11,9	<0,01	<0,01

^a soma de bases; ^b capacidade de troca catiônica

Tabela 2 – Características da amostra da água (Experimento 2)

pH	7,45	nitrato (mg/L)	4,35	bactéria (CFU/mL)	103
DBO (mg/L)	9,4	amônia (mg/L)	3,50	fungos filamentosos	10
DQO (mg/L)	33,1	cloretos (mg/L)	20,65	(CFU/mL)	
OD (mg/L)	2,7	sedimentação	0,7	leveduras (CFU/mL)	30
condutividade (μS/cm)	380	sólidos voláteis (mg/L)	0,06		
acidez (mg/L)	9,70	sólidos fixos (mg/L)	0,27		
alcalinidade HCO ₃ (mg/L)	53,6	sólidos solúveis e em			
toxicidade (EC50) ^a	- ^b	suspensão (mg/L)	0,33		
nitrito (mg/L)	0,26				

^a *Daphnia similis*; ^b não detectado

Tabela 3 – Características da amostra da água (Experimento 4)

pH	7,78	nitrato (mg/L)	0,0	bactéria (CFU/mL)	54,50
DBO (mg/L)	9,40	amônia (mg/L)	0,71	fungos filamentosos	11,8
DQO (mg/L)	11,9	cloretos (mg/L)	10,81	(CFU/mL)	
OD (mg/L)	1,41	sedimentação	<0,1	leveduras (CFU/mL)	55,0
condutividade (μS/cm)	140,9	sólidos voláteis (mg/L)	0,056		
acidez (mg/L) CaCO ₃	3,88	sólidos fixos (mg/L)	0,313		
alcalinidade HCO ₃ (mg/L)	21,42	sólidos solúveis e em			
toxicidade (EC50) ^a	- ^b	suspensão (mg/L)	0,369		
nitrito (mg/L)	0,0				

^a *Daphnia similis*; ^b não detectado

4.2 Experimentos Respirométricos

A Tabela 4 resume os experimentos respirométricos de biodegradação simulando contaminações do solo e da água.

Tabela 4 – Protocolo dos experimentos respirométricos

Mistura butanol/gasolina (Experimento 1)	Mistura butanol/gasolina (Experimento 2)
Controle (sem adição de contaminantes)	Controle (sem adição de contaminantes)
Solo + etanol (E100)	Água + etanol (E100)
Solo + butanol (But100)	Água + butanol (But100)
Solo + gasolina com etanol (20% v/v) (E20)	Água + gasolina com etanol (20% v/v) (E20)
Solo + gasolina com butanol (20% v/v) (But20)	Água + gasolina com butanol (20% v/v) (But20)
Solo + gasolina (100%) (But0)	Água + gasolina (100%) (But0)
Mistura butanol/diesel (Experimento 3)	Mistura butanol/diesel (Experimento 4)
Controle (sem adição de contaminantes)	Controle (sem adição de contaminantes)
Solo + biodiesel (BD100)	Água + biodiesel (BD100)
Solo + butanol (But100)	Água + butanol (But100)
Solo + diesel com biodiesel (20%) (BD20)	Água + diesel com biodiesel (20%) (BD20)
Solo + diesel com butanol (20%) (But20)	Água + diesel com butanol (20%) (But20)
Solo + diesel (100%) (But0)	Água + diesel (100%) (But0)

Os experimentos de biodegradação foram realizados em frascos de Bartha (250 mL) usados para medir a produção microbiana de CO₂ (BARTHA & PRAMER, 1965; MARIANO et al., 2007). Para cada condição experimental, os frascos de Bartha foram preparados em triplicatas (50 g do solo ou 50 mL da água) e incubados a 27 °C no escuro. A quantidade de combustível adicionado no solo e na água foram, respectivamente, 50 mL/Kg de solo e 20 mL/L de água (2 % (v/v)). O CO₂ produzido foi capturado em uma solução de 10,0 mL de KOH (0,2 N), localizada no braço lateral do frasco. Esta solução foi retirada periodicamente por uma seringa, e a quantidade de dióxido de carbono absorvida foi então medida titulando-se o KOH residual (após a adição da solução do cloreto do bário (1 mL; 1,0 N) usado para precipitar os íons carbonatos) com uma solução padrão de HCl (0,1 N). Durante a realização do procedimento para medir a produção de CO₂ provinda da biodegradação das substâncias dentro dos frascos respirométricos, foi necessário aerar o meio durante 1 minuto através de filtros de ascarita.

Para quantificar a produção de CO₂ gerado no experimento respirométrico, foi utilizado a equação (1).

$$\text{CO}_2 \text{ gerado } (\mu\text{mol}) = (V_B - V_A) \cdot 50 \cdot f_{\text{HCl}} \quad (1)$$

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.

4.3 Teste de Biodegradabilidade – Indicador DCPIP

A biodegradabilidade das misturas de butanol/gasolina e etanol/gasolina foi também verificada com a técnica baseada no indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) (HANSON et al., 1993).

4.3.1 Microrganismos

Para a realização do teste de biodegradabilidade com o indicador redox DCPIP, a potencialidade de quatro inóculos para biodegradar as misturas consideradas nos experimentos respirométricos 1 e 2 foram testadas:

- *Pseudomonas aeruginosa* LBI (BENINCASA et al., 2002);
- *Candida viswanathii* (isolada do efluente de petróleo da Replan / Petrobras);
- Consórcio 1 (obtido do solo);
- Consórcio 2 (obtido da água do rio Atibaia).

4.3.2 Preparo dos inóculos e do teste com o indicador DCPIP

Os inóculos com *Pseudomonas aeruginosa* LBI e *Candida viswanathii* foram preparados a partir de células transferidas de tubos de armazenamento e espalhadas na superfície de placas de Petri contendo, respectivamente, meios PCA e Sabouraud. As placas de Petri foram incubadas, respectivamente, à 35°C e 28°C durante 24 horas. Para preparar o consórcio 1, 10 g de solo foi adicionado ao frasco Erlenmeyer (125 mL) com 50 mL de solução salina estéril e mantido sob a agitação durante 1 minuto. Após este período, a salina foi espalhada na superfície da placa de Petri contendo meio PCA. A placa de Petri foi incubada a 35 °C durante 24 horas e então as células foram recuperadas usando solução salina estéril. No caso do consórcio 2, 1 mL da água do rio foi espalhada diretamente na superfície do meio PCA.

