

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS**

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM GASOLINA PURA,
GASOLINA COMERCIAL E ETANOL**

NÚBIA MARTINS DE OLIVEIRA

Orientador: Maria do Carmo Ruaro Peralba – Instituto de Química/IPH/UFRGS

Banca Examinadora:

- *Dra. Fátima M. Bento - Depto. Microbiologia/ICBS/UFRGS*
- *Dr. Rodrigo Josemar Seminoti Jacques – Depto. de Solos/UFSM*
- *Dr. Antônio Domingues Benetti – Instituto de Pesquisas Hidráulicas /UFRGS*

Trabalho Publicado: Biodegradation of commercial gasoline (24% ethanol added) in liquid medium by microorganisms isolated from a landfarming site. Núbia M. Oliveira¹, Fátima M. Bento², Flávio A. O. Camargo³, Aline Jéssica Knorst⁴, Anai Loreiro dos Santos⁴, Tania M. Pizzolato⁴ and Maria do Carmo R. Peralba⁴
Journal of Environmental Science and Health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, Volume 46 Issue 1, 86, 2011.

O presente trabalho foi desenvolvido no Programa de Pós-graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental do Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Professora Maria do Carmo Ruaro Peralba.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e luz durante este trabalho.

A toda minha família pelo carinho, união e boa convivência.

A Dra. Maria do Carmo Peralba pela orientação, amizade e incentivo durante todas as etapas deste trabalho e, além disso, pelo apoio e confiança.

A Dra. Fátima Menezes Bento pela atenção, paciência, amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas pela aprendizagem e ajuda durante algumas etapas deste trabalho e especialmente à Nara Regina Atz, querida amiga pela ajuda e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da Agronomia, da Química e do Saneamento, que se tornaram meus amigos ao longo destes anos.

Aos amigos e professores que apoiaram este trabalho.

Aos professores que cederam seus laboratórios para a realização deste trabalho, especialmente ao casal Fátima Menezes Bento e Flávio Camargo, pela colaboração durante o andamento deste trabalho.

Às empresas BRASKEM e REFAP que gentilmente forneceram os materiais necessários (como: combustíveis amostras de solo e padrões de alguns compostos químicos) para o andamento desse trabalho.

Ao CNPq pelo investimento e auxílio financeiro.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 COMBUSTÍVEL.....	7
3.1.1 Gasolina pura.....	8
3.1.2 Etanol.....	9
3.1.3 Gasolina comercial	10
3.2 CONTAMINAÇÕES EM POSTOS DE COMBUSTÍVEIS.....	12
3.2.1 Vazamentos de combustíveis nos postos.....	13
3.2.2 Legislação de posto de combustível	13
3.2.3 Levantamento de áreas contaminadas com combustível.....	13
3.2.4 Legislação de área contaminada ou valores de interdição.....	14
3.2.5 Análises de risco	16
3.2.6 Gerenciamento de áreas contaminadas com combustível	16
3.3 CRITÉRIOS PARA REMEDIAR UMA ÁREA CONTAMINADA	19
3.3.1 Propriedades dos hidrocarbonetos BTX e o comportamento destes no ambiente	23
3.3.2 Localização do contaminante no solo.....	23
3.4 TÉCNICAS DE REMEDIAÇÃO DE ÁREA CONTAMINADA COM COMBUSTÍVEL...24	
3.5 BIORREMEDIAÇÃO	26
3.5.1 Estudos em solo com gasolina pura ou comercial.....	29
3.5.2 Estudos em meio líquido com gasolina pura ou comercial	30
3.6 FATORES QUE AFETAM A BIODEGRADAÇÃO.....	30
3.6.1.1 O Efeito de co-solvência	34
3.6.1.2 Volatilidade	35
3.6.1.3 Deslocamento da pluma de contaminação em água	35
3.6.1.4 Persistência dos BTX em ambientes subsuperficiais (solos e aquíferos).....	36
3.6.2 Umidade e teor de oxigênio no solo	37
3.6.3 pH do solo.....	38

3.6.4 Nutrientes no solo.....	39
3.6.4.1 Fonte adicional de carbono - glicose.....	40
3.6.4.2 Relações de nutrientes (C:N:P ou C:N).....	41
3.6.5 Microbiota do meio.....	44
3.6.5.1 Degradação.....	44
3.6.5.2 Biossurfactantes e bioemulsificantes.....	46
3.7 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
4 DESCRIÇÃO E ESQUEMA GERAL DO PLANEJAMENTO DOS ESTUDOS.....	71
5 ESTUDO 1.....	72
Biodegradação da gasolina comercial (adição de 24% de álcool) em meio líquido por isolados bacterianos (sozinhos ou na forma de consórcio) obtidos do solo <i>landfarming</i>	
RESUMO.....	73
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	74
5.1.1 Solo do <i>landfarming</i>	74
5.1.2 Meios líquidos (ou mineral) utilizados para o crescimento dos micro-organismos.....	74
5.1.3 Gasolina comercial.....	75
5.1.4. Seleção da área para isolamento dos micro-organismos.....	75
5.1.5. Análise respirométrica.....	76
5.1.6 Isolamento do micro-organismos do solo.....	77
5.1.7 Obtenção do inóculo.....	78
5.1.8 Preparação do inóculo padrão.....	78
A preparação dos inóculos foi diferente para os isolados e para os consórcios.....	78
5.1.9 Teste de biodegradabilidade por indicador TTC.....	79
5.1.10 Experimento de Biodegradação com isolados ou consórcio.....	79
5.1.11 Análises biológicas.....	80
5.1.11.1 Biomassa.....	80
5.1.11.2 Detecção de biossurfactante.....	81
5.1.12 Análise por cromatografia.....	82
5.1.13 Detecção de biossurfactante tipo ramnolípideo.....	83
5.1.14 Análise estatística.....	84
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	85
5.2.1 Seleção da área do solo para isolamento de micro-organismos.....	85
5.2.2 Crescimento de micro-organismos.....	87

5.2.3 Crescimento microbiano dos isolados no consórcio.....	94
5.4 CONCLUSÃO.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
6 ESTUDO 2.....	104
Aplicação dos processos, em escala de laboratório, de atenuação natural, bioestimulação por nutrientes, com e sem bioaumentação (consórcio bacteriano) em solo contaminado com 5% de gasolina comercial.	
RESUMO	105
6.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	106
6.1.1 Sistema fechado A e B.....	107
6.1.1.1 Análise respirométrica.....	108
6.1.1.2 Análises biológicas: População de micro-organismos heterotróficos e bacterianos.	108
6.1.1.2 Análise cromatográfica.....	109
6.1.1.3 Análises de teor de umidade e de determinação do pH.....	110
6.1.4 Análise estatística	110
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	110
6.2.1. Análise Respirométrica	111
6.2.2 Análises Biológicas: Heterotróficos	113
6.2.3 Estimativa da População Bacteriana total	115
6.2.4 Análises cromatográficas.....	116
6.3 CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
7 ESTUDO 3.....	133
Avaliação do comportamento dos compostos dos combustíveis gasolina comercial, gasolina e etanol, em solo, pelos processos de atenuação natural e bioestimulação (1% de glicose): escala piloto e de laboratório.....	
RESUMO	134
7.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	135
7.1.2 Solo.....	135
7.1.2 Combustíveis	135
7.1.3 Experimentos	136
7.1.4 Tratamentos das amostras.....	136
7.1.5 Amostragem em sistema fechado	137
7.1.6 Amostragem no sistema aberto.....	137

7.1.7 Análise cromatográfica.....	138
7.1.8 Análise respirométrica.....	139
7.1.9 Análises Biológicas	139
7.1.9.1 Estimativa do NMP de heterotróficos totais.....	140
7.1.9.2 Estimativa do NMP de degradadores	140
7.1.10 Análises de teor de umidade e de determinação do pH.....	141
7.1.11 Análise estatística	141
7.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	141
7.2.1 Análises por cromatografia a gás no sistema fechado.....	141
7.2.2 Análise respirometria (liberação de CO ₂) no sistema fechado.....	146
7.2.3 Análise biológica de heterotróficos no sistema fechado	151
7.2.4 Análise biológica de degradadores no sistema fechado	152
7.2.5 Análises dos teores de umidade e do pH no sistema fechado	153
7.2.6 Análises por cromatografia no sistema aberto.....	155
7.2.7 Análise biológica de heterotróficos no sistema aberto	170
7.2.8 Análise biológica de degradadores no sistema aberto	171
7.2.9 Análises dos teores de umidade e pH no sistema aberto	172
7.3 CONCLUSÕES	174
8 CONCLUSÃO GERAL DOS ESTUDOS	176
9 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS	178
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179
ANEXO 1	185
ANEXO 2	189
ANEXO 3	190

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1 Valores de intervenção dos compostos BTX presentes em solo e água.....	15
Tabela 3. 2 Técnicas de remediação em função da zona do meio e do tipo de tratamento.....	25
Tabela 5. 1 Percentual (%) de redução dos compostos da gasolina (etanol, BTX, C9+ e TPH) em amostras de solo de cada tratamento (<i>landfarming</i> das áreas 1 e 4 com gasolina comercial, A-1 e A-4, respectivamente) no período de tempo avaliado em relação ao tempo zero.....	86
Tabela 5. 2 Crescimento dos micro-organismos e redução do TTC conforme isolado bacteriano, em meio mineral e gasolina comercial, em 72 horas de incubação.....	88
Tabela 5. 3 Isolados bacterianos selecionados em meio mineral com gasolina comercial, por 72 horas de incubação, avaliados pela morfologia celular, pela contagem de bactérias e pela detecção de biosurfactante do tipo <i>ramnolipídeo</i>	92
Tabela 5. 4 O crescimento microbiano em meio mineral com gasolina comercial com 24% de etanol, de 0 e 72 horas de incubação, foi avaliado pela absorbância e pela contagem de células bacterianas totais (UFC) de cada consórcios (com os respectivos isolados)	94
Tabela 5. 5 Reduções dos compostos etanol, BTX, C9 e TPH da gasolina comercial de cada consórcio, em relação ao controle (sem bactérias), em meio mineral, por 72 horas de incubação.	94
Tabela 6. 1 Concentrações do benzeno no solo pelos processos de biorremediação, em função do tempo de ensaio	121
Tabela 6. 2 Concentrações do tolueno no solo pelos processos de biorremediação, em função do tempo de ensaio	122
Tabela 6. 3 Concentrações dos xilenos no solo pelos processos de biorremediação, em função do tempo de ensaio.	123
Tabela 6. 4 Concentrações dos compostos C9+ no solo pelos processos de biorremediação, em função do tempo de ensaio	124
Tabela 6. 5 Concentrações dos compostos BTX no solo pelos processos de biorremediação, por 50 dias de incubação.....	125

Tabela 7. 1	Concentrações, em mg kg ⁻¹ , dos compostos BTX e C9+ ,em solos contaminados com gasolina comercial ou pura, a 1 cm de profundidade, em sistema fechado, nos processos de atenuação natural e bioestimulação em função do tempo.	142
Tabela 7. 2	Valores intervenção dos compostos benzeno, tolueno e xilenos em solo.	143
Tabela 7. 3	Percentual (%) de redução dos compostos (etanol, BTX, C9+, TPH) presentes em cada combustível (gasolina comercial, gasolina pura, etanol), contido no solo, nos processos de atenuação natural e bioestimulação. Os percentuais de redução foram calculados em relação ao tempo zero, de cada tratamento.	145
Tabela 7. 4	Avaliação da biodegradação do combustível 5% m/m (50.000 mg kg ⁻¹) no solo, nos dois processos estudados, em relação: a concentração de CO ₂ liberado, ao percentual de mineralização (em relação ao testemunho 1) e a redução dos compostos TPH ou do composto etanol, de cada combustível no respectivo processo, em 150 dias.	149
Tabela 7. 5	Estimativa do NMP (número mais provável) de micro-organismos heterotróficos totais nas amostras de solo dos tratamentos, em sistema fechado, na profundidade de 1 cm, nos períodos de 0 e 150 dias.	152
Tabela 7. 6	Estimativa do NMP (número mais provável) de micro-organismos degradadores existentes nas amostras de solo (com e sem combustíveis) dos tratamentos, na profundidade de 1 cm, no período de 0 e 150 dias.	153
Tabela 7. 7	Valor médio de pH da amostra de solo de cada tratamento em sistema fechado, nos períodos de zero e 150 dias.	155
Tabela 7. 8	Concentrações do composto BTX e C9+ em solo com gasolina comercial (ou pura) na profundidade de 1 cm, nos processos de atenuação natural e bioestimulação em função do tempo.	156
Tabela 7. 9	Concentrações do composto BTX e C9+ em solo com gasolina comercial (ou pura) na profundidade de 50 cm, nos processos de atenuação natural e bioestimulação em função do tempo.	157
Tabela 7. 10	Concentrações do composto BTX e C9+ em solo com gasolina comercial (ou pura) nas profundidades de 1, 50 e 100 cm e em todas as profundidades do tubo (1a 100 cm), nos processos de atenuação natural e bioestimulação, nos tempos de zero e 150 dias.	158
Tabela 7. 11	Estimativa de micro-organismos heterotróficos totais existentes nas amostras de solo dos tratamentos, em sistema aberto, na profundidade de 1 e 50 cm, nos períodos de 0 e 150 dias.	171

Tabela 7. 12 Estimativa do NMP (número mais provável) de micro-organismos degradadores existentes nas amostras de solo (com e sem combustíveis) dos tratamentos, em sistema aberto, nas profundidades de 1 e 50 cm, nos períodos de 0 e 150 dias.	172
Tabela 7. 13 Valor médio de pH da amostra de solo de cada tratamento em função das profundidades de 1, 50 e 100 cm e no tempo zero, em sistema aberto.	173

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1 Registro em percentual de áreas contaminadas (AC), contaminadas sob investigação (AI), em processo de monitoramento para reabilitação (AMR) e reabilitadas (AR), no Estado de São Paulo.	18
Figura 3. 2 Aspectos a serem considerados na seleção de técnicas de remediação.	19
Figura 3. 3 Processos e fatores que afetam a biodegradação de poluentes no solo.....	32
Figura 3. 4 Apresentação esquemática de algumas reações enzimáticas possíveis, durante a degradação dos hidrocarbonetos BTEX	45
Figura 4. 1 Fluxograma geral dos três estudos realizados.....	73
Figura 5. 1 Frascos utilizados nas análises biológicas e químicas, em sistema fechado.....	80
Figura 5. 2 Concentração do C-CO ₂ produzido pelos micro-organismos do solo do <i>landfarming</i> das áreas 1 (borra 30 dias antes da coleta) e 4 (7 dias antes da coleta) com e sem gasolina comercial (CG), durante 30 dias.....	85
Figura 5. 3 Crescimento dos 17 isolados avaliado por densidade ótica (A), em meio mineral com gasolina comercial, nos períodos de 0 e 72 horas de incubação.....	88
Figura 5. 4 Crescimento dos 7 isolados avaliado por densidade ótica (A), em meio mineral com gasolina comercial de 12 em 12 horas, por 72 horas de incubação.....	89
Figura 5. 5 Medida da tensão superficial de cada isolado em meio mineral com gasolina comercial nos tempos zero e 72 horas de incubação.....	89
Figura 5. 6 Índice de emulsificação (EI 24%) de cada isolado com célula, por 72 horas de incubação em meio mineral com gasolina comercial.....	90
Figura 5. 7 Representação da produção de biossurfactantes do tipo <i>ramnolipídeo</i> em placas com agar (azul de metileno e CTAB) com inóculos dos isolados bacterianos UFRGS 2, 5, 6, e,7 (à esquerda) e UFRGS 14,15 e 17 (à direita).....	90
Figura 5. 8 Degradação estimada pela redução dos compostos etanol, BTX, C9 e TPH da gasolina comercial em meio mineral de cada isolado bacteriano em relação ao controle, por 72 horas de incubação.	92
Figura 5. 9 Cromatogramas dos compostos etanol, BTX, C9 e TPH da gasolina comercial em relação ao controle (sem bactérias) de diferentes consórcios no meio mineral com 1% de gasolina comercial (24% de etanol), em 72 horas de incubação.	95

Figura 6. 1 Concentração de C_CO ₂ liberada pelos micro-organismos do solo nos seguintes tratamentos: 1- testemunho 1 (solo <i>in natura</i> e pH 5); 2- testemunho 2 (solo <i>in natura</i> , adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7); 3- atenuação natural (solo <i>in natura</i> , com 5% de gasolina comercial); 4- bioestimulação (solo <i>in natura</i> com 5% de gasolina comercial, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7); 5- bioestimulação com bioaumentação (solo <i>in natura</i> com 5% de gasolina comercial, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7 e adição de inóculo 10 ⁶ UFC g ⁻¹ do consórcio N1), em função do tempo.	111
Figura 6.2 Logaritmo do número mais provável (NMP) de heterotróficos totais do solo estudado nos seguintes tratamentos: 1- testemunho 1 (solo <i>in natura</i> com pH 5); 2- testemunho 2 (solo <i>in natura</i> com adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1 e pH corrigido para 7); 3- atenuação natural (solo <i>in natura</i> com 5% de gasolina comercial); 4- bioestimulação (solo <i>in natura</i> com 5% de gasolina comercial, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1 e pH corrigido para 7); 5- bioestimulação com bioaumentação (solo <i>in natura</i> com 5% de gasolina comercial, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7 e adição de inóculo 10 ⁶ UFC g ⁻¹ do consórcio N1), em função do tempo.	113
Figura 6.3 Estimativa média do logaritmo da unidade formadora de colônias (UFC) de bactérias totais do solo estudado nos seguintes tratamentos: 1- testemunho 1 (solo <i>in natura</i> com pH 5); 2- testemunho 2 (solo <i>in natura</i> com adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1 e pH corrigido para 7); 3- atenuação natural (solo <i>in natura</i> com 5% de gasolina comercial); 4- bioestimulação (solo <i>in natura</i> com 5% de gasolina comercial, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1 e pH corrigido para 7); 5- bioestimulação com bioaumentação (solo <i>in natura</i> com 5% de gasolina comercial, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7 e adição de inóculo 10 ⁶ UFC g ⁻¹ do consórcio N1), em função do tempo.....	116
Figura 6.4 Percentuais (%) de redução do composto etanol em solo em relação aos tratamentos (bioestimulação, bioaumentação com bioestimulação e atenuação natural) com gasolina comercial, em função do tempo.	117
Figura 6.5 Percentuais (%) de Redução dos compostos TPH em solo em relação aos tratamentos (bioestimulação, bioaumentação com bioestimulação, e atenuação natural) com gasolina comercial, em função do tempo.	119
Figura 7. 1 Sistema fechado, com frascos de vidro com 1,5 L, com amostra de solo.....	137

Figura 7. 2 Sistema aberto, com tubos de PVC.....	138
Figura 7. 3 Concentrações de C-CO ₂ produzidos pelos micro-organismos dos solos em diferentes tratamentos em função do tempo.....	147
Figura 7. 4 Teores de umidade do solo (testemunho 1) em função do tempo.....	154
Figura 7. 5 Concentrações dos compostos (benzeno, tolueno, xilenos e C9+) da gasolina comercial (GC) avaliados, em solo, pelos processos de atenuação natural e bioestimulação (1% de glicose), em diferentes profundidades, em 150 dias.....	160
Figura 7.6 Concentrações dos compostos (benzeno, tolueno, xilenos e C9+) da gasolina pura (GP) avaliados, em solo, pelos processos de atenuação natural e bioestimulação (1% de glicose), em diferentes profundidades, em 150 dias.....	160
Figura 7.7 Percentual (na profundidade 1, 50 e 100 cm, ou de redução de 1 a 100 cm) de cada composto (etanol, benzeno, tolueno, xilenos, C9+ e TPH) da gasolina comercial avaliado, em solo, pelo processo de atenuação natural, em 150 dias.....	161
Figura 7.8 Percentual (na profundidade 1, 50 e 100 cm, ou de redução de 1 a 100 cm) de cada composto (etanol, benzeno, tolueno, xilenos, C9+ e TPH) da gasolina comercial, avaliado, em solo, pelo processo de bioestimulação (1% glicose), em 150 dias.....	161
Figura 7.9 Percentual (na profundidade 1, 50 e 100 cm, ou de redução de 1 a 100 cm) de cada composto (benzeno, tolueno, xilenos, C9+ e TPH) da gasolina pura, avaliado, em solo pelo processo de atenuação natural, em 150 dias.	162
Figura 7.10 Percentual (na profundidade 1, 50 e 100 cm, ou de redução de 1 a 100 cm) de cada composto (benzeno, tolueno, xilenos, C9+ e TPH) da gasolina pura, avaliado, em solo, pelo processo de bioestimulação (1% glicose), em 150 dias.....	162
Figura 7.11 Percentual (presente em 1 cm e em 50 cm, ou reduzido de 1 a 50 cm) de cada composto (etanol, benzeno) do combustível (gasolna pura e gasolina comercial) usado no solo em dado processo (atenuação natural e bioestimulação), avaliado em função do tempo, como de: A) etanol da gasolina comercial (GC) em atenuação natural; B) etanol da gasolina comercial (GC) em bioestimulação; C) benzeno da gasolina comercial (GC) em atenuação natural; D) benzeno da gasolina comercial (GC) em bioestimulação; E) benzeno da gasolina pura (GP) em atenuação natural; F) benzeno da gasolina pura (GP) em bioestimulação.	164
Figura 7.12 Percentual (presente em 1 cm e em 50 cm, ou reduzido de 1 a 50 cm) de cada composto (tolueno, xilenos) do combustível (gasolna pura e gasolina comercial) usado no solo em dado processo (atenuação natural e bioestimulação), avaliado em função do tempo, como de: G) tolueno da gasolina comercial (GC) em atenuação natural; H)	

tolueno da gasolina comercial (GC) em bioestimulação; I) tolueno da gasolina pura (GP) em atenuação natural; J) tolueno da gasolina pura (GP) em bioestimulação; L) xilenos da gasolina comercial (GC) em atenuação natural; M) xilenos da gasolina comercial (GC) em bioestimulação. 165

Figura 7.1 Percentual (presente em 1 cm e em 50 cm, ou reduzido de 1 a 50 cm) de cada composto (xilenos, C9+) do combustível (gasolina pura e gasolina comercial) usado no solo em dado processo (atenuação natural e bioestimulação), avaliado em função do tempo, como de: N) xilenos da gasolina pura (GP) em atenuação natural; O) xilenos da gasolina pura (GP) em bioestimulação; P) C9+ da gasolina comercial (GC) em atenuação natural; Q) C9+ da gasolina comercial (GC) em bioestimulação; R) C9+ da gasolina pura (GP) em atenuação natural; S) C9+ da gasolina pura (GP) em bioestimulação.....166

Figura 7.14 Percentuais (presente em 1 cm e em 50 cm, ou reduzido de 1 a 50 cm) dos compostos avaliados (hidrocarbonetos totais do petróleo, TPH) do combustível (gasolina pura e gasolina comercial) usado no solo em dado processo (atenuação natural e bioestimulação), avaliados em função do tempo, como de: T) TPH da gasolina comercial (GC) em atenuação natural; U) TPH da gasolina comercial (GC) em bioestimulação; V) TPH da gasolina pura (GP) em atenuação natural; W) TPH da gasolina pura (GP) em bioestimulação; X) etanol do combustível etanol (E) em atenuação natural; Z) etanol do combustível etanol (E) em bioestimulação..... 167

Figura 7.15 Teores de umidade do solo (testemunho 1) em função do tempo, nas profundidades de 1 e 50 cm, em sistema aberto. 173

RESUMO

A gasolina comercial no Brasil contém elevada concentração de etanol (20 a 25% em volume, $v v^{-1}$) que tende a aumentar a solubilidade dos hidrocarbonetos, principalmente do benzeno, tolueno e xilenos (BTX), em água e pode ser preferencialmente degradado pelos micro-organismos no ambiente em relação aos outros compostos da gasolina. Além disso, os compostos da gasolina são considerados fontes de carbono hidrofóbicas que em contato com a microbiota do meio tendem a ser utilizados como substrato, podendo produzir biosurfactantes. Em caso de contaminação a fração BTX pode ser removida do ambiente pelo processo de biorremediação. Neste trabalho foram realizados três estudos de biorremediação que simularam contaminação de solo com 5% em massa ($m m^{-1}$) de combustível (gasolina comercial, gasolina pura, etanol) e de meio líquido com 1% $v v^{-1}$ de gasolina comercial em sistema denominado de fechado (frascos de vidro fechados) ou de aberto (tubos de PVC de 100 x 5 cm).

O estudo 1 visou selecionar o solo proveniente de duas distintas localizações de um *landfarming* (com histórico de contaminação com borra oleosa) e neste solo foi adicionada a gasolina comercial (24% $v v^{-1}$ de etanol), de modo a isolar dele micro-organismos de maior potencial na degradação dos compostos do combustível. Os micro-organismos obtidos, na forma de isolados ou consórcios, foram avaliados em meio líquido com 1% $v v^{-1}$ de gasolina comercial, em sistema fechado, visando selecionar os melhores micro-organismos degradadores dos compostos da gasolina comercial. No estudo 2 foram utilizados três processos de biorremediação: bioestimulação (com nutrientes) com e sem bioaugmentação (com consórcio) e o de atenuação natural, conduzidos em sistema fechado, contendo solo e 5% $m v^{-1}$ de gasolina comercial. No estudo 3 foram empregados os processos de bioestimulação em solo (com 1% $m m^{-1}$ de glicose) e atenuação natural, com 5% $m v^{-1}$ de combustível (gasolina comercial, gasolina pura ou etanol) em sistema fechado na profundidade de 1 cm e no aberto em diferentes profundidades (1, 50 e 100 cm).

No estudo 1, pelos consórcios formados com quatro isolados, dos sete selecionados, do *landfarming*, verificou-se redução dos compostos da gasolina comercial em aproximadamente 98%, em meio líquido em um período de 3 dias, em sistema fechado. No estudo 2, o processo de bioaugmentação (adição de micro-organismos na forma de consórcio) com bioestimulação, não apresentou diferença significativa de biodegradação da gasolina

comercial em relação aos demais processos, em sistema fechado. No estudo 3, os solos contaminados com os combustíveis gasolina comercial e etanol, apresentaram maior liberação de CO₂ nos dois processos estudados, bioestimulação com 1% de glicose e atenuação natural. Os experimentos com gasolina comercial (24% v v⁻¹ de etanol) apresentam dados que indicam que a presença do etanol beneficiou a maior degradação dos hidrocarbonetos desta gasolina em sistema aberto. Os dados também mostram que os compostos BTX das gasolinas atingiram concentrações abaixo dos valores de interdição ambiental, em 1 cm de profundidade, nos dois sistemas e nas condições estudadas. Também, em sistema aberto estes compostos da gasolina comercial atingiram concentrações abaixo dos valores de interdição ambiental, nas três profundidades e nos dois processos estudados. Entretanto, esse comportamento não foi verificado nos compostos da gasolina pura nesses processos em sistema aberto, exceto em 1 cm de profundidade.

ABSTRACT

Brazilian commercial gasoline contains a high concentration of ethanol (20 to 25%) which tends to increase the solubility of hydrocarbons, mainly benzene, toluene and xylenes (BTX), in water and can be degraded by microorganisms preferably to other gasoline compounds. Furthermore, gasoline compounds are considered hydrophobic carbon sources which in contact with the environment microbiota tend to be used as substrate and might produce biosurfactants. In case of contamination by these compounds, they can be removed from the environment by bioremediation, namely, the removal of contaminants by the action of microorganisms. In the present work, three bioremediation studies have been carried out simulating soil contamination with 5% fuel (commercial gasoline, pure gasoline and ethanol) and liquid media with 1% commercial gasoline in closed (closed glass flasks) and open systems (plastic tubes, 100 cm x 5 cm).

The study 1 aimed to select the soil from two distinct locations on a landfarming site with an historic of contamination by commercial gasoline, in order to isolate microorganisms with the higher degrading potential. The obtained microorganisms under the form of isolates or consortiums were evaluated in liquid medium with 1% commercial gasoline, in closed system with glass flasks, in order to select the best degrading microorganisms for the compounds of commercial gasoline (24% ethanol). In study 2 three processes of bioremediation have been employed: bioestimulation (with nutrients) with and without bioaugmentation (with consortium) and natural attenuation carried out in closed flasks containing soil and 5% commercial gasoline. In study 3, the processes of bioestimulation (with 1% glucose) and natural attenuation in soil with 5% fuel, commercial gasoline, pure gasoline or ethanol in closed flasks and in PVC tubes were carried out.