Os inóculos (0,2 mL, concentração não determinada) foram adicionadas aos tubos de ensaio (duplicatas) que continham o meio Bushnell-Hass (BH) estéril (10 mL) e 1 % (v/v) das misturas. A concentração de DCPIP foi 0,14 mg/mL. Os tubos de ensaio foram mantidos sob agitação (60 rpm) a 27,0±1,0 °C. O meio BH consiste de, g/L: MgSO₄: 0,2; CaCl₂: 0,02; KH₂PO₄: 1,0; K₂HPO₄: 1,0; NH₄NO₃: 1,0; FeCl₃: 0,05 (DIFCO, 1984).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Mistura Butanol/Gasolina em Comparação com a Mistura Etanol/Gasolina

5.1.1 Experimentos respirométricos de Bartha e Pramer

Os experimentos respirométricos 1 e 2 foram realizados com o propósito de analisar a biodegradabilidade das misturas de butanol/gasolina e etanol/gasolina (misturas de 20%) no solo e na água, respectivamente. Esta porcentagem foi escolhida porque no Brasil, desde os anos setenta, a gasolina contém na sua formulação 20 a 25% de etanol.

A respeito da contaminação do solo (Figura 5), a fase *lag* para o butanol foi de 54 dias enquanto a biodegradação do etanol começou depois do 12º dia. Similarmente, o início da biodegradação da mistura de butanol/gasolina teve um atraso de uma semana em relação à mistura de etanol/gasolina. Na água (Figura 6), a biodegradação das misturas prontamente começou no início do experimento, e novamente houve para o butanol uma fase *lag* consideravelmente mais longa (92 dias) quando comparada com a fase *lag* para o etanol (início).

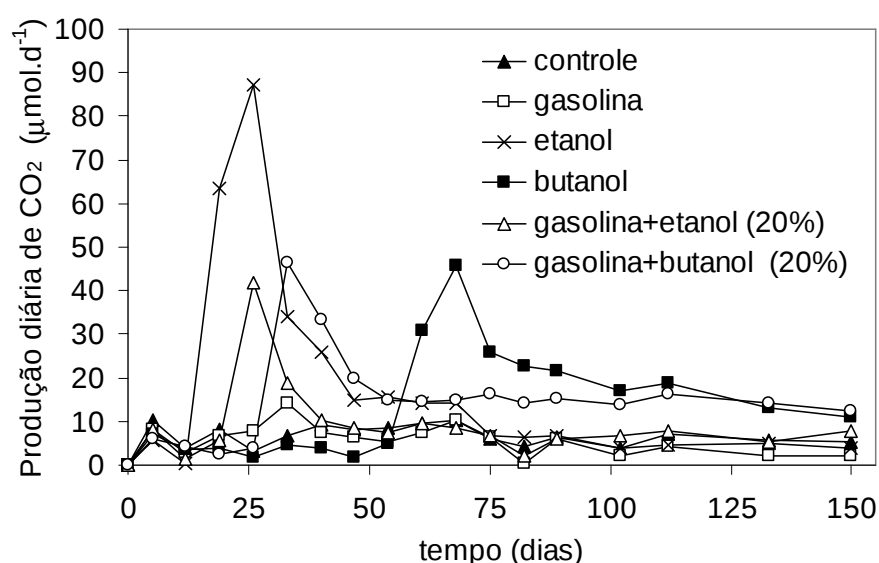


Figura 5 – Produção diária de CO₂ durante incubação (150 dias) do experimento respirométrico 1 (contaminação do solo).

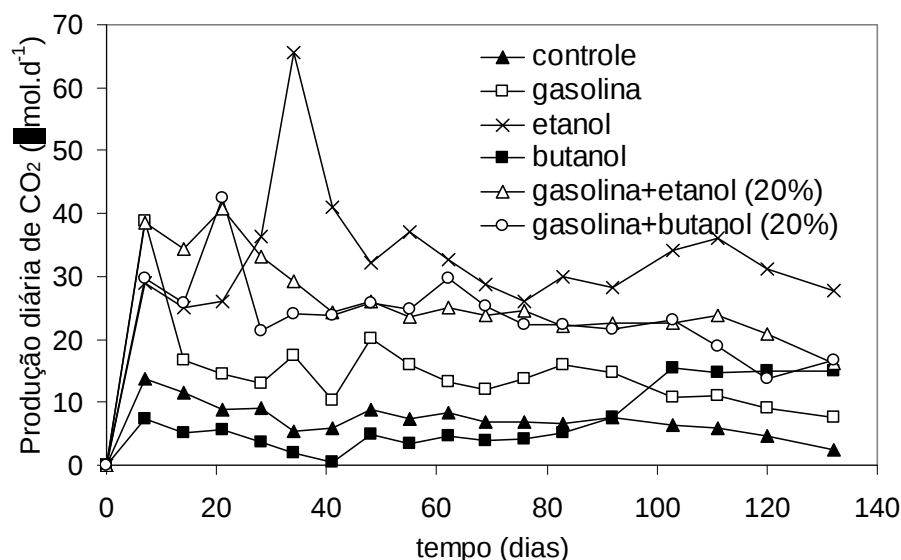


Figura 6 – Produção diária de CO₂ durante incubação (132 dias) do experimento respirométrico 2 (contaminação da água).

O etanol mostrou ter uma taxa de biodegradação mais rápida em relação ao butanol, particularmente em água, situação na qual o contato entre os microrganismos e os álcoois é melhorado devido à solubilização destes componentes em água. Uma explicação para as diferentes taxas de biodegradação entre o etanol e butanol pode ser dada pelo coeficiente de partição octanol/água dos álcoois ($\log K_{ow}$), uma vez que eles foram adicionados na mesma concentração e tem estruturas moleculares similares. Contudo, muitos solventes orgânicos, como o butanol, são tóxicos para os microrganismos devido aos seus efeitos devastadores sobre as membranas celulares. A correlação entre a toxicidade e o caráter hidrofóbico do solvente é expressa pelo $\log K_{ow}$, que é coeficiente de partição entre a água e o octanol (GARCÍA-RIVERO et al., 2007). Solventes com um $\log K_{ow}$ entre 1 e 5 são considerados altamente tóxicos para as membranas celulares (SIKKEMA et al., 1995). O butanol tem um valor de $\log K_{ow}$ de 0,88, inferior ao da escala citada. No entanto, os efeitos de solventes também são conhecidos por depender da concentração na membrana bacteriana (Isken et al., 1999). O $\log K_{ow}$ do etanol é mais baixo do que do butanol, respectivamente, -0,32 (Jacobi et al., 1996) e 0,88 (GARCÍA-RIVERO et al., 2007), o qual resulta em um caráter hidrofóbico mais elevado deste último e consequentemente uma toxicidade mais elevada para as células (SIKKEMA et al., 1995).