In study 1, consortiums formed by the four isolates with the higher commercial gasoline compounds degrading potential, selected from the landfarming site, reduced the commercial gasoline compounds in approximately 98% in liquid medium within a period of 3 days. In study 2, closed system, the bioaugmentation process (addition of microorganisms in the form of consortiums) with bioestimulation, did not show a significant difference when compared to other processes in a closed system. In study 3 the soils contaminated with commercial gasoline and ethanol, presented higher CO₂ liberation in both studied processes: bioestimulation with 1% glucose and natural attenuation. Experiments with commercial

gasoline (24% ethanol) showed data indicating that the presence of ethanol benefited further degradation of gasoline hydrocarbons in this open system. The data also showed that BTX of gasoline reached concentrations below the environmental values of prohibition in 1 cm depth in both systems and conditions studied. Also, in an open system of commercial gasoline these compounds reached concentrations below the environmental values of interdiction in three depth sand in both cases studied. However, this behavior was not observed in the compounds of pure gasoline in these processes in open system, except in 1 cm depth.

1 INTRODUÇÃO

Na década de 70, houve um grande incentivo na comercialização de combustível e com isto ocorreu aumento considerável no número de postos no Brasil. Atualmente existem 35 mil postos de combustíveis em funcionamento, conforme Agência Nacional de Petróleo (ANP, 2007). Nos postos, os combustíveis são estocados em tanques de armazenamento subterrâneo (TAS), para evitar explosões na superfície. Estes TAS têm vida útil em torno de 25 anos, mas em contato com o solo pode ter menor durabilidade, devido à corrosão externa e fissuras que tendem a ocasionar vazamentos dos combustíveis. Os vazamentos de combustíveis podem causar danos ao meio e aos seres vivos, principalmente devido à toxicidade dos compostos BTX, a facilidade de inflamar, de contaminar os solos e águas subterrâneas e tendem provocar danos irreversíveis.

Em levantamentos realizados pela CETESB (2009), com áreas contaminadas no Estado de São Paulo, foram verificados que 79% eram devido a vazamentos com tanques de armazenamento subterrâneos de postos combustíveis. O combustível mais observado nessas áreas foi a gasolina comercial. A gasolina pode apresentar mais de 230 hidrocarbonetos, o que a caracteriza como mistura complexa de hidrocarbonetos. Dentre os hidrocarbonetos da gasolina os que causam maior preocupação são os compostos aromáticos, como os BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos), que são pouco solúveis em água. Entretanto, os BTEX são os mais solúveis dos hidrocarbonetos da gasolina e os mais tóxicos, com potencial cancerígeno e depressor do sistema nervoso central. Devido a isto, os BTEX são considerados compostos prioritários no monitoramento de áreas contaminadas com gasolina pelos órgãos ambientais. Conforme legislação ambiental (CETESB, 2005) os valores de intervenção para solo com benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em área residencial são de: 0,08; 30 e 30 mg kg⁻¹, respectivamente. Os valores de intervenção dos compostos BTX em água pela legislação ambiental são de: 5, 700 e 500 µg L⁻¹, respectivamente. Entretanto, para o consumo humano a água potável no Brasil deve apresentar valores de referência iguais ou menores de BTX de: 5, 40 e 20 µg L⁻¹, respectivamente.

Além disso, a gasolina brasileira tem etanol em sua composição, o que a torna diferente de outros países. A concentração de etanol está entre 20 a 25% v v⁻¹ e é regulada pela Agência Nacional do Petróleo (ANP), que é objeto de lei federal. O etanol adicionado à gasolina comercial tem a função de aumentar o índice de octanagem da gasolina (que melhora

o desempenho e reduz o desgaste mecânico do motor) e diminuir as emissões de monóxido de carbono no meio. Contudo, a presença de etanol pode aumentar o impacto ambiental no caso de um vazamento de gasolina comercial, pois promove o efeito de co-solvência no meio, que gera o aumento da solubilidade de alguns hidrocarbonetos como dos BTX (benzeno, tolueno e xilenos) em água, e pode causar maior extensão da contaminação e dos riscos a saúde dos seres vivos.

No ambiente o etanol da gasolina comercial pode ser preferencialmente degradado pelos micro-organismos em relação aos BTX e a outros hidrocarbonetos da gasolina, em virtude de sua estrutura e solubilidade. Esta degradação preferencial do etanol pelos micro-organismos pode levar ao consumo de oxigênio do meio, em ambientes sub-superficiais (solos e aquíferos), ocasionando a persistência dos demais compostos nestes ambientes. Todavia, os micro-organismos podem utilizar os hidrocarbonetos da gasolina como fonte de carbono e energia para seu crescimento e, quando alguma fração é considerada hidrofóbica, como os hidrocarbonetos, os micro-organismos podem produzir biossurfactantes, que facilitam a degradação e remediação do combustível no ambiente, principalmente pelo processo de biorremediação; que atualmente é mais utilizado.

Segundo Souza *et al.* (2010), a biorremediação pode ser definida como uma estratégia ou processo que emprega agentes biológicos, micro-organismos, plantas ou enzimas, para destoxificar poluentes alvos em ambientes contaminados. O princípio de todos os processos de biorremediação é propiciar um aumento na biodegradação e provocar um estímulo da atividade microbiana degradadora por diferentes mecanismos. Em geral os processos de biorremediação mais utilizados são: atenuação natural (utiliza a microbiota nativa do meio contaminado), bioestimulação (aplica nutriente e/ ou oxigênio a microbiota nativa do meio contaminado), bioaugmentação (usa adição de inóculo de micro-organismos com potencial de degradação do contaminante na presença da microbiota nativa do meio contaminado). A biorremediação apresenta-se economicamente viável e ambientalmente correta, pois utiliza a capacidade dos micro-organismos em degradar os mais diversos poluentes orgânicos em compostos totalmente ou parcialmente inócuos a vida; geralmente. A biorremediação através da mineralização do poluente pode gerar água e dióxido de carbono.

Os poluentes como os combustíveis (etanol, gasolina comercial com 24% de etanol e gasolina pura) são bem frequentes e problemáticos no ambiente. Por isto, mais estudos destes poluentes no ambiente são necessários, principalmente em relação aos processos de biorremediação para se observar no meio (solo e água) o comportamento dos compostos destes combustíveis, o efeito de co-solvência dos compostos da gasolina na presença de etanol

e à degradação preferencial do etanol em relação aos BTX. Neste sentido, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o comportamento dos compostos, principalmente dos BTX e do etanol, presentes no combustível em relação á biodegradação em meio líquido com isolados (ou consórcios) em sistema fechado e em solo com sistema fechado ou aberto. Desta forma, o trabalho foi conduzido em três estudos, conforme especificações a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- avaliar a degradação:

- no solo dos compostos (etanol, hidrocarbonetos com cadeia de 9 a 11 átomos de carbono, C9+; hidrocarbonetos totais do petróleo, HTP ou em inglês TPH); Benzeno, Tolueno e Xilenos, BTX) de cada combustível (gasolina comercial, gasolina pura e etanol) pela ação da microbiota do solo, em sistema fechado e aberto, nos estudos 1, 2 e 3;
- em meio líquido dos compostos da gasolina comercial (etanol, C9+, TPH, BTX), na presença de isolado bacteriano ou consórcios bacterianos, em sistema fechado, no estudo 1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

ESTUDO 1

- avaliar duas áreas (1 e 4) do solo do *landfarming* (que continham resíduos petroquímicos desde 1989), com adição de gasolina comercial em sistema fechado, através da atividade microbiana pela liberação de CO₂ e pela redução dos compostos da gasolina comercial (etanol; C9+; TPH; e BTX) para selecionar uma área;
- isolar micro-organismos da área selecionada do solo *landfarming* e cultivá-los em meio mineral com gasolina comercial;
- avaliar os melhores isolados obtidos do solo da área selecionada do *landfarming*, em meio mineral com gasolina comercial, em relação às variáveis: crescimento, produção de

biossurfactantes (pelas medidas de tensão superficial e índice de emulsificação) e redução dos compostos presentes na gasolina comercial (etanol, C9+, TPH e BTX), em relação ao controle;

- formar consórcios bacterianos aleatoriamente, com quatro dos isolados selecionados em meio líquido com gasolina comercial, visando analisá-los em função da eficiência segundo a capacidade de degradação dos compostos da gasolina comercial (etanol, C9+, TPH e BTX) e crescimento bacteriano em presença de gasolina comercial.

ESTUDO 2

- acompanhar os processos de atenuação natural e bioestimulação com ou sem bioaumentação em solo com gasolina comercial em relação a (s):

- atividade microbiana do solo avaliada pela (o): liberação de CO₂, redução dos compostos da gasolina comercial, número mais provável (NMP) de micro-organismos degradadores e unidade formadora de colônia (UFC) de bactérias;
- concentrações dos compostos BTX da gasolina comercial em cada processo, em função dos valores de interdição ambiental.

ESTUDO 3

- avaliar os processos de atenuação natural e bioestimulação (com 1% de glicose) no solo com combustível (gasolina comercial, gasolina pura, etanol) em função da (s):

- atividade microbiana do solo pela liberação de CO₂, redução de cada composto ou dos compostos do combustível usado e do número mais provável (NMP) de micro-organismos (degradadores e heterotróficos), em sistema fechado;
- reduções dos compostos presentes nos combustíveis (gasolina comercial, gasolina pura, etanol) pela microbiota do solo e pelo NMP de micro-organismos (degradadores e heterotróficos) presentes no solo, em sistema aberto;

- concentrações dos compostos BTX das gasolinas comercial e pura no solo, em relação aos valores de interdição ambiental, nos sistemas fechado e aberto.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COMBUSTÍVEL

Os combustíveis mais utilizados no Brasil nos transportes viários são gasolina comercial, diesel (ou óleo combustível) e etanol, e em 2010 o consumo destes foi de 15, 30 e 4,9 milhões de m³, respectivamente (ANP, 2010). Dentre estes combustíveis os derivados do petróleo são o óleo diesel e a gasolina. Estes têm composições diferentes entre si e podem apresentar variações nestas, conforme a procedência do petróleo (NYER, 2000).

Em refinarias típicas, o óleo cru de petróleo é separado numa torre de destilação em diversas frações e se obtém gasolina, óleo diesel, nafta e outras frações. A partir da nafta a gasolina é obtida através do processo de craqueamento catalítico. Além disso, por esse processo se obtém outros derivados do petróleo (como benzeno, tolueno e xilenos), a partir da nafta, que podem ser utilizados na composição final da gasolina quando necessário (SILVA, 2004).

Pelas frações destiladas do petróleo os combustíveis são obtidos e classificados de acordo com o número de carbonos existentes nas moléculas; por exemplo, a gasolina pode apresentar de 4 a 12 átomos de carbono e óleos combustíveis contêm mais de 14 átomos de carbono em sua composição (USEPA, 2003). A diferença mais importante entre os combustíveis gasolina e óleo diesel é o tamanho das cadeias carbônicas, ou seja, o número de carbonos existentes na estrutura dos compostos que os compõe, o peso molecular, e a quantidade de hidrocarbonetos aromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos).

Embora o volume de óleo diesel consumido no país seja geralmente o dobro do volume de gasolina, este é considerado um combustível menos preocupante, em termos ambientais, devido à sua menor mobilidade no meio e por possuir os compostos tóxicos (BTEX) em menor quantidade na sua composição, se comparada com as quantidades encontradas na gasolina (FERREIRA & ZUQUETTE, 1998).

A problemática da maior mobilidade dos compostos BTEX da gasolina com e sem etanol no meio e do etanol, serão enfocados mais detalhadamente nos itens a seguir; que abordaram os combustíveis: gasolina pura, gasolina com etanol (denominada gasolina comercial) e etanol

3.1.1 Gasolina pura

A gasolina, ou gasolina pura, é uma mistura complexa com mais de 230 hidrocarbonetos derivados do petróleo (MARCHAL *et al.*, 2003). Estes hidrocarbonetos são produzidos sinteticamente todos juntos e quando necessário alguns destes compostos (como benzeno, tolueno, xilenos) podem ser adicionados para gerar a composição deste combustível (DONALDSON *et al.*, 1992; SERENA *et al.*, 1999; SILVA, 2004; SILVA *et al.*, 2009). A gasolina é uma mistura complexa de hidrocarbonetos hidrofóbicos, relativamente voláteis, que possui uma densidade relativa de 0,721 mg mL⁻¹ (FERREIRA & ZUQUETTE, 1998) e com diferentes graus de volatilização. A maioria dos compostos são hidrocarbonetos alifáticos, 50 a 70% (em volume, v v⁻¹) - alcanos, cicloalcanos e alquenos (BERAU, 1997, MORAIS & TAUK-TORNISIELO, 2004). Os hidrocarbonetos aromáticos (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos – BTEX) representam concentração significativa na gasolina, onde sua fração em volume pode ser superior a 20% (CORSEUIL *et al.*, 2006), dependendo da procedência do petróleo. Compostos contendo átomos de enxofre, nitrogênio, metais, oxigênio e outros representam uma minoria na composição da gasolina. No Brasil é estipulado um limite de 1% (em volume, v v⁻¹) para o benzeno, e um valor de 10% ou mais que 20% (em volume) para o tolueno, etil-benzeno e xilenos (GUIMARÃES, 2003; CORSEUIL *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009).

Segundo Corseuil & Fernandes (1999) a gasolina pura é composta em geral de 0,52 % v v⁻¹ de benzeno, 3,38 % v v⁻¹ de tolueno, 5,52 % v v⁻¹ de xilenos (ou 3,96 % v v⁻¹ de meta, para xilenos e 1,56 % v v⁻¹ de orto-xileno). Logo se observa que a composição da gasolina é bastante diversificada em função: do processo utilizado na produção, das características do petróleo e dos aditivos nela adicionados. A Agência Nacional de Petróleo (ANP), através da Portaria Número 309, de 27 de dezembro de 2001, estabeleceu as especificações para comercialização de gasolinas automotivas em todo o território nacional e definiu obrigações dos agentes econômicos sobre o controle de qualidade do produto. A gasolina pode conter, também, antioxidante que têm como objetivo evitar a formação da chamada goma, proveniente da oxidação da fração que fica fortemente aderida às paredes do carburador e das válvulas, impedindo um melhor desempenho. Os detergentes e dispersantes utilizados diminuem, consideravelmente, a formação de depósitos no sistema de alimentação, melhorando o desempenho do motor (FAIRBANKS, 1992; CUNHA & LEITE, 2000).