Outros estudos experimentais indicam que o butanol é prontamente biodegradado em solo (FAIRBANKS et al., 1985; USEPA 1989). Entretanto as concentrações de butanol nestes experimentos (3 ppm e 500 ppm) foram consideravelmente menores do que a concentração no

estudo atual (20.000 ppm). A concentração tem um forte efeito na biodegradação do butanol. Por exemplo, a taxa de crescimento máximo específico da *Enterobacter sp.* VKGH12 em butanol variou significativamente de $0,27h^{-1}$ quando à 0.4% (v/v) para $0,05h^{-1}$ quando à 1.2% (v/v) (VEERANAGOUDA et al., 2006).

Com o propósito de avaliar a biodegradabilidade das misturas, a metodologia de Pasqualino et al. (2006), baseada na combinação linear da produção de CO_2 acumulado dos combustíveis puros, foi empregada. De acordo com esta metodologia, as quantidades totais de CO_2 (valor acumulado) produzidas pelas misturas (E20 e But20) são comparadas com as respectivas combinações lineares (LC) (Equação 2) das quantidades totais de CO_2 produzidas pelos compostos puros (E0 e But100).

$$LC = G \cdot (CO_2)_{But0} + But \cdot (CO_2)_{But100} \quad (2)$$

Onde:

G é a % de gasolina na mistura;

But a % de butanol na mistura;

$(CO_2)_{But0}$ a quantidade total de CO_2 (valor acumulado) produzido pelo $But0$;

$(CO_2)_{But100}$ a quantidade total de CO_2 (valor acumulado) produzido pelo $But100$.

A combinação linear representa a situação esperada nos casos em que o biodegradação de cada composto acontece independentemente. As Figuras 7 e 8 mostram a produção de CO_2 acumulada dos experimentos respirométricos 1 e 2, respectivamente, bem como a combinação linear dos combustíveis puros. A adição de álcoois resultou em efeitos sinérgicos positivos, sendo que para todos os casos os dados experimentais estão acima das respectivas combinações lineares.

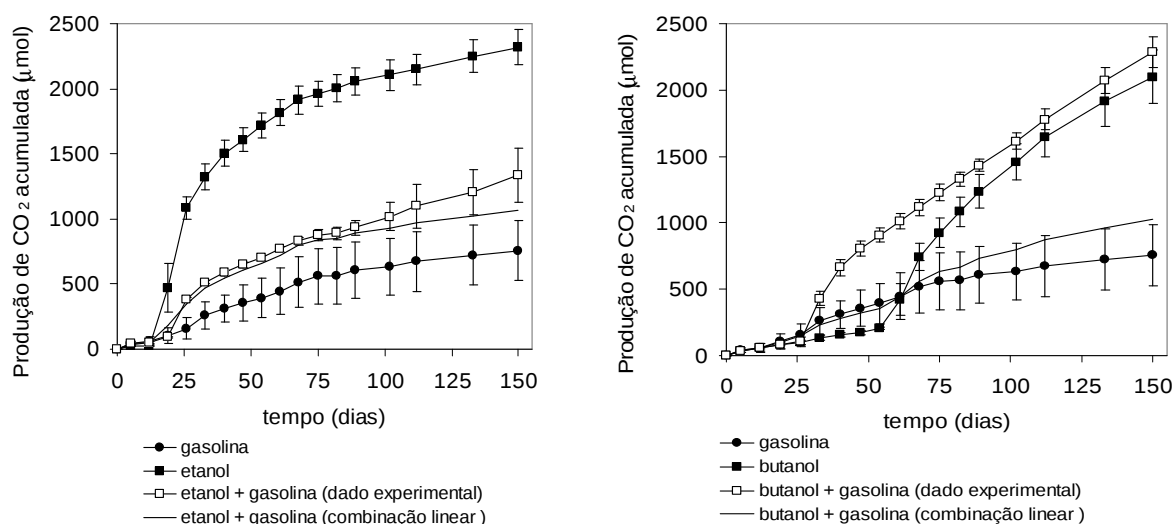


Figura 7 – Quantidade total acumulada de CO_2 produzida no experimento respirométrico 1 (contaminação do solo) durante a incubação (150 dias).

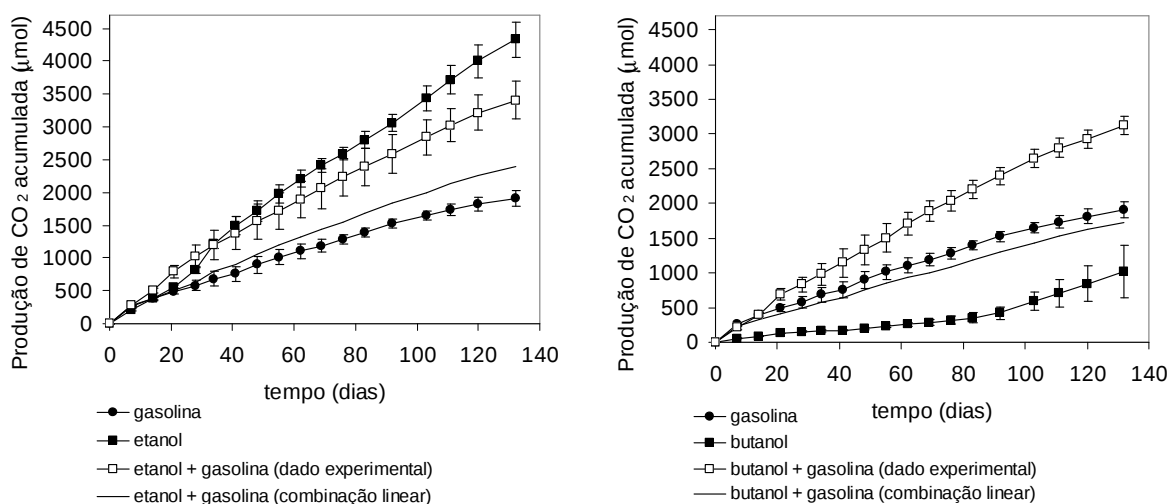


Figure 8 – Quantidade total acumulada de CO_2 produzida no experimento respirométrico 2 (contaminação da água) durante a incubação (132 dias).

Em solo, enquanto a produção de CO_2 nos tratamentos com as misturas butanol/gasolina e butanol são os mesmos, a produção de CO_2 para o etanol é 73% mais alta em relação à mistura de etanol/gasolina. Desta forma, a substituição de 80% de butanol pela gasolina, a qual é menos biodegradável, não alterou a taxa de biodegradação. Isto pode sugerir que o efeito positivo do butanol na biodegradação da gasolina foi superior ao observado com a adição do etanol. Contudo, somente a determinação da concentração de hidrocarbonetos ou o emprego de carbonos marcados poderiam quantificar esse efeito.

Dois mecanismos simultâneos podem ser responsáveis pelo efeito sinérgico entre o butanol e a gasolina. Primeiramente, as baixas quantidades de butanol nas misturas (presumidamente prontamente degradável e menos tóxico para estas concentrações) poderiam ter melhorado a biodegradação da gasolina por meios de cometabolismo. Este é um termo usado para descrever o processo em que microrganismos usam um segundo substrato prontamente degradável como fonte de carbono (energia) (aqui o butanol) para degradar o primeiro substrato (gasolina) o qual de outra maneira é raramente atacado pelos microrganismos quando esta é a única fonte de carbono. Em segundo lugar, como um solvente, o butanol pode melhorar a biodisponibilidade e solubilidade dos hidrocarbonetos (GARCÍA-RIVERO et al., 2007). A biodisponibilidade é um passo limitante na biodegradação destes compostos hidrofóbicos, cuja sorção ao solo os protege do ataque microbiano (CARMICHAEL et al., 1997). Além disso, estudos têm mostrado que o consumo de hidrocarbonetos ocorre somente na fase líquida (GHOSHAL et al., 1996). Com isso o butanol poderia ter aumentado a taxa de desorção dos hidrocarbonetos da gasolina da fase sólida e/ou diminuído a solubilidade na fase líquida, o que por sua vez permitiu o aumento da biodegradação dos hidrocarbonetos. Devido a estas propriedades, o butanol tem sido considerado para ser aplicado como solvente na lavagem *ex-situ* de solos contaminados com hidrocarbonetos (GARCÍA-RIVERO et al., 2007) e em estudos sobre procedimentos de extração com solventes para estimar a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) (BREEDVELD e KARLSEN, 2000; LISTE e ALEXANDER, 2002).

Em água, a quantidade de álcool solubilizado é menor para as misturas. Neste caso, isto teve um efeito positivo significativo para o butanol, o qual mostrou ser tóxico na concentração de 20.000 ppm para But100. Com menor quantidade de butanol em água (4.000 ppm para But20), a toxicidade diminuiu e consequentemente a produção de CO₂ para a mistura aumentou.

A solubilização do álcool presente na mistura afetou significativamente a biodegradação dos hidrocarbonetos. A solubilização pode ter aumentado a miscibilidade dos hidrocarbonetos mono-aromáticos (BTEX) em água, permitindo um efeito conhecido como co-solvência, o qual foi relatado para o etanol (CORSEUIL et al., 2004) e o metanol (POULSEN et al., 1992). A solubilização dos hidrocarbonetos aumenta a biodisponibilidade, contudo, ao mesmo tempo, a extensão da contaminação também aumenta.

Nos casos das contaminações de águas subterrâneas, estudos demonstraram que o etanol pode atrasar a biodegradação dos contaminantes do petróleo, especialmente BTEX, pela degradação preferencial do etanol, causando o consumo de nutrientes e aceptores de elétrons, e mudando a população microbiana em favor da degradação do etanol (POWERS et

al., 2001; CORSEUIL et al., 2004; NIVEN, 2005). Apesar de não ser analisado no trabalho presente, é provável que o butanol exerça efeitos similares.

5.1.2 Teste de biodegradabilidade com o indicador redox DCPIP

Os resultados do experimento com o indicador redox (Tabela 5) para a mistura de butanol/gasolina em comparação a mistura etanol/gasolina, mostram que a concentração inicial de 1% v/v da gasolina pura (metade da concentração no experimento respirométrico com água) não pôde ser biodegradada pelos inóculos testados. Mesmo *Pseudomonas aeruginosa* LBI, um microrganismo conhecido pela sua habilidade em degradar hidrocarbonetos do petróleo (PIRÔLLO et al., 2008), não obteve sucesso. A biodegradação do etanol para a maioria dos casos começou mais rapidamente do que o butanol. A exceção foi *Candida viswanathii*, a qual também não foi capaz de biodegradar a mistura etanol/gasolina. Portanto, como verificado no experimento respirométrico, foi encontrada a seguinte ordem de biodegradabilidade: etanol > butanol > gasolina.

Tabela 5 – Tempo (em horas) para a descoloração do indicador DCPIP (1º Experimento)

microrganismo	gasolina	butanol	etanol	gasolina+butanol (20%)	gasolina +etanol (20%)
consórcio 1 ^a	- ^c	97	40	63	87
consórcio 2 ^b	-	125	40	63	47
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	-	-	125	54	94
<i>Candida viswanathii</i>	-	88	-	54	-

^a consórcio do solo utilizado no experimento respirométrico, ^b consórcio da água do Rio Atibaia, ^c não descoloriu durante o experimento (208 h).

Obs: durante o teste, não foi observado a descoloração dos controles do substrato (sem inóculo) e do inóculo (sem combustível).

Em relação às misturas, o consórcio 1 do solo, *Pseudomonas aeruginosa* LBI, e *Candida viswanathii* apresentaram melhores resultados na mistura butanol/gasolina. A exceção foi o inóculo 2 da água do rio. Deste modo, provavelmente devido ao efeito sinérgico resultante da mistura dos combustíveis, alguns microrganismos que mostraram ser mais capazes de biodegradarem o etanol, preferiram as misturas butanol/gasolina.

5.2 Mistura Butanol/Diesel em Comparação com a Mistura Biodiesel/Diesel

5.2.1 Experimentos respirométricos de Bartha e Pramer

Os experimentos respirométricos 3 e 4 (Tabela 4) foram realizados com o propósito de analisar a biodegradabilidade das misturas de butanol/diesel e biodiesel/diesel (misturas de 20%) no solo e na água, respectivamente. Atualmente apenas 2% de biodiesel está inserido no diesel comercializado no Brasil, sendo previsto o emprego de 5% até o ano de 2013.

A respeito da contaminação do solo (Figura 9), como o butanol (But100) teve uma degradação baixa, o aumento na concentração de butanol (20% v/v) na mistura com diesel resultou na redução da produção de CO_2 em aproximadamente 28.5 % em relação ao But0. A adição de butanol também afetou a fase *lag*. Enquanto para o But0 a biodegradação começou desde o início do experimento, a fase *lag* para o But100 foi de 61 dias. Similar ao butanol (But100), a mistura de butanol/diesel teve um atraso quanto a biodegradação, começando no 26° dia, enquanto a mistura biodiesel/diesel foi biodegradada desde o início do experimento. Considerando-se o tempo para o início da biodegradação, foi encontrada a seguinte ordem de biodegradabilidade em solo: biodiesel = diesel > butanol, assim como as suas misturas: biodiesel/diesel > butanol/diesel.