3.1.2 Etanol

No Brasil, o etanol, é extraído geralmente da cana-de-açúcar e surgiu como alternativa de substituir, em parte, os combustíveis do petróleo, principalmente, devido à longa experiência brasileira com o cultivo da cana (LEITE & LEAL, 2007). Com os baixos preços do açúcar, em 1975, os usineiros convenceram o governo a substituir a gasolina por álcool etílico, surgindo assim o Programa Nacional do Álcool – denominado de Proálcool (CREMA & FERREIRA, 2009).

O etanol produzido no Brasil origina-se, em sua quase totalidade, da fermentação do açúcar de cana. Em outros países, o etanol é obtido da fermentação de materiais amiláceos, como o milho (nos Estados Unidos da América, EUA), ou até mesmo por meio da hidratação do etano, derivado do petróleo. Esse último processo está restrito, naturalmente, aos países muito ricos em petróleo e que tendem a perder rapidamente a importância com a disseminação do etanol gerado pela biomassa. (MILANEZ *et al.*, 2008)

O etanol pode ser obtido de biomassas classificadas em três grupos: 1) plantas ricas em açúcar (cana, beterraba, etc); 2) plantas ricas em amido (mandioca, batata, milho, etc); 3) plantas ricas em celulose (madeira, bambu, águapé, algas etc). (GATTE Jr, 2010) As matérias-primas para obtenção de etanol vêm mudando, pois em 2007, as principais matérias-primas eram: cana-de-açúcar (Brasil), beterraba (França) e milho (EUA). Hoje, os processos do etanol estão ancorados no uso de açúcares de cadeia curta (sacarose, glicose e frutose, principalmente), que as leveduras são capazes de consumir. (SALSA, 2009)

Segundo Salsa (2009) ao contrário do milho, a cana-de-açúcar, a celulose e as algas são matérias-primas renováveis capazes de garantir a produção de etanol sem comprometer a segurança alimentar.

O etanol anidro no Brasil teve sua ascensão e queda no regime militar, entre os anos 1970 e 1980, e seu renascimento a partir de 2003 – com o surgimento dos carros *flex* com tecnologia *flex fuel* (GATTE Jr, 2010). Bicomcombustível ou *flex fuel* é o nome dado à tecnologia que permite que veículos utilizem como combustível a gasolina, o etanol ou qualquer proporção de mistura entre os dois. (ANFAVEA, 2010).

Para uso automotivo, o etanol combustível ou carburante, pode ser anidro ou hidratado. O etanol anidro (sem adição de água) é adicionado à gasolina desde a década de 1930 (hoje numa proporção entre 20 a 25% em volume, v v⁻¹). O etanol hidratado, cuja composição é de álcool etílico e água, é padronizado pela Associação Brasileira de Normas

Técnicas (ABNT), Conselho Nacional do Petróleo (CNP) e Instituto Nacional de Pesos e Medidas (INPM), pois alteração em sua densidade pode acarretar danos ao motor (SALSA, 2009).

Hoje o etanol anidro é cada vez mais utilizado no Brasil e no Mundo devido ao suprimento de combustíveis necessários a demanda mundial de carros, a novas tecnologias, por ser renovável e por minimizar os efeitos das emissões de poluentes, entre elas, a concentração de gases do efeito estufa na atmosfera (GATTE Jr, 2010). Estimativas mostram um aumento significativo para a participação do Etanol no mercado externo e interno, dependendo das condições do mercado; pois contribui com preço competitivo em relação ao petróleo e/ou por ser um combustível limpo e menos poluente.

Em relação ao seu comportamento no ambiente, o etanol tem um menor potencial de sorção no solo e maior mobilidade em água (POWERS *et al.*, 2001; CORSEUIL *et al.*, 2009), pois o etanol é uma substância polar completamente solúvel em água (CORSEUIL *et al.*, 2009) e volátil.

3.1.3 Gasolina comercial

A gasolina comercial é a gasolina pura que recebe adição de etanol anidro. Esta adição de etanol anidro pode variar de: 22% v v⁻¹ (CORSEUIL & MORENO, 1998; CUNHA & LEITE, 2000), 24% v v⁻¹ (CORSEUIL & FERNANDES, 2001; CARAMÃO, *et al.*, 2003), 20 a 25% v v⁻¹ (TIBURTIUS *et al.*, 2004). O etanol anidro é adicionado à gasolina desde a década de 1930 (hoje numa proporção entre 20 a 25%, em volume, v v⁻¹). (SALSA, 2009). O teor de álcool etílico anidro (etanol anidro) na gasolina é especificado pela Agência Nacional do Petróleo (ANP) e é objeto de lei federal, que determina a adição de 20 a 25% v v⁻¹.

Os aditivos e o teor de etanol anidro adicionado à gasolina variam de acordo com a fonte distribuidora de combustível (CORSEUIL & MARINS, 1997). Dentre os aditivos que são utilizados, os oxigenados como o etanol têm a função de aumentar o índice de octanagem da gasolina automotiva, melhorando o desempenho do motor e reduzindo os desgastes mecânicos do veículo, diminuindo assim a emissão e a poluição atmosférica (FERREIRA & ZUQUETTE, 1998). Logo 20% de etanol anidro na gasolina reduzem em 40% a emissão de

CO₂ de hidrocarbonetos no ar, em função do ciclo do carbono, contribuindo, desta forma, para redução da poluição atmosférica (FAIRBANKS, 1992; CUNHA & LEITE, 2000).

A gasolina comercial, com 22 % v v⁻¹ de etanol anidro, é composta de 0,42 % de volume de benzeno, 2,72 % de volumes de tolueno e 4,60 % de volumes de xilenos (3,32 % v v⁻¹ de m, p xileno e 1,28 % v v⁻¹ de o-xileno; CORSEUIL & FERNANDES, 1999). O etanol na gasolina comercial age como co-solvente permitindo assim uma maior solubilidade dos compostos BTEX na água, aumentando a sua dissolução e dispersão pelo solo, e em águas subterrâneas. Vários autores, dentre eles Guinter (2000) e Corseuil & Marins (1997), indicam que a presença de etanol aumenta o impacto ambiental no caso de um derramamento de gasolina comercial (SILVA, 2002). Principalmente devido aos compostos aromáticos BTX, que apresentam toxicidade crônica, mesmo em pequenas concentrações (da ordem de µg. L⁻¹; SILVA, 2002) e por apresentarem concentrações razoáveis na gasolina, são monitorados ambientalmente.

A toxicidade dos compostos aromáticos BTX ocorre, principalmente por serem depressores do sistema nervoso central e a exposição contínua destes pode causar câncer, leucopenia, vertigens, tremores entre outros distúrbios (PENNER, 2000; TROVÃO, 2006). A inalação destes compostos em altas concentrações estimula inicialmente o sistema nervoso central e, em seguida, o deprime, podendo produzir assim importante ação tóxica na medula óssea, como leucemia (SILVA, 2002). Segundo Tiburtius *et al.* (2004), as investigações de poluição de aromáticos no ar, destacam que os hidrocarbonetos aromáticos como os BTX provocam danos à saúde, principalmente devido à toxicidade e ou mutagenicidade ou carcinogenicidade.

Muitos dos efeitos agudos da inalação do petróleo são atribuídos à ação dos hidrocarbonetos voláteis, como o benzeno, *n*-hexano, *n*-pentano, tolueno e xilenos (CAIRNEY *et al.* 2002). Quando estes voláteis são inalados, uma pequena fração é exalada no ar sem alteração e o resto é convertido em metabólitos hidrofílicos antes de ser excretado na urina. A meia vida destes metabólitos no corpo pode alcançar 7,5 horas para o tolueno e de 9 a 24 horas para o benzeno (CAIRNEY *et al.* 2002).

As intoxicações causadas pela inalação de petróleo e seus derivados incluem agitação, relaxamento, comportamento agressivo e raiva. Também são observados sintomas semelhantes aos provocados pelo consumo de álcool etílico como: pronúncia confusa das palavras; andar cambaleante; impulsividade e conduta desinibida. Doses maiores podem induzir a alucinações, delírios, inconsciência, ataques e até mesmo ao coma (CAIRNEY *et al.*, 2002).

A inalação de tolueno está associada a sintomas de síndrome neural (ex.: convulsões), déficit cognitivos (ex.: apatia), falta de atenção e memória. Também pode causar sintomas de euforia, como risadas, alternadas a crises de choro, confusão e até mesmo alucinações (RAIKHLIN-EISENKRAFT *et al.*, 2001). A inalação de tolueno ou xilenos pode induzir distúrbios no modo de falar, na visão, audição, no controle dos músculos e outros, além do que a associação entre benzeno e xilenos pode gerar tumores cerebrais (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

3.2 CONTAMINAÇÕES EM POSTOS DE COMBUSTÍVEIS

3.2.1 VAZAMENTOS DOS COMBUSTÍVEIS NOS POSTOS

Os vazamentos de combustíveis nos postos ocorrem, na grande maioria dos casos, tanto em contaminações superficiais provocadas por constantes e sucessivos derrames junto às bombas e bocais de enchimentos dos reservatórios de armazenamento, como pelos vazamentos em tanques de armazenamento subterrâneos (TAS). Geralmente são percebidos após o afloramento do produto em galerias de esgoto, redes de drenagem de águas pluviais, no subsolo de edifícios, em túneis, escavações e poços de abastecimento de água. A ocorrência de vazamentos de TAS só é identificada, na maioria dos casos, quando uma fonte de captação de água é contaminada (SILVA, 2002; MINDRISZ, 2006).

Os postos armazenam seus combustíveis em tanques de armazenamento subterrâneo (TAS) que tem vida útil entre 20 e 25 anos. Entretanto, estes TAS podem durar menos em contato com o solo, pois podem sofrer rachaduras ou corrosão externa gerando vazamentos de combustíveis no ambiente. Atualmente têm ocorrido vários casos de vazamentos de combustíveis, principalmente, devido aos TAS por estarem enterrados há mais de 30 anos (PENNER, 2000).

Os vazamentos em sistemas de armazenamento subterrâneo com combustível (SASC) têm sido objeto de crescente preocupação, em função dos riscos associados a esses eventos, tanto para a segurança e proteção à saúde da população, como para o ambiente. Além dos riscos de explosão e incêndio, esses vazamentos podem acarretar sérios impactos ambientais

devido à contaminação do solo e água subterrânea, comprometendo a qualidade dos mananciais e no uso para o abastecimento público (MINDRISZ, 2006). Devido a estes riscos, os órgãos ambientais começaram a legislar sobre postos de combustíveis.

3.2.2 Legislação de Posto de combustível

A primeira legislação para postos de combustíveis foi à resolução CONAMA nº 273 de 2000, que abordou o Programa de Licenciamento de Postos. Esta resolução do Conselho Nacional do Ambiente (CONAMA) estabeleceu uma série de requisitos. Entretanto, esta foi alterada posteriormente pela resolução CONAMA nº 319, de 4 de dezembro de 2002, que passa a considerar os postos de combustíveis como empreendimentos potencialmente poluidores estando submetidos a licenciamento prévio de suas instalações (licenciamento ambiental e a certificação dos equipamentos de acordo com as normas da ABNT e do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), e pelo plano de encerramento de suas atividades, no caso de desativação, a serem aprovados por órgãos ambientais competentes.

Essa legislação de 2002 também exige de postos com mais de 25 anos de funcionamento, a reforma total de seus equipamentos. E, na fase do licenciamento do empreendimento do posto de combustível, os equipamentos e os sistemas de armazenamento e de abastecimento são testados e ensaiados para comprovar inexistência de vazamentos (CONAMA, 2007).

3.2.3 Levantamento de áreas contaminadas com combustível

Levantamentos de áreas contaminadas com combustível por agências ambientais do governo federal e dos estados indicam que lençóis freáticos na localidade, e nos arredores de postos de gasolina são frequentemente atingidos por vazamentos oriundos dos TAS, passando despercebidos, por ocorrerem em pequenas quantidades (MINDRISZ, 2006). Entretanto, são justamente os vazamentos mínimos que maiores problemas causam às reservas hídricas subterrâneas, na medida em que o combustível vai se infiltrando lentamente, vencendo a

resistência do solo e também, por sua tendência de permanecer longo tempo sem detecção, encharcando o solo e contaminando as águas subterrâneas (FERNANDES, 1997; MINDRISZ, 2006).

Em 1996, a prefeitura local, da cidade de Joinville do Estado de Santa Catarina, realizou estudos de monitoramento de 65 postos de combustíveis da cidade e constatou que somente um deles não causava algum tipo de contaminação no lençol freático (CORDAZZO, 2000). A grande quantidade de postos de serviços com tanques de armazenamento subterrâneo (TAS) de combustíveis com possibilidade de vazamento faz dessa atividade uma das principais fontes de poluição das águas subterrâneas nos perímetros urbanos. Além disso, nas zonas urbanas, um dos principais poluentes dos solos é a gasolina derramada nos postos de serviço (CETESB, 2006).

Em São Paulo foi criado o cadastro de áreas contaminadas da CETESB em 2002 que divulgou pela primeira vez a lista de áreas contaminadas, registrando a existência de 255 áreas contaminadas no Estado de São Paulo. Em 2006 foram identificadas 1.822 áreas contaminadas no Estado, das quais 1.352 (mais de 74%) pertenciam a postos de combustíveis. Em novembro de 2008, foram registradas 2.514 áreas contaminadas, das quais 1.953 eram devido a postos de combustíveis (78% do total; CETESB, 2008), e em 2009, foi verificado que o percentual de áreas contaminadas dos postos de combustíveis aumentou 1%, em relação a 2008, devido a isto novas legislações estão surgindo.

3.2.4 Legislação de área contaminada ou valores de interdição

No Brasil, ainda não há uma legislação em nível federal para valores de interdição que exijam remediação de área contaminada. Algumas leis existem somente em níveis locais, como no Estado de São Paulo. A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), de São Paulo, vem aperfeiçoando o procedimento para gerenciamento de áreas contaminadas, definido inicialmente em 2000, com o objetivo de agilizar a implementação das medidas de intervenção.

Os Valores de interdição são concentrações de substâncias químicas que fornecem orientação sobre a qualidade de solo e de água subterrânea, e são utilizados como instrumentos para prevenção e controle da contaminação, e gerenciamento de áreas

contaminadas sob investigação. Em 26 de outubro de 2001, a CETESB publicou a primeira lista de valores orientadores para Solos e Águas Subterrâneas para o Estado de São Paulo, contemplando 37 substâncias. Em 2005 contemplou 84 substâncias, sendo definidos três valores orientadores para solo e água subterrânea (CETESB, 2005):

Valor de Referência de Qualidade - VRQ é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea, que define um solo como limpo ou a qualidade natural da água subterrânea.

Valor de Prevenção - VP é a concentração de determinada substância, acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea.

Valor de Intervenção - VI é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana considerada um cenário de exposição genérico. Para o solo, foram estabelecidos cenários de exposição Agrícola com Área de Proteção Máxima (APMax), Residencial e Industrial.

A área será classificada como área contaminada sob investigação quando houver constatação da presença de contaminantes no solo ou na água subterrânea em concentrações acima dos Valores de Intervenção, indicando a necessidade de ações para resguardar os receptores de risco, devendo seguir os procedimentos de gerenciamento de áreas contaminadas.

A CETESB (2005), de acordo com a legislação vigente no Estado de São Paulo, tem a atribuição de prevenir e controlar a poluição dos solos e águas subterrâneas, conforme este órgão os valores de interdição dos compostos BTX da gasolina em solos e água podem ser visualizados na Tabela 3.1. O órgão ambiental do Estado do Rio Grande do Sul, a Fundação de Proteção do Ambiente (FEPAM) vem utilizando estes valores.

Tabela 3.1 Valores de prevenção e intervenção dos compostos BTX presentes em solo e água

Substâncias	SOLOS (mg kg ⁻¹ peso seco)			ÁGUA (µg L ⁻¹)	
	Prevenção	Intervenção em Área:			Intervenção
		Agrícola	Residencial	Industrial	
Benzeno	0,03	0,6	0,08	0,15	5
Tolueno	0,14	30	30	75	700
Xilenos	0,13	25	30	70	500

Fonte: CETESB (2005)

A legislação tem se tornado cada vez mais restritiva, em áreas contaminadas que contenham água superficial ou subterrânea. Tanto que, para a água ser considerada potável no Brasil, a Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde determina que os limites máximos permitidos para benzeno, tolueno e xilenos são de: 5, 40 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Os Valores de intervenção para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo, são considerados como uma primeira etapa nas ações de monitoramento da qualidade, de prevenção à poluição e de diagnóstico de áreas suspeitas de contaminação, remetendo a avaliação de risco, caso a caso, para as áreas contaminadas (CASARINI *et al.*, 2001; CETESB, 2005).

3.2.5 Análises de risco

A análise de risco é uma ferramenta na tomada de decisões sobre as metas de remediação baseada nos resultados obtidos em Avaliações de Riscos à Saúde Humana e ao Ambiente, onde os padrões são estabelecidos, considerando-se as condições e os riscos do local contaminado. Para recuperar uma área impactada altos custos são envolvidos nos processos. A análise de risco serve como uma ferramenta fundamental de seleção de técnicas de remediação específicas, e gera menores custos. Esta ferramenta foi inicialmente desenvolvida nos Estados Unidos e na Holanda, que utilizaram metodologias de avaliação de áreas impactadas, principalmente de solos (SCHNEIDER, 2005).

Na avaliação do risco de uma área impactada por derramamento de petróleo e derivados são necessárias informações sobre a distribuição dos contaminantes, no solo e águas subterrâneas, dados sobre os níveis de exposição dos receptores e toxicidade dos compostos químicos de interesse. Através de análises químicas do solo e da água subterrânea são determinadas as concentrações dos contaminantes, sendo que a detecção e quantificação são geralmente conduzidas para os compostos de maior toxicidade e mobilidade.

O Estado de São Paulo possui uma proposta de metodologia de avaliação de risco em caráter preliminar, e os outros Estados do Brasil não possuem metodologias regulamentadas. Os órgãos de controle ambiental no Brasil têm aceitado e recomendado à avaliação de riscos baseada nas metodologias de outros países, tais como os Estados Unidos, Canadá, Alemanha e Holanda. Neste sentido, a Norma Americana ASTM E 1739-95 (*Standard Guide for Risk-*

basead Corrective Action for Petroleum Releases) conhecida também por ACBR (Ação Corretiva Baseada no Risco) é uma das principais referencias metodológicas utilizadas no Brasil, para derramamentos de petróleo e derivados. Segundo esta metodologia, o risco é definido como tendo a probabilidade de um indivíduo, em uma população, sofrer efeitos em função da exposição a um contaminante, considerando as principais vias de exposição como o contato dérmico, a ingestão ou a inalação de vapores ou a poeira (SCHNEIDER, 2005).

Além disso, com a implementação de análise de risco são conduzidos os critérios, definidos nos locais prioritários potencialmente poluidores e tecnologia específica de remediação que serão controladas pelos órgãos ambientais (CORSEUIL & MARINS, 1998). A importância de definir a tecnologia a ser empregada na fase de diagnóstico permite que os responsáveis pela remediação cogitem, ou não, em empregar processos para acelerar a biodegradação (biorremediação), ou até para deixar, em alguns casos possíveis, que ocorra a atenuação natural monitorada, quando o próprio meio se encarrega de degradar os poluentes ao longo dos anos sem interferência humana. O último caso é possível, principalmente, quando uma análise consegue definir que a contaminação não representa risco à sociedade a curto ou médio prazo (SCHNEIDER, 2005).

Segundo a CETESB (2010), assim como nos outros países, a legislação brasileira exige que áreas degradadas pela contaminação devam ser remediadas, para minimizar o impacto ambiental, restaurar os ecossistemas e evitar explosões, caso o contaminante apresente tal risco. Para isto são necessários diagnósticos, análises e monitoramento do impacto, e medidas remediadoras, que podem consumir grande volume de recursos econômicos de empresas e de agências governamentais. Nestes casos, a CETESB sugere o gerenciamento de áreas contaminadas.

3.2.6 Gerenciamento de áreas contaminadas com combustível

Dentro do contexto de gerenciamento de áreas contaminadas (AC), as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas por derramamentos de combustíveis vêm crescendo entre órgãos do governo e opinião pública. Esta preocupação é intensificada devido ao grande número de empreendimentos, a estocagem de produtos cujos componentes são altamente tóxicos e a dificuldade na detecção de vazamentos em tanques subterrâneos (ABDANUR, 2005).

A distribuição em percentual das áreas contaminadas em 2008, no Estado de São Paulo, em relação à classificação estabelecida no novo procedimento de gerenciamento de áreas contaminadas (como: áreas contaminadas, AC; contaminadas sob investigação, AI em processo de monitoramento para reabilitação, AMR; e reabilitadas, AR); podem ser vistas no registro da CETESB (2008) na Figura 3.1.

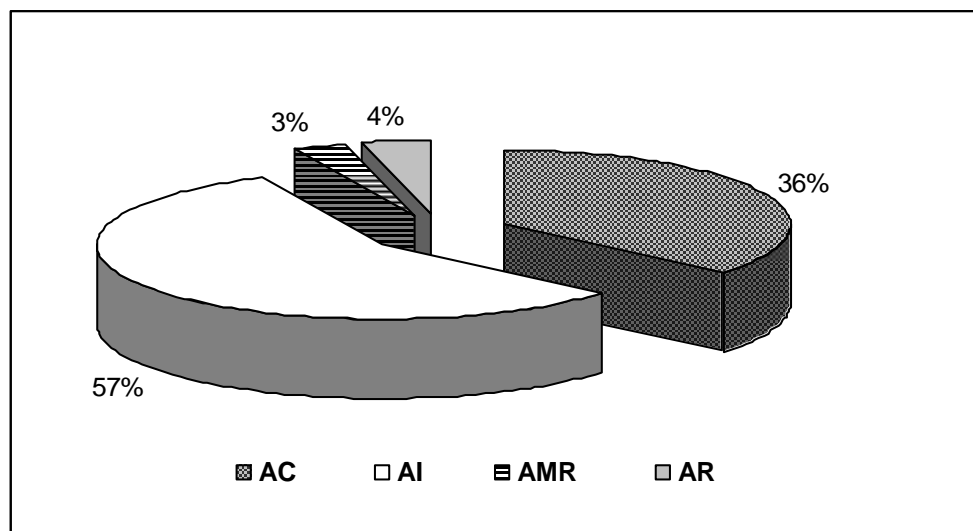


Figura 3.1 Registro em percentual de áreas contaminadas (AC), contaminadas sob investigação (AI), em processo de monitoramento para reabilitação (AMR) e reabilitadas (AR), no Estado de São Paulo. (Fonte: CETESB, 2008)

Na figura 3.1 se verifica que a área classificada como **AC** totaliza 36% do total de áreas registradas, ou seja, nestas deverão ser ou já estão sendo implantadas medidas de remediação em conjunto ou isoladamente com medidas de controle institucionais, ou medidas de controle de engenharia. Nas áreas classificadas como **AI** (contaminada sob investigação), **57%**, estão sendo realizadas investigações e avaliações com o objetivo de definir a necessidade de implantação de medidas de intervenção. Também se verifica que as áreas consideradas aptas para o uso declarado, isto é, as áreas reabilitadas, constituem 3% da área total e as em processo de monitoramento para reabilitação 4%.

Um novo procedimento de gerenciamento de áreas contaminadas foi estabelecido com nova classificação de áreas contaminadas (CETESB, 2007). As novas classes são as seguintes:

- **Área Contaminada sob Investigação (AI);**
- **Área Contaminada (AC);**
- **Área de Monitoramento para Reabilitação (AMR);**

- Área Reabilitada (AR).

O valor de intervenção (ou legislação) adotado pela CETESB indica “o limite de contaminação” do solo e água subterrânea acima do qual há risco potencial à saúde humana que indica quando uma área é contaminada (AC). Ele será usado em caráter corretivo no gerenciamento de áreas contaminadas e quando for excedido irá requerer alguma forma de intervenção na área avaliada, de forma a interceptar as vias de exposição, devendo ser efetuada uma avaliação de risco caso a caso (CASARINI *et al.*, 2001). A seguir serão enfatizados os critérios para remediar uma área contaminada.

3.3 CRITÉRIOS PARA REMEDIAR UMA ÁREA CONTAMINADA

Os critérios a serem utilizados para remediar uma área contaminada (AC) são complexos e específicos, para cada situação, devendo ser considerados vários aspectos conforme Figura 3.2. Logo, quando uma área contaminada é avaliada como de risco deve ser feito um estudo de análises de risco para posteriormente ver a possibilidade de a área ser remediada.

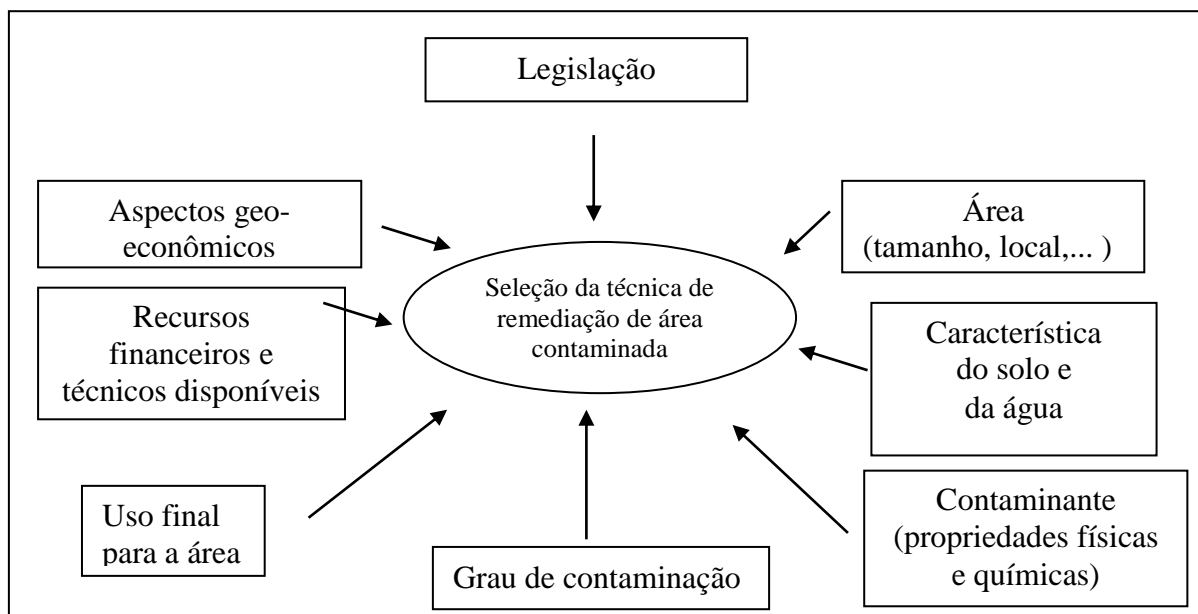


Figura 3.2 Aspectos a serem considerados na seleção de técnicas de remediação. Fonte: ACCIOLY & SIQUEIRA (2000)

Remediar é o conjunto de práticas ou processos que visam à atenuação ou correção do impacto de agentes contaminantes, para garantir a funcionalidade do ecossistema, bem como evitar a expansão da contaminação (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000).

Na Figura 3.2 observam-se vários critérios, dentre estes, o grau de contaminação de um solo e a capacidade de transporte e infiltração de um contaminante num solo, os quais irão depender de diversos fatores que estão relacionados com a composição do contaminante, as proporções de fases que compõem o solo, as características físico-químicas do solo, tais como: porosidade, permeabilidade, condutividade hidráulica e as interações físico-químicas entre os constituintes do solo e do contaminante.