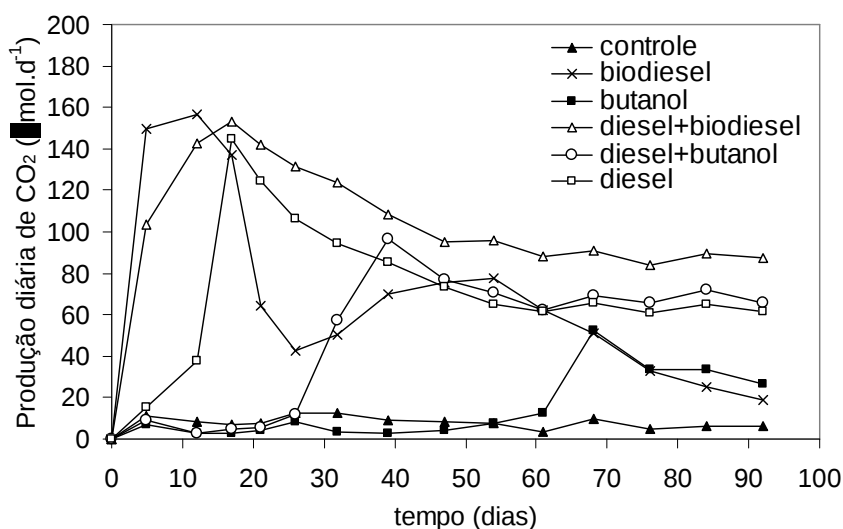


Figura 9 – Produção diária de CO_2 durante incubação (92 dias) do experimento respirométrico 3 (contaminação do solo).

Aplicando-se a análise de variância (Anova) aos dados de produção acumulada de CO_2 do experimento respirométrico 3 (Figura 10), foi possível obter a seguinte ordem de biodegradabilidade: diesel = biodiesel > butanol. Assim como analisado para os combustíveis puros, a seguinte ordem de biodegradabilidade das misturas em relação à quantidade total de

CO₂ acumulada foi: biodiesel/diesel (9778,9 μmol de CO₂) > butanol/diesel (4847,0 μmol de CO₂).

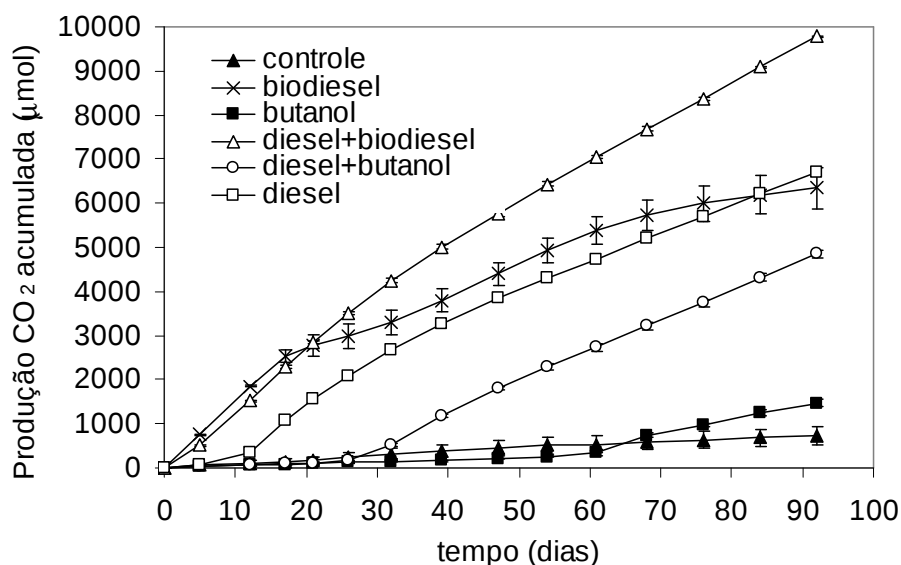


Figura 10 – Quantidade total acumulada de CO₂ produzido no experimento respirométrico 3 (contaminação do solo) durante a incubação (92 dias).

Na água (Figura 11), a biodegradação da mistura butanol/diesel começou no início do experimento, sendo que para a mistura biodiesel/diesel a biodegradação foi iniciada a partir do 7º dia. Considerando-se o tempo para o início da biodegradação, foi possível encontrar a seguinte ordem de biodegradabilidade: butanol > biodiesel = diesel, assim como as suas misturas: butanol/diesel > biodiesel/diesel.

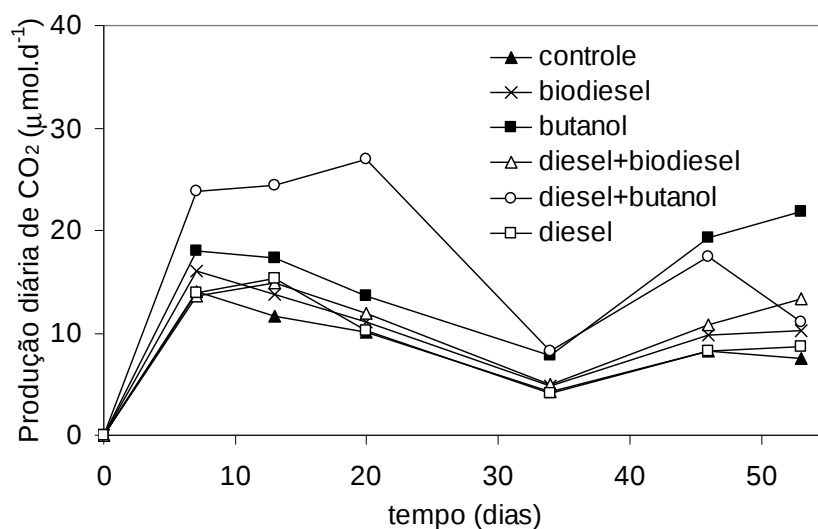


Figura 11 – Produção diária de CO₂ durante incubação (53 dias) do experimento respirométrico 4 (contaminação da água).

Aplicando-se a análise de variância (Anova) aos dados de produção acumulada de CO₂ do experimento respirométrico 4 (Figura 12), foi possível obter a seguinte ordem de biodegradabilidade: butanol > biodiesel = diesel. Assim como analisado para os combustíveis puros, a seguinte ordem de biodegradabilidade das misturas em relação à quantidade total de CO₂ acumulado foi: butanol/diesel (903,3 μmol de CO₂) > biodiesel/diesel (560,1 μmol de CO₂).