Conforme a CETESB (2001), o solo atua frequentemente como um “filtro”, tendo a capacidade de depuração, imobilizando grande parte das impurezas nele depositadas. No entanto, essa capacidade é limitada, podendo ocorrer alteração da qualidade do solo, devido ao efeito cumulativo da deposição de poluentes. Logo, a natureza do contaminante e a matriz do solo determinam o tipo de tratamento (ou remediação) mais apropriado (SERENA *et al.*, 1999; GUINGUER, 2000).

A capacidade de transporte do contaminante no meio vai depender de sua solubilidade em água. Além disso, o contaminante pode evaporar mais, caso for composto por compostos voláteis de alta pressão de vapor e baixo ponto de ebulição, visto que volatilizam mais quanto maior a temperatura do meio. O contaminante também pode ser mais ou menos sorvido no solo dependendo do tipo de solo (como textura e porosidade), das propriedades físico-químicas do contaminante (como densidade, pressão de vapor, ponto de ebulição, solubilidade, coeficiente de partição e outros) e do teor de umidade do solo.

A remediação também depende das propriedades dos contaminantes (ex: gasolina e de seus compostos BTX) e do comportamento dos mesmos no ambiente. Segundo Cunha *et al.* (2008), a fração aromática BTX dos derivados de petróleo, como da gasolina, por exemplo, é, talvez, do ponto de vista ambiental, a que causa maior preocupação.

3.3.1 Propriedades dos hidrocarbonetos BTX e o comportamento destes no ambiente

Os hidrocarbonetos BTX são considerados os de maior importância no contexto ambiental uma vez que esses compostos são pouco solúveis em água, mas os mais solúveis dos hidrocarbonetos da gasolina, e são tóxicos e legislados. O benzeno é classificado como

carcinogênico, enquanto tolueno e xileno são classificados como tóxicos sistêmicos. Portanto, esses compostos são indicadores específicos usados para caracterizar uma contaminação por gasolina. Os hidrocarbonetos benzeno, toluenos e xilenos (BTX) cada um deles tem densidade menor do que 1 mg mL^{-1} à 20°C , logo tendem a flutuar na água na forma de uma pluma de contaminação.

O benzeno é o mais solúvel em água dessa categoria (1780 mg L^{-1} à 20°C). O tolueno tem uma solubilidade de 515 mg L^{-1} à 20°C e os isômeros do xileno possuem diferentes solubilidades: 175 mg L^{-1} para o orto e meta xilenos e 198 mg L^{-1} atribuída ao para-xileno. A pressão de vapor do benzeno, por exemplo, é de 22 mm de Hg a 20°C . À temperatura ambiente, o benzeno é um líquido, volátil, estável e incolor. Tem o odor característico dos hidrocarbonetos aromáticos, ponto de ebulição relativamente baixo, altamente inflamável, e pouco solúvel em água, mas miscível com a maior parte dos solventes orgânicos (SILVA, 2004). Quando o benzeno é descartado em água, ocorre uma rápida volatilização. Sendo que, não se deposita significativamente em sedimentos, não é bioconcentrado em organismos marinhos e nem hidrolisado.

O benzeno apresenta tempo de meia vida de dezessete dias devido à fotodegradação que contribui para sua remoção em águas frias, com baixos nutrientes ou outras condições menos propensas à degradação microbiana (SILVA, 2002). Também foi testado que o tempo de degradação de benzeno em um rio aeróbico é de dezesseis dias (SILVA, 2002). Por possuir maior mobilidade no solo e por ser altamente carcinogênico, nos estudos da remediação do solo por BTEX, o benzeno tem recebido especial atenção.

De acordo com a densidade do hidrocarboneto existem dois tipos de fases NALPs (*non-aqueous liquidous phase* ou fase líquida não aquosa): os que possuem em relação a água, maior densidade que são DNAPL (*dense non-aqueous phase liquid* ou fase líquida densa não aquosa) como os compostos organoclorados, e os de menor densidade denominados de LNAPL (*light non-aqueous phase liquid* ou fase líquida não aquosa leve) como os hidrocarbonetos da gasolina (GUINTER, 2000).

A gasolina é classificada como um dos principais tipos de LNAPL, definida como um líquido não aquoso mais leve que a água (GUINGUER, 2000; MARQUES, 2007), pois tem densidade na faixa de $0,72$ a $0,78 \text{ mg mL}^{-1}$ que é menor do que da água. Logo como a gasolina tem menor densidade tende a flutuar sobre água na forma de uma pluma de contaminação.

De acordo com Corseuil & Marins (1997), a gasolina por ser pouco solúvel em água está presente no subsolo como líquido de fase não aquosa (NAPLs). Seus constituintes de

maior solubilidade são os compostos BTEX. Para Penner (2000), os BTEX estão em concentrações significativas nos combustíveis derivados do petróleo e apresentam maior solubilidade em água. Além disso, são consideradas as frações mais móveis dos combustíveis, e, portanto, são os contaminantes que primeiro irão atingir o aquífero ou serão inalados (MANCINI, 2002).

Segundo Mancini (2002), a solubilidade em água destes compostos determina uma disponibilidade maior e imediata para os seres vivos, além de dificultar outros processos de remoção como a volatilização e a associação com o material particulado. Estes compostos BTEX são utilizados como parâmetros para quantificar e qualificar uma contaminação, (OLIVEIRA, 1992).

Quando ocorre um vazamento em água subterrânea, uma das primeiras consequências é a percepção de condições anaeróbias, devido os níveis crescentes de respiração microbiana nesta zona saturada. Sob condições anaeróbias, a degradação que ocorre com os BTEX, segue a suscetibilidade de xileno>tolueno>benzeno. Este dado é importante, pois mostra que o benzeno, por ser o mais tóxico e recalcitrante dos BTEX, pode migrar mais no meio (TROVÃO, 2006). Por isso, o benzeno é classificado por Fetter (2001) como poluente de alta mobilidade na água e solo, enquanto que o tolueno e o composto *o*-xileno estão classificados como de moderada mobilidade.

Os compostos etilbenzeno, *p*-xileno e *m*-xileno são classificados com baixa mobilidade no solo e na água subterrânea. Outro aspecto importante é que a sorção do composto benzeno na subsuperfície aumenta, à medida que aumentam os teores de matéria orgânica do solo, (ABDANUR, 2005). Enquanto que, o padrão de potabilidade do benzeno estabelecido pelo Ministério da Saúde (MS) é de 5 µg L⁻¹, em qualquer vazamento, as concentrações de compostos tóxicos chegam a valores três mil vezes superiores a esse (SILVA, 2002).

Experiências têm demonstrado que diferentes formulações na gasolina podem afetar o destino e o transporte dos BTX. O uso do etanol como aditivo na formulação da gasolina tem aumentado mundialmente, e como ele é completamente miscível em água, pelo efeito conhecido como co-solvente, aumenta a solubilização e a migração dos BTX. Como a gasolina brasileira recebe a adição de 20 a 25% de álcool etílico anidro, ocorre aumento em até 20 vezes da solubilidade em água de determinados compostos como, por exemplo, o benzeno (BÈREAUD, 1997; HUNT & ALVAREZ, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Uma vez que o etanol é completamente solúvel em água, a sua concentração tende a ser maior que a dos compostos BTX em águas subterrâneas contaminadas com misturas de

etanol e gasolina. Como os compostos altamente solúveis têm um menor potencial de sorção no solo, o etanol tende a ter mobilidade maior que a dos compostos BTX na água subterrânea. Este efeito reduz a polaridade da fase aquosa, ocasionando a redução no coeficiente de atividade, permitindo maior concentração dos compostos hidrofóbicos na fase aquosa (POWERS *et al.*, 2001).

3.3.2 Localização do contaminante no solo

O gerenciamento de uma área contaminada se dá geralmente a partir do conhecimento da fase que se encontra o contaminante no meio. O contaminante pode se apresentar no solo em três fases: 1- livre (produto livre e puro); 2 - sorvido (preso nas partículas); ou 3 - dissolvido (na água subterrânea). Segundo Guiguer (2000) existem as fases: líquida, dissolvida e de vapor; enquanto Oliveira (1992) classifica em fases: sorvida, livre e dissolvida. Entretanto, segundo Mariano (2006 a, b), a mesma considera que o transporte dos hidrocarbonetos no solo é caracterizado pela formação de quatro fases distintas que regulam o processo de migração do produto como: fase líquida residual (ou fase sorvida), fase líquida livre, fase dissolvida e fase de vapor, buscando assim um melhor entendimento do assunto. O tipo de remediação dependerá de como o contaminante se encontra no solo.

A fase em que os hidrocarbonetos se encontram no solo regula quais fenômenos governam o processo de migração, onde essas fases são redistribuídas no solo por vários processos de transferência e transformação. A quantidade de produto que irá atingir o lençol freático dependerá da sua quantidade inicial, da distância vertical que separa o ponto de vazamento ou derramamento do lençol freático e da quantidade residual de produto que ficará retida pelo solo (OLIVEIRA, 1992).

Além, das fases do contaminante no solo, a base do gerenciamento da área contaminada (AC) se dá por dois processos, os quais são: Identificação da AC e remediação da AC. O processo de identificação da AC é constituído de quatro etapas: definição da região de interesse, identificação de área potencialmente contaminada, avaliação preliminar e a investigação confirmatória. O processo de recuperação da AC será elaborado em função da análise de risco, caso seja necessária. O processo de recuperação de uma área contaminada deve contemplar a zona saturada (ou não saturadas, ou ambas) contaminada, o local

contaminado (no local, *in situ*, e/ou fora do local, *ex situ*) e um projeto de remediação (COUTINHO & GOMES, 2006).

O projeto elaborado é utilizado como base técnica e avaliado pelo órgão gerenciador ou órgão de controle ambiental. O órgão de controle ambiental avalia a possibilidade de autorização ou não da implantação do projeto de remediação e a operação do mesmo. Este deve selecionar uma ou mais técnicas de remediação para elaborar o plano típico de remediação que se preocupa basicamente com quatro itens, que são:

- 1- contenção do produto livre ou dissolvido;
- 2- remoção do produto livre;
- 3- remoção do produto dissolvido;
- 4- remoção do produto sorvido (COUTINHO & GOMES, 2006).

A contenção e a remoção do produto livre geralmente são realizadas através de sistemas de poços ou trincheiras de bombeamento e para a remoção do produto sorvido ao solo na zona não saturada e dissolvido na água subterrânea existem diferentes critérios e técnicas de remediação.

3.4 TÉCNICAS DE REMEDIAÇÃO DE ÁREA CONTAMINADA COM COMBUSTÍVEL

As técnicas de remediação são empregadas após diagnósticos de riscos ambientais que indiquem ou não emprego de processos que acelerem a biodegradação dos poluentes em solo e/ou água. Estas técnicas geralmente são direcionadas a cada uma das zonas de uma área contaminada conforme o tratamento *ex-situ* (necessita retirar o material contaminado para posterior tratamento) ou *in-situ* (trata no próprio local o material contaminado), que são visualizadas na Tabela 3. 2. Além disso, a remediação da zona não saturada (solo ou meio poroso) tem por objetivo evitar a contaminação da zona saturada (água subterrânea) e estas tecnologias a serem indicadas dependerão do tipo de contaminante presente no meio.

Segundo Tiburtius & Zamora (2004) a forma mais comum e amplamente usada na remediação de águas subterrâneas contaminadas por compostos voláteis consiste em um tratamento denominado *pump and treat* (bombear e tratar), que é um tratamento físico-químico. Neste tratamento, a água contaminada por poluente orgânico é retirada por

bombeamento, submetida a um processo de remoção de poluentes e descartada, e às vezes, volta ao reservatório natural.

Tabela 3. 2 Técnicas de remediação em função da zona do meio e do tipo de tratamento

Zona	Tratamento	Técnica de remediação
Não saturada (solo ou meio poroso)	<i>Ex-situ</i>	Lavagem de solo (<i>soil wash</i>)
		Incineração
		Biorremediação (biopilhas, <i>landfarming</i> , .)
	<i>In-situ</i>	Lavagem de solo (<i>soil flushing</i>)
		Extração de compostos orgânicos voláteis (pela extração de vapor do solo, bioventilação ou <i>bioventing</i>)
		Biorremediação
Saturada (água subterrânea)	<i>Ex-situ</i>	Carvão ativado
		Coluna de aeração (aspersão de ar ou <i>air stripping</i>)
		Biorremediação
	<i>In-situ</i>	Bombeamento e tratamento (<i>pump and treat</i>)
		Tratamento químico (injeção de oxidantes, barreiras reativas etc)
		Extração de compostos orgânicos voláteis (<i>air sparging</i> , <i>bioventing</i>)
		Biorremediação

Fonte: adaptada da fonte de COUTINHO & GOMES (2006)

Existem técnicas de remediação utilizadas em zona não saturada com tratamentos físicos, químicos e biológicos. Os tratamentos físicos mais utilizados em solo contaminados são: aspersão de ar, (*ar stripping*, TIBURTIUS & ZAMORA, 2004), extração de vapor do solo (EVS), sorção com carvão ativado (TIBURTIUS & ZAMORA, 2004) e bioventilação (com oxigênio segundo, PALA *et al.*, 2002, MALINA *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2004; SHEWFELT *et al.*, 2005; ou com peróxido de hidrogênio, (CUNHA & LEITE, 2000; SHIM *et al.*, 2002). Embora sejam eficientes estes processos de sorção de carvão apresentam sérias limitações, principalmente relacionadas com o seu caráter não destrutivo. O processo de sorção leva a geração de fases sólidas saturadas com contaminantes. Enquanto, que a remoção de voláteis por aspersão de ar ou bioventilação são os mais usados, implicam na liberação de gases poluentes para atmosfera.

Os tratamentos químicos mais utilizados são: recuperação de produto livre, extração com solventes e a extração multifásica. Como estes métodos têm elevados custos geralmente

são utilizados em último caso. Dos tratamentos biológicos citados pela USEPA (2000), todos são considerados como de biorremediação. Os tratamentos biológicos que perfizeram 28% foram distribuídos da seguinte maneira: biorremediação (58%), bioventilação/lodos ativados (14%), fitorremediação (10%), biopilhas/ compostagem (6%) e outros (2%).