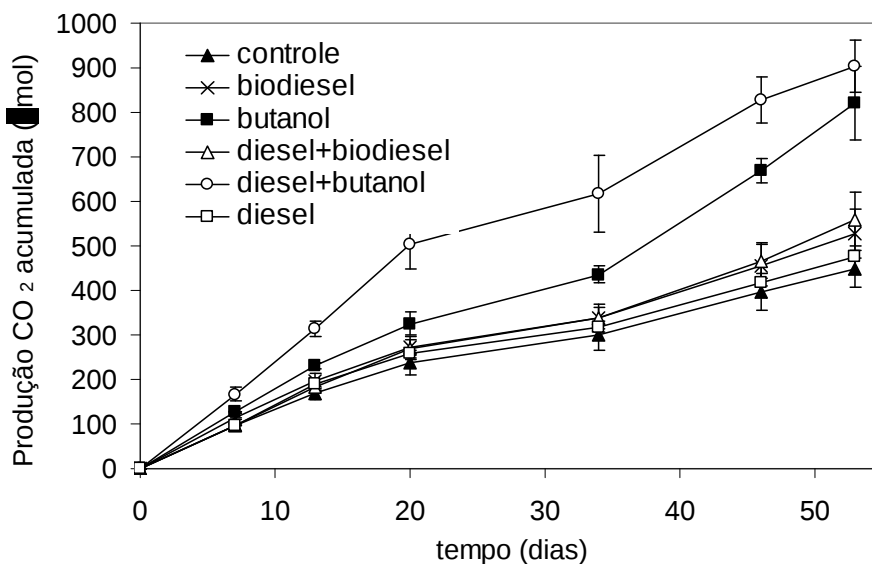


Figura 12 – Quantidade total acumulada de CO₂ produzido no experimento respirométrico 4 (contaminação da água) durante a incubação (53 dias).

Para discutir e analisar os resultados obtidos nos experimentos respirométricos 3 e 4 é importante considerar dois fatores: a concentração inicial de butanol adicionada aos meios que foram estudados (solo e água) e a solubilidade dos combustíveis em água. Em relação aos experimentos com a mistura butanol/diesel, houve diferença nos resultados obtidos no experimento 3 (solo) quando comparados ao experimento 4 (água).

Primeiramente, analisando os dados obtidos nos experimentos 1 e 2, enquanto a gasolina teve biodegradação inferior em relação ao butanol (a produção de CO₂ foi 39,2% menor), no experimento 3 o óleo diesel foi biodegradado mais do que o butanol (a produção de CO₂ foi 7,3 vezes maior). Assim, a ordem de biodegradabilidade observada para os componentes puros foi a seguinte: diesel>butanol>gasolina. Com isso, o efeito de biodegradabilidade quando o butanol estava presente foi positivo na gasolina e negativo no óleo diesel.

A solubilidade e as concentrações dos compostos nas misturas de butanol/diesel foram fatores determinantes para uma melhor biodegradação no experimento 4 em relação ao experimento 3. Em relação a solubilidade, na água, o butanol puro (B100) mostrou ter uma

taxa de biodegradação mais rápida em relação ao biodiesel e ao diesel (Figura 10) no qual o contato entre os microrganismos e o álcool foi melhorado devido à solubilização deste componente em água. A solubilidade pode ter sido fator relevante quanto à biodegradabilidade da mistura devido à maior solubilização do butanol no meio líquido, quando comparado com o biodiesel. Devido ao biodiesel e o diesel serem insolúveis em água, a superfície de contato destes com os microrganismos é menor, dificultando a biodegradação desses compostos.

Em relação às misturas, uma das hipóteses na qual butanol/diesel em água obteve melhor biodegradação em relação ao biodiesel/diesel, pode ser explicada devido a menor concentração de butanol em água (0,08 % v/v) possibilitando dessa maneira a bioassimilação e posteriormente a biodegradação pelos microrganismos, como observado no experimento 4 e no teste de biodegradabilidade com o indicador DCPIP. Além disso, a adição de butanol pode ter permitido a co-solvência do diesel, aumentando assim a disponibilidade deste aos microrganismos. Consequentemente, este efeito pode ter favorecido a biodegradação do diesel.

Sendo assim, a principal diferença a ser considerada na biodegradabilidade da mistura butanol/diesel em relação ao biodiesel/diesel na água foi o fator solubilidade.

5.2.2 Teste de biodegradabilidade com o indicador redox DCPIP

Os resultados do experimento com o indicador redox (Tabela 6) mostram que a concentração inicial de 1% v/v do butanol puro (mais que o dobro da concentração inicial de 0,4% v/v no experimento respirométrico 4 com água) não pode ser biodegradada pelos inóculos testados. Mesmo *Pseudomonas aeruginosa* LBI, um microrganismo conhecido pela sua habilidade em degradar hidrocarbonetos do petróleo (PIRÔLLO et al., 2008), não obteve sucesso.

A biodegradação do biodiesel para todos os casos começou mais rapidamente do que o butanol, o qual não foi biodegradado por nenhum dos inóculos testados. Porém, com a adição de butanol em concentrações menores na mistura butanol/diesel (0,2% v/v de butanol) foi observado uma biodegradação mais rápida em relação à mistura de biodiesel/diesel (0,2% v/v de biodiesel) assim como analisado no experimento respirométrico 4 (Figura 10).

Em relação às misturas, o consórcio 1 do solo, *Pseudomonas aeruginosa* LBI, e *Candida viswanathii* apresentaram melhores resultados na biodegradação da mistura butanol/diesel em relação a mistura biodiesel/diesel, como também no experimento respirométrico 4 (Figura 10). A exceção foi o inóculo 2 da água do rio que não biodegradou as misturas.

Tabela 6 – Tempo (em horas) para a descoloração do indicador DCPIP (2º Experimento)

microrganismo	diesel	butanol	biodiesel	diesel+butanol (20%)	diesel+biodiesel (20%)
consórcio 1 ^a	220	-	37	91	211
consórcio 2 ^b	- ^c	-	30	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	192	-	87	73	142
<i>Candida viswanathii</i>	26	-	22	20	26

^a consórcio do solo utilizado no experimento respirométrico, ^b consórcio da água do Rio Atibaia, ^c não descoloriu durante o experimento (220 h).

Obs: durante o teste, não foi observado a descoloração dos controles do substrato (sem inóculo) e do inóculo (sem combustível).

6. CONCLUSÕES

Em relação aos experimentos 1 e 2 (butanol/gasolina) concluiu-se que, a partir de experimentos laboratoriais, o etanol mostrou ter uma taxa de biodegradação mais rápida em relação ao butanol, particularmente em água, e a seguinte ordem de biodegradabilidade foi encontrada: etanol > butanol > gasolina. A adição de álcoois na gasolina resultou em efeitos sinérgicos positivos na biodegradação dos combustíveis em ambos os meios, solo e água e, além disso, os resultados sugerem que, em solo, o butanol promoveu uma melhor biodegradação da gasolina que o etanol.

Nos experimentos 3 e 4 (butanol/diesel), concluiu-se que em relação à adição de butanol ao diesel, a concentração e a solubilidade foram fatores importantes para avaliar a biodegradação da mistura quando comparada com um outro combustível qualquer. Assim, na água, resultados indicam que a adição de butanol, em concentração que não se mostrou tóxica aos microrganismos, ao diesel pode ter permitido uma maior solubilidade da mistura, possibilitando melhor biodegradação quando comparado com o aditivo empregado atualmente, o biodiesel.

Finalizando, enquanto a gasolina teve menor biodegradação em relação ao butanol (experimentos 1 e 2), no experimento 3 o óleo diesel foi biodegradado mais do que o butanol. Assim, a ordem de biodegradabilidade observada para os componentes puros foi a seguinte: diesel>butanol>gasolina. Com isso, o efeito de biodegradabilidade quando o butanol estava presente foi positivo na gasolina e negativo no óleo diesel (em solo).

7. RECOMENDAÇÕES

Futuras pesquisas são necessárias para determinar: a taxa de biodegradação de constituintes específicos da gasolina e do diesel, principalmente os mono-aromáticos BTEX e poli-aromáticos, sob condições aeróbias e de outros aceptores de elétrons; o efeito do butanol nas estruturas das comunidades microbianas; o efeito de co-solvência do butanol na solubilidade aquosa dos hidrocarbonetos mono-aromáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HADHRAMI, M. N.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; FISHER, P. J. *Bacterial survival and nalkane degradation within Omani crude oil and a mousse*. **Marine Pollution Bulletin**, 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.
- APHA (American Public Health Association). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20. ed. **Washington: American Public Health Association, AWWA, WPCF**, p. 1569, 1998.
- ATLAS, R. M. *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective*. **Microbiological Reviews**, v. 45, n.1, p.180-208, 1981.
- 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 Science**, v. 100(1), p. 68-70, 1965.
- BAZYLINSKI, D. A.; WIRSEN, C. O.; JANNASCH, H. W. *Microbial utilization of naturally occurring hydrocarbons at the Guaymas Basin hydrothermal vent site*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2832-2836, 1989.
- 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.

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.

BITTON, G.; GERBA, C. P. **Ground water. Pollution Microbiology**. John Wiley & Sons. N.Y. 377 p., 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.; GOMEZ, C. A.; BECKER, M. T. *Geochemical indicators of intrinsic bioremediation*. **Ground Water**, v. 33(2), p. 180-189, 1995.

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

BREEDVELD, G. D.; KARLSEN, D. A. *Estimating the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons for bioremediation of creosote contaminated soils*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, 2000. 255-261 p.

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.

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

BUTYLFUEL, LLC. Coordenado por David E. Ramey. Blacklick, OH, 2000. Disponível em: <<http://www.butanol.com>>. Acesso em: 17 dez. 2009.

CARMICHAEL, L. M.; CHRISTMAN, R. F.; PFAENER, F. K. *Desorption and mineralization kinetics of phenanthrene and chrysene in contaminated soils*. **Environmental Science & Technology**, v. 31, p. 126-132, 1997.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. *Norma Técnica L. 6.245 – Coleta e preparação de amostras*. Procedimentos, SP. 1984.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. *Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo*. Relatório técnico, 2005.

_____. 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.

CHAPELLE, F. H. **Ground Water Microbiology & Geochemistry**. N.Y. John Wiley & Sons Inc. 424 p., 1993.

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*. **Water Resources Research**, v. 28, p. 1833-1847, 1992.

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

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(2), p. 150-155, 1997.

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

CORSEUIL, H. X.; HUNT, C. S. *The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation*. **Water Research**, v. 32 (7), p. 2065-2072, 1998.

CORSEUIL, H. X.; KAIPPER, B. I., FERNANDES, M. *Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol*. **Water Research**, v. 38(6), p. 1449-56, 2004.

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.

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.

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.

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*. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 62(5), p. 526-536, 1999.

DIFCO. *Difco Manual*, 10 ed. 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.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. *Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 220–227, 2007.

FAIRBANKS, B. C.; SCHMIDT, N. E.; O'CONNOR, G. A. *Butanol degradation and volatilization in soils amended with spent acid or sulfuric acid*. **Journal of Environmental Quality**, v. 14, p. 83-86, 1985.

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

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.

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.

GARCÍA-RIVERO, M.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. *Organic solvents improve hydrocarbon desorption and biodegradation in highly contaminated weathered soil*. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 6, p. 389-395, 2007.

GHOSHAL, S.; RAMASWAMI, A.; LUTHY, R. *Biodegradation of naphthalene from coal tar and heptamethylnonane in mixed batch systems*. **Environmental Science & Technology**, v. 30, p. 1282-1291, 1996.

GRADY, C. P. L. *Biodegradation: its measurement and microbiological basis*. **Biotechnology & Bioengineering**, 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.

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

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

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.

HEINZE, U.; FRIEDRICH, C. G. *Respiratory activity of biofilms: measurement and its significance for the elimination of n-butanol from waste gas*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, P. 411-416, 1997.

HENCKLEIN, F. A. *Estabilização de "Landfarming" de refianria de petróleo, mediante metabolismo microbiano, e aplicabilidade em solos pré-desertificados*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Unesp/Campus de Rio Claro-Instituto de Biociências, 2008.

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.

ISKEN, S.; DERKS, A.; WOLFFS, P.; BONT, J. *Effect of organic solvents on the yield of solv3-ent-tolerant Pseudomonas putida S12*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 2631-2635, 1999.

JACOBI, H.; LEIER, G.; WITTEA, I. *Correlation of the lipophilicity of xenobiotics with their synergistic effects on DNA synthesis in human fibroblasts*. **Chemosphere**, v. 32, p. 1251-1259, 1996.

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

KAISER, K. L. E. *Review of biodegradability tests for the purpose of developing regulations*. **Water Quality Research Journal of Canada**, v. 33 (2), p. 185-211, 1998.

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.

KOMAGATA, K.; NAKASE, T.; KATSUYA, N. *Assimilation of hydrocarbons by yeasts – I Preliminary screening*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 10, p.313-321, 1964.