Os tratamentos biológicos (ou biorremediação) que têm sido usados com mais frequência para remediar áreas contaminadas com gasolina, em pequena e em grande escala conforme a literatura, são: atenuação natural (CORSEUIL *et al.*, 1998, 1999; TIBURTIUS & ZAMORA, 2004; DIEL & LOKMAN, 2007), bioestimulação (SHIM *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2002; PALA *et al.*, 2002; TIBURTIUS & ZAMORA, 2004; DIEL & LOKMAN, 2007), e bioaumentação, (KIM *et al.*, 2002; PRANTERA *et al.*, 2002; RAHMAN *et al.*, 2002; SHIM *et al.*, 2002; TIBURTIUS & ZAMORA, 2004).

3.5 BIORREMEDIAÇÃO

Segundo Accioly & Siqueira (2000), biorremediação é uma estratégia ou processo que emprega micro-organismos (nativos ou inoculados), plantas ou enzimas, ou nutrientes para acelerar degradação dos contaminantes no solo ou na água. A aplicação desta técnica combina processos biológicos naturais (com conhecimento de microbiologia, de bioquímica e de fisiologia vegetal) e engenharia que tendem a gerar condições favoráveis de imobilizar, mineralizar ou auxiliar a extração do contaminante no solo e/ou na água.

A biorremediação é baseada na capacidade dos micro-organismos (bactérias, fungos, algas) e das plantas em alcançar o material contaminante no solo ou na água e converter este em uma molécula menos tóxica, como o dióxido de carbono e a água ou imobilizar o contaminante em uma forma não solúvel ou mais estável (DIELS & LOOKMAN, 2007). As estratégias frequentemente usadas para a biorremediação no ambiente são: atenuação natural; bioestimulação, bioventilação, bioaumentação, *landfarming* e fitorremediação (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000; COUTINHO & GOMES, 2006).

A atenuação natural, de uma contaminação por hidrocarbonetos, pode ocorrer através de diversos processos, incluindo a biodegradação *in situ* por micro-organismos presentes naturalmente no local, diluição, dispersão, sorção e volatilização. Este processo de atenuação natural é mais usado em áreas rurais ou em áreas sem risco a população, pois pode demorar

mais dependendo do meio e do poluente e devido aos gases que são gerados durante o mesmo. Entre estes eventos a biodegradação é o único processo que modifica o hidrocarboneto, resultando na redução da massa do poluente (BHUPATHIRAJU *et al.*, 2002). Durante este processo os micro-organismos nativos presentes no ambiente contaminado degradam ou precipitam o poluente, através do consumo natural dos doadores e aceptores de elétrons presentes. Contudo, em vários casos os aceptores de elétrons, como o oxigênio, não estão em quantidades suficientes e são rapidamente consumidos (DIELS & LOOKMAN, 2007).

A atenuação natural consiste na biodegradação intrínseca ou natural pelos micro-organismos nativos do solo ou da água (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000), ao passo que na bioestimulação a biota degradadora recebe aporte de nutrientes e aeração para estimular seu crescimento. A bioestimulação consiste na adição de nutrientes como nitrogênio, fósforo ou até fonte de carbono como glicose, para estimular a microbiota nativa. A bioventilação é uma forma de bioestimulação por meio de adição de gases como oxigênio ou peróxido de hidrogênio, para gerar condições aeróbias e aumentar a atividade microbiana (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000).

A bioaugmentação envolve a inoculação de culturas puras e/ou de consórcios microbianos, contendo micro-organismos pré-selecionados, com potencial de degradação e competição, para metabolizar compostos específicos, podendo ser adicionado inóculo ao local contaminado, visando aumentar o potencial de degradação (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). RAHMAN *et al.*, (2002), observaram que a adição de um consórcio em uma remediação *in situ*, pode aumentar o número de bactérias degradadoras, no entanto, nos estudos destes com bioaugmentação *in situ* não foi observado diferença na quantidade de hidrocarboneto degradado em relação à atenuação natural. Isto pode ter ocorrido porque o inóculo não se adaptou totalmente a degradação do poluente no ambiente estudado. Em geral, a bioaugmentação é mais apropriada para tratamentos de contaminantes muito persistentes, em contaminações recentes e onde se pretende aplicar a degradação acelerada.

O *landfarming* é definido como um processo de biorremediação que trata geralmente resíduos petroquímicos pela disposição dos mesmos na forma líquida ou sólida na camada arável do solo. Esta camada pode atingir até 0,5 m de profundidade e nesta concentram-se 90% dos micro-organismos que usam os contaminantes como fonte de energia e que podem transformá-los também por co-metabolismo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Para Boopathy (2000), neste tratamento os resíduos são aplicados na camada superficial do solo, onde geralmente se realiza a biodegradação pela grande maioria da população heterotrófica.

Para isso, o solo é arado e gradeado para promover a mistura uniforme do contaminante e aeração (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000).

Os resíduos petroquímicos com concentração de até 70.000 mg kg⁻¹ (7%) em *landfarming* são reduzidos para 100-200 mg kg⁻¹, em poucos meses, desde que as condições físicas (umidade e aeração), químicas (presença de aceptores de elétrons) e biológicas (elevada atividade de heterotróficos), sejam adequadas. Para lodos de refinarias de petróleo, a biodegradação é favorecida quando os fatores (como tipo de solo, teor de matéria orgânica e da aplicação de nitrogênio) foram bem controlados (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O solo utilizado para o tratamento de *landfarming* deve apresentar textura intermediária, ou seja, nem argiloso, o que dificulta a aeração e incorporação do resíduo ao solo, nem arenoso o que permite a percolação do resíduo para camadas inferiores, além de normalmente serem solos com baixa atividade biológica e de reduzida capacidade de troca catiônica (CTC, ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000).

As condições químicas e a matéria orgânica do solo são importantes para a população microbiana co-metabolizante, que também atua na biodegradação de certos compostos do petróleo e de outros resíduos. Muitos contaminantes apresentam baixa degradabilidade e, assim necessitam da adição de surfactante (ou bisurfactantes que favorecem a biodisponibilidade do poluente a microbiota do meio), ou agentes pré-oxidantes, para reduzirem a recalcitrância e acelerar sua degradação pelos micro-organismos. Em condições ótimas de nutrientes (como por exemplo, a relação C:N:P de 70:5:1) a biodegradação de petróleo bruto ou lodo de refinaria no ambiente atinge 60 a 86%, em menos de um ano (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Entretanto, na literatura (PRANTERA *et al.*, 2002; PALA *et al.*, 2002; SABATÉ *et al.*, 2004; SPINELLI, 2005; BENTO *et al.*, 2005; SHEWFELT *et al.*, 2005; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; CORSEUIL *et al.*, 2009) existem muitas sugestões de relações de adição de nutrientes, para o solo e a água, o que indica que pré-testes devem ser feitos para se utilizar a melhor relação a ser adicionada nestes meios.

A biodegradação pode ser dividida em biorremediação microbiana e com plantas como a fitorremediação. As plantas adquirem tolerância a contaminantes quando expostas a eles, por longo período de tempo. Elas também desenvolvem estratégias diversas, como a biodegradação de compostos orgânicos e acúmulo de metais pesados em seus tecidos. A fitorremediação utiliza-se de plantas para remover, conter ou transformar contaminantes diretamente pela acumulação ou indiretamente pela ação dos micro-organismos rizosféricos (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). Entretanto, o maior potencial desta forma de tratamento é a biodegradação microbiana de compostos orgânicos biodegradáveis.

3.5.1 Estudos de Biorremediação em solo com gasolina pura ou comercial

Para a biorremediação de solo com gasolina em sistema fechado as concentrações (%) mais utilizadas, conforme as literaturas consultadas foram de: 1 e 5%, (CUNHA, 1996; SERENA *et al.*, 1999; CUNHA *et al.*, 2000; PANTRERA *et al.*, 2002). Em geral, as concentrações frequentemente usadas foram de 5% em sistema fechado (frasco de vidro) com o objetivo de verificar a degradação do poluente pela atividade microbiana (análise respirométrica) e pela redução dos compostos da gasolina (análise por cromatografia gasosa).

Foram observadas as concentrações de 5 e 10% de combustível em processos de biorremediação por atenuação natural, com 70% da capacidade de campo para 2 tipos de solos (arenoso e argiloso), com três distintos combustíveis: gasolina, óleo diesel e petróleo cru (LABUD *et al.*, 2007).

Nos experimentos de Nankoong *et al.* (2003) que utilizaram biofiltro de vapor com gasolina, a eficiência de remoção do benzeno foi a mais baixa entre os BTEX. A remoção de benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno (BTEX), e hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) foram respectivamente, de 85 e 80%, durante um período de 4 meses de estudo.

Para Rahman *et al.* (2002), a biorremediação de solo contaminado com gasolina, *ex situ* pelo processo de bioaugmentação, utilizando consórcio de bactérias com *Pseudomonas sp.*(DS 10-129) obtiveram uma redução de aproximadamente 67 e 78% de hidrocarbonetos (ou seja, TPH), em 60 dias. Nos experimentos de Cunha *et al.* (2004) em blocos cúbicos de solo (30 cm²) contaminados no centro com gasolina comercial (22% de etanol), a redução dos TPH pelos processos de atenuação natural e bioventilação (com 2 psi de oxigênio, 3 vez por semana), em 60 dias, foram de 74 e 98%, respectivamente.

Segundo Shewfelt *et al.* (2005), os resultados das análises de TPH de solos em processos de bioventilação com bioestimulação (com nitrogênio) contaminados com gasolina com TPH de 1800 mg kg⁻¹, em função do conteúdo de água do solo, em média, foi a seguinte: 1- em solos com 18 % de umidade, somente 12% de TPH permanecem e reduzem 88%, em 30 dias; 2- em solos com 21% de umidade, somente 25% de TPH permanecem e reduzem 75%, em 30 dias; 3- em solos com 9% de umidade, durante 15 dias, verificaram que 75% de TPH permaneceram e reduziu só 25%. Estes autores verificaram que os processos de bioestimulação (com diferentes relações de C:N e formas de nitrogênio), com bioventilação e com diferentes teores de umidades (9, 18 e 21%) em frascos respirométricos, apresentaram

melhores resultados com a forma de nitrogênio amônia, para relação C:N de 10:1, em solo com 18 % de umidade, nas condições estudadas (SHEWFELT *et al.*, 2005).

3.5.2 Estudos de Biorremediação em meio líquido com gasolina pura ou comercial

Conforme a literatura, as concentrações de gasolina mais observadas nos experimentos em escala piloto com meio líquido e água subterrânea, em sistemas fechados, foram de: 0,005% (SOLANO-SERENA *et al.*, 1999, com gasolina sintética), 1% (CUNHA & LEITE, 2000; PRANTERA *et al.*, 2002; WONGSA *et al.*, 2004), 5% (CUNHA & LEITE, 2000; ou 10 ou 15% MORAIS & TORNISIELO, 2004). Destas concentrações informadas na literatura, citada anteriormente, a mais utilizada em meio mineral foi de 1%. Trabalhos com concentrações de 5 e 10% de gasolina comercial em processos de biorremediação com meio líquido ou mineral, também foram desenvolvidos (CUNHA *et al.*, 1996).

Cunha & Leite (2000) utilizam concentração de 1 % de gasolina em meio mineral (100 mL com 5 g de solo), em frasco fechado de 500 mL, incubado por 3 dias a 30°C em *shaker* (150 rpm), para isolar micro-organismos. Estes autores, após isolar os micro-organismos utilizaram 5% gasolina (v m⁻¹), em meio mineral, com 5 g solo com inóculo ideal de 10⁶ UFC g⁻¹ de solo, com processos de bioestimulação (contendo: NH₄NO₃ e H₂O₂). No tratamento 1 (com solo contendo a microbiota nativa) e os demais 15 tratamentos, tiveram o processo de bioaumentação (inóculo de isolados ou de isolados na forma de consórcio, com 2, ou 3 ou 4 isolados) com o processo de bioestimulação. Estes tratamentos foram avaliados nos períodos de 0 e 72 horas. Os tratamentos 1 (com solo contendo a microbiota nativa) e 13 (consórcio com 3 isolados de cada, como a *Pseudomonas putida*, *P. cepacia* e a *P.alcaligenes*) apresentaram os melhores resultados na degradação dos compostos da gasolina como de: 53 e 446%, respectivamente. O tratamento 13 apresentou degradações maiores do que o tratamento 1, somente para as frações da gasolina com: C11 (88,7%); C12 (61,3%) e C13 (66,7%), em 72 horas.

Segundo Pranteria *et al.* (2002), as melhores taxas de degradação de hidrocarbonetos aromáticos da gasolina em solos ocorrem quando as bactérias dos isolados Gram-negativos 3 A e 5 B foram adicionadas. O isolado 3 A apresentou o melhor resultado, em 24 horas,

degradando os BTX em taxas de: 38, 48 e 54%, respectivamente. Neste experimento os compostos BTX não foram mais detectados com o isolado 3 A, após 30 dias de incubação.

Em uma contaminação de água subterrânea, em escala piloto, foram continuamente lançadas concentrações de 60 mg L⁻¹ dos compostos BTEX. O controle da migração dos BTEX, informado em função dos cálculos de massa de fluxo mostraram redução dos BTEX de: 93% na zona de redução de ferro e 5,6% dentro da zona de adição de nitrato. O restante 1,3% foi removido na zona de oxidação, na extremidade da pluma, no período de 3 anos (KAO *et al.*, 2000).

Devido aos BTX serem compostos muito tóxicos eles tem sido bem comentado na literatura em processos de biorremediação. São estudados individualmente ou na forma combinada (com dois ou três compostos juntos). Tanto que vários autores observaram que a presença de um dos compostos BTX na forma combinada pode favorecer a degradação ou inibição de um destes compostos, e que cada composto, quando sozinho, foram mais facilmente degradado, dependendo dos fatores do meio (SHIM *et al.*, 2002; OTÊNIO *et al.*, 2005).