LAPINSKIENE, A.; MARTINKUS, P. & REBZDAITE, V. *Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil*. **Environmental Pollution**, v. 142, p. 432-437, 2006.

LE PETIT, J., N'GUYEN, M. H., TAGGER, S. *Quelques donnees sur l'ecologie d'une zone marine litorales recevant les rejets d'une raffinerie de petrole*. **Environmental Pollution**, v.13, p.41-56, 1977.

LEAHY, J. L.; COLWELL, R. R. Microbial *degradation of hydrocarbons in the environment*. **Microbiological Reviews**, v. 54(3), p.305-315, 1990.

LINKFIELD, T. G.; SUFLITA, J. M.; TIEDJE, J. M. Characterization of the acclimation period before anaerobic dehalogenation of chlorobenzoates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p.2773-2778, 1989.

LISTE, H.; ALEXANDER, M. *Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil*. **Chemosphere**, v. 46, 2002. 1011–1017 p.

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.

MACKAY, D. M. et al. *Impact of Ethanol on the Natural Attenuation of Benzene, Toluene, and o-Xylene in a Normally Sulfate-Reducing Aquifer*. **Environmental Science & Technology**, v. 40 (19), p. 6123 -6130, 2006.

MAKAREVICIENE, V. & JANULIS, P. *Environmental effect of rapeseed oil ethyl ester*. **Renewable Energy**, v. 28, p. 2395–2403, 2003.

MANAHAN, S. E. *Toxicological Chemistry*. **Lewis Publishersw**, Inc. USA, 1992. 449 p.

MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. A. G.; BONOTTO, D. M. & ANGELIS, D. F. *Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 346-353, 2007.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI FILHO, F.; WOLF MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R. *An Alternative Process for Butanol Production: Continuous Flash Fermentation*. **Chemical Product and Process Modeling**, v. 3, A. 34, 2008a.

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 for biosurfactant production*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, p. 269-274, 2008b.

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

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

NARDI, I. R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. *Kinetics of BTEX degradation in a packed-bed anaerobic reactor*. **Biodegradation**, v. 18(1), p. 83-90, 2007.

NIVEN, R. K. *Ethanol in gasoline: environmental impacts and sustainability review article*. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 9, p. 535–555, 2005.

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.

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.

PARALES, R. E.; DITTY, J. L.; HARWOOD, C. S. *Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene and trichloroethylene*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.4098-4104, 2000.

PASQUALINO, J. C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. *Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels*. **Biomass Bioenergy**, v. 30, p. 874-879, 2006.

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.

PINHOLT, Y.; STRUWE, S.; KJOLLER, A. *Microbial changes during oil decomposition in soil*. **Holarctic Ecology**, v. 2, p.195-200, 1979.

PIRÔLLO, M. P. S.; MARIANO, A. P.; LOVAGLIO, R. B.; COSTA, S. G. V. A. O.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. *Biosurfactant synthesis by Pseudomonas aeruginosa LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1484-1490, 2008.

POWERS, S. E.; HUNT, C. S.; HEERMANN, S. E.; CORSEUIL, H. X.; RICE, D.; ALVAREZ, P. J. J. *The transport and fate of ethanol and BTEX in groundwater contaminated by gasohol*. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 31(1), p. 79-123, 2001.

POULSEN, M.; LEMON, L.; BARKER, J. F. *Dissolution of monoaromatic hydrocarbons into groundwater from gasoline-oxygenate mixtures*. **Environmental Science & Technology**, v. 26(12), p. 2483–2489, 1992.

QURESHI, N. & BLASCHEK, H.P. *Production of acetone butanol ethanol (ABE) by a hyper-producing mutant strain of Clostridium beijerinckii BA101 and recovery by pervaporation*. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 594–602, 1999.

RISER-ROBERTS, E. *Bioremediation of petroleum contaminated sites*. Boca Ratón, FL. CRC Press, 1992.

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.

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.

SHAMSHOOM, S. M.; ZIARA, T. S.; ABDUL-RITHA, A. N.; YACOUB, A. E. *Distribution of oil bacteria in the north-west Arabian Gulf*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 21, p.38-40, 1990.

SHI, Z.; ZHANG, C.; CHEN, J. AND MAO, Z. *Performance evaluation of acetone–butanol continuous flash extractive fermentation process*. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 27, p.175-183, 2005.

SIKKEMA, J.; BONT, M.; POOLMAN, B. *Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons*. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 201-222, 1995.

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.

SILVA, M. L. B.; ALVAREZ, P. J. J. *Enhanced Anaerobic Biodegradation of Benzene-Toluene-Ethylbenzene-Xylene-Ethanol Mixtures in Bioaugmented Aquifer Columns*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70(8), p. 4720-4726, 2004.

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.

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. et al. *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.

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*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n.3, p.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*. **Environmental 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. et al. *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.

STAATSUITGEVERIJ. *Degradability, ecotoxicity and bioaccumulation – the determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment*. **Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands**, 1980.

USEPA U.S. (Environmental Protection Agency). *Health and Environmental Effects Document for 1-Butanol*. Office of Health and Environmental Assessment, U.S. EPA, Cincinnati, OH, 1989. 100 p.

_____. 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.

VEERANAGOUDA, Y.; VIJAYKUMAR, M. H.; NEELAKANTESHWAR, K. P.; NAYAK, A. S.; KAREGOUDAR, T.B. *Degradation of 1-butanol by solvent-tolerant Enterobacter sp. VKGH12. International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 57, p. 186–189, 2006.

VENKATESWARAM, K.; HARAYAMA, S. *Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, p.767-775, 1995.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. Cap. 5, 2006. 89-115p.

ZHANG, X, PETERSON, CL, REECE, D, HAWS, R, MOLLER, G. *Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, v. 41, p. 1423-1430, 1998.

ZOBELL, C. E. *Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriology Review*, v. 10, p.1-49, 1946a

WEBER, W. J. Jr; CORSEUIL, H. X. *Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. Water Research*, v. 28, p.1407-1414, 1994.

WIEDEMEIR, T. H. *Aproximation of biodegradation rate constants for monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in ground water. Ground Water Monitoring Remote and Remediations*, Dublin, p.186-194, 1996.

YOUNG, L. Y. *Anaerobic degradation of aromatic compounds*. Em: **Microbial degradation of aromatic compounds**. GIBSON, D. T. (ed.) Marcel-Dekker, New York, p. 487-523, 1984.

RICHARD CLAYTON TOMASELLA
CPF 320.152.818-86 - RA 209000629
27/11/2009