3.6 FATORES QUE AFETAM A BIODEGRADAÇÃO

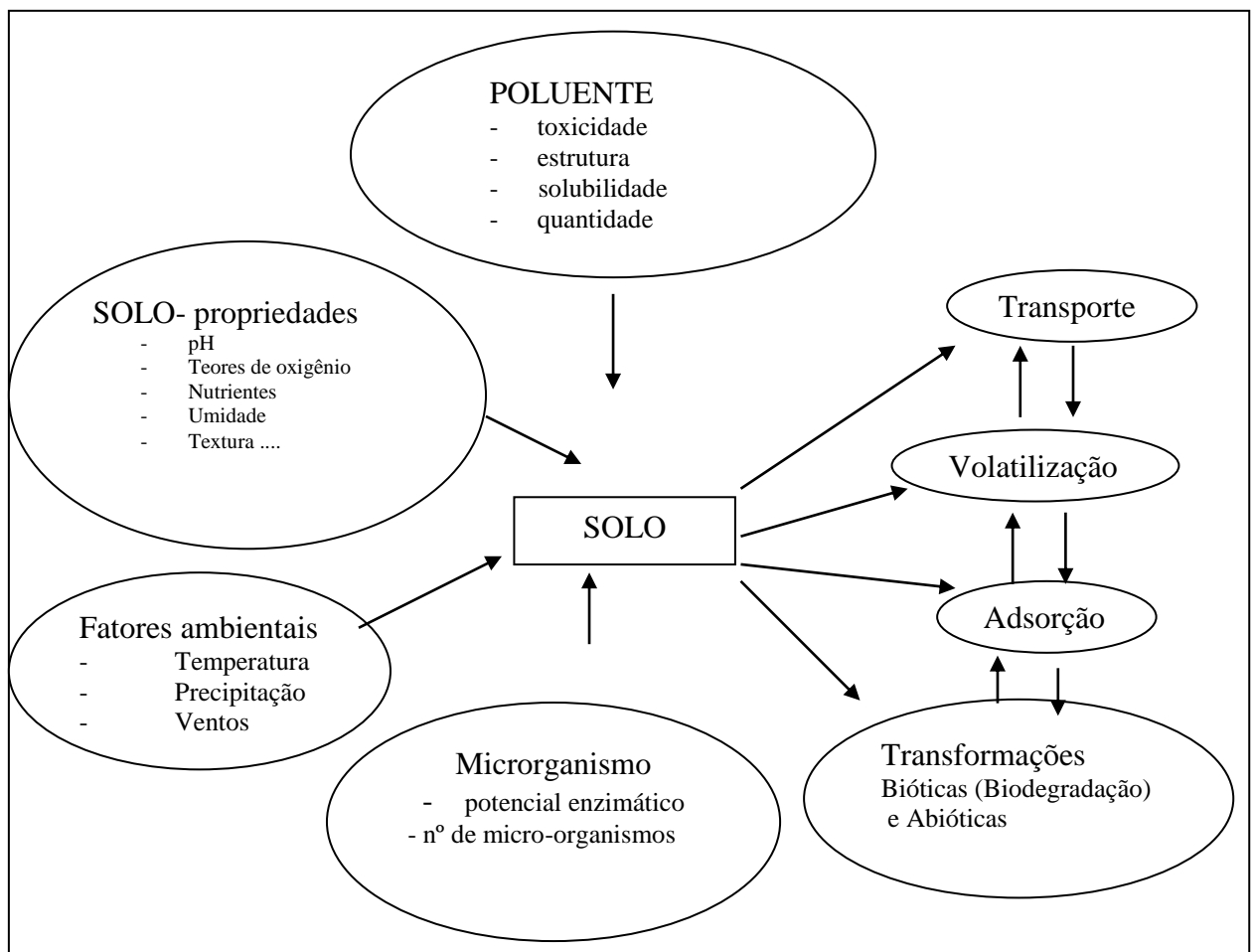
Existem fatores e processos que podem influenciar na biodegradação de poluente no solo (ou na água), conforme se observa na Figura 3. 3.

Os poluentes em contato com o solo estão sujeitos aos processos de sorção ou retenção, transferência ou transformação que governam sua atividade biológica, persistência e mobilidade no solo. Dentre estes processos, destacam-se: a lixiviação ou percolação, a sorção, a degradação biológica e o transporte por água, e sedimentos por erosão hídrica do solo (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000).

Embora os hidrocarbonetos possam sofrer fotólise, oxidação química e volatilização, a degradação microbiana é o principal processo de atuação sobre os compostos persistentes no ambiente (MCGILL *et al.*, 1981; ASHOK *et al.*, 1995).

Os micro-organismos usados na degradação são frequentemente isolados da população nativa do solo (WILSON & JONES, 1993; CUNHA & LEITE, 2000; BENTO *et al.*, 2005) e são adicionados como parte do processo de bioaugmentação. Em muitos casos, a degradação pode ser incrementada por um aumento direto da população de bactérias (BENTO *et al.*,

2005), pelo processo de bioaugmentação ou com adição de nutriente pelo processo de bioestimulação (CUNHA *et al.*, 1996, 2000; MOHNAM *et al.*, 2000; PALA *et al.*, 2002; SABATÉ *et al.*, 2004; BENTO *et al.*, 2005; SPINELI, 2005) e/ ou fonte adicional de carbono prontamente degradável como a glicose (HESS *et al.*, 1990; ALVAREZ & VOGEL, 1991; HENDRIKSEN *et al.*, 1992; YADAV & REDDY, 1993; SABATÉ *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007; MORALES, 2008).



Fonte: ACCIOLY & SIQUEIRA (2000)

Figura 3. 3 Processos e fatores que afetam a biodegradação de poluentes no solo.

Quando ocorre uma contaminação no solo com gasolina surge um problema, em relação à remediação, que é prever a migração de todos os constituintes da gasolina no ambiente. Os hidrocarbonetos que compõem a gasolina, como os BTX, têm baixa solubilidade apesar de serem os mais solúveis dos hidrocarbonetos da gasolina em água, alta volatilidade e

forte sorção, tendendo a permanecerem nos sítios do solo (CORSEUIL *et al.*, 2009). Os compostos com elevada solubilidade estarão mais presentes nos aquíferos e os compostos com elevada volatilidade estarão presentes em várias partes do local contaminado como no solo, na água e no ar (GUINGUER, 2000). Os compostos de elevada solubilidade tendem a ser mais prontamente biodegradáveis e os insolúveis tendem a ser lentamente degradado e sorvido pelo solo. Entretanto, se a massa do composto orgânico insolúvel exceder a capacidade de sorção do solo, os compostos poderão migrar para o aquífero (NYER, 2000; GUINGUER, 2000).

A migração dos hidrocarbonetos na água subterrânea é governada por processos que os dispersam e que retardam seu movimento no aquífero, ocasionando mudanças na forma e no tamanho da pluma de contaminação. A composição relativa do produto deve mudar drasticamente depois de liberado para o ambiente. Entre os fatores destas mudanças na pluma de contaminação podem ser devido ao transporte (composto pelos mecanismos de advecção, dispersão mecânica, difusão molecular e sorção), a transformação física (volatilização), a transformação química ou também chamada degradação química (hidrólise, oxidação e redução), a transformação biológica (biodegradação) e a acumulação em um ou mais meios, incluindo o meio receptor (FATORELLI, 2005).

As transformações abióticas são devido à ação de luz, calor e a outros fatores físicos. O processo de degradação pode ser afetado por características do meio (solo e água) com certo tipo de poluente, que podem necessitar de mudanças de: pH, teor de umidade, aeração, adição de nutrientes e adição de micro-organismos especificamente adaptados para acelerar o processo. Segundo Calaça (2010), os fatores ambientais abióticos (tais como: textura do solo, teor de oxigênio, umidade, temperatura, teor de nutrientes, ventos e o pH) são importantes para o sucesso da biorremediação (KONING, 2002).

A umidade do solo influencia diretamente as suas propriedades físicas, como a capacidade de aeração, a compatibilidade, a plasticidade e a consistência, influenciando assim a sua aptidão para biorremediação (BLUME, 1992; SCHEFFER, 1998; CALAÇA, 2010).

Segundo Calaça (2010), a temperatura influencia tanto nas propriedades físicas dos contaminantes contidos no solo, quanto na atividade biológica dos micro-organismos. De acordo com Koning (2002), são as temperaturas mais altas, a princípio, as mais vantajosas, já que a solubilidade dos contaminantes e a biodisponibilidade dos compostos orgânicos aumentam.

Os solos são caracterizados por uma alta variação de suas propriedades físicas e químicas, tanto na distribuição horizontal quanto vertical. Elektorowicz (1993) destaca a

importância da textura e da porosidade do solo para o sucesso da biorremediação, já que os mesmos influenciam diretamente a densidade e a permeabilidade, e assim no comportamento dos gases e dos líquidos no solo. Solos arenosos podem ser tratados mais facilmente do que solos com frações mais finas. A textura também influencia a capacidade de retenção dos contaminantes, uma vez que solos argilosos são capazes de reter, através de sorção, mais contaminantes do que solos arenosos (SCHEFFER *et al.*, 1998).

Segundo Jacques (2005), o termo sorção é definido como o processo em que compostos químicos tornam-se associados à fase sólida e, devido a isto, tendem sofrer menor biorremediação. Esse processo afeta drasticamente o destino dos compostos adicionados ao solo. Assim, se um composto encontra-se dissolvido na solução do solo, como por exemplo, o etanol, apresenta maiores possibilidades de sofrer processos como fotoxidação, volatilização, biodegradação, transporte e interação intermolecular.

3.6.1 Conseqüências Ambientais da Adição de Etanol na Gasolina no ambiente

As conseqüências ambientais da adição de etanol na gasolina (gasolina comercial) é que ele pode aumentar a solubilização dos compostos BTEX na água subterrânea por co-solvência (CORDAZZO, 2000) e, ser preferencialmente degradado dificultando a biodegradação natural dos BTEX, e aumentando a persistência destes compostos na água subterrânea ou no meio (MARIANO, 2006a).

3.6.1.1 O Efeito de Co-solvência

O efeito de co-solvência é o fenômeno em que uma substância altera a solubilidade de outra substância no meio, tendendo a aumentar a solubilidade desta. Isto ocorre, com a presença do etanol em gasolina, favorecendo assim, maior solubilidade dos hidrocarbonetos e a dissolução deste em água subterrânea (SOARES, 2006; CORSEUIL *et al.*, 2009). Quanto mais hidrofílica for a substância, mais prontamente degradável a mesma será.

O etanol, por ser hidrofílico, é facilmente biodegradado por enzimas associadas à rota metabólica central e por ser um composto mais comum na natureza do que os BTEX. Concentrações de etanol acima de 50 %, na gasolina, podem aumentar substancialmente a mobilidade dos hidrocarbonetos (ULRICH, 1999) e concentrações, somente de etanol, de 40 %, inibe completamente a microbiota no meio (HUNT *et al.*, 1997). Etanol na gasolina, em concentração acima de 7,3% (v v⁻¹), pode favorecer a diluição em água e aumentar o impacto na sorção e co-solvência dos hidrocarbonetos, acarretando preocupação ambiental (BELLER *et al.*, 2001). Desta forma, o etanol propicia aos compostos BTEX uma maior solubilidade em água, aumentando assim sua mobilidade, permitindo que eles se espalhem mais rapidamente pela subsuperfície. Na presença de 10% de etanol, a solubilidade do benzeno, tolueno, orto-xileno e naftaleno aumentam em 20, 40, 50 e 73%, respectivamente (PENNER, 2000).

3.6.1.2 Volatilidade

A presença de 20 a 26% de etanol na gasolina aumenta as emissões de compostos orgânicos voláteis em aproximadamente 10%. Esse fenômeno é explicado pela alteração das ligações intermoleculares dos compostos da gasolina em virtude da presença do etanol (SILVA, 2004).

3.6.1.3 Deslocamento da Pluma de Contaminação em água

A gasolina tem menor densidade que a água e, em contato com a mesma, tende a flutuar sobre água, na forma de uma pluma de contaminação. Os hidrocarbonetos monoaromáticos BTX da gasolina têm solubilidade limitada em água; contudo, são solúveis em etanol. A presença de etanol na gasolina aumenta a solubilidade dos hidrocarbonetos aromáticos em água. As elevadas concentrações de etanol em água tendem a gerar maior mobilidade dos hidrocarbonetos principalmente, dos BTX, aumentando o deslocamento da pluma de contaminação da gasolina na água (SILVA, 2002; SOARES, 2006).

Uma vez que o etanol é completamente solúvel em água, a sua concentração deverá ser maior que a dos compostos BTEX em águas subterrâneas contaminadas com misturas de etanol e gasolina.

3.6.1.4 Persistência dos BTX em Ambientes Subsuperficiais (solos e aquíferos)

Em mistura com a gasolina o etanol tende a ser degradado preferencialmente pelos micro-organismos e pode aumentar a persistência dos BTX, e de outros hidrocarbonetos, principalmente, em ambientes subsuperficiais (solos e aquíferos). Esta degradação preferencial do etanol pode levar ao maior consumo de oxigênio (ou de aceptores finais de elétrons) de ambientes subsuperficiais e ocasionar a persistência dos demais compostos nestes ambientes (CORDAZZO, 2000; CORSEUIL *et al.*, 2006; CORSEUIL *et al.*, 2009). A degradação do etanol é preferencial e demanda menos energia para degradá-lo, pois este é um composto hidrofílico e os compostos BTX são hidrofóbicos (CORSEUIL *et al.*, 1998; RICE, 2000; ALVAREZ & HUNT, 2002; CORSEUIL *et al.*, 2006; CORSEUIL *et al.*, 2009). Além disso, segundo Rice (2000), a degradação preferencial do etanol ocorre na presença de enzimas constitutivas que são produzidas naturalmente pelos micro-organismos em várias vias metabólicas. No entanto, as enzimas necessárias para degradar BTX, demandam tempo e exigem a presença do contaminante para serem induzidas (DEEB *et al.*, 2002).

O efeito potencial do etanol na degradação intrínseca dos BTEX, devido à degradação preferencial do etanol, pode ser favorecido pelos aceptores de elétrons (como oxigênio e nitrato) em condições aeróbias e caracteriza baixas taxas de degradação dos BTEX; visto que o mesmo, utiliza os nutrientes essenciais e assim limita o crescimento microbiano de bactérias capazes de degradar os BTEX (BELLER *et al.*, 2001; CORSEUIL *et al.*, 2009). Conforme Corseuil *et al.* (2009), no caso da presença simultânea de etanol e compostos BTEX em águas subterrâneas, estudos demonstram que o etanol é o substrato preferencial dos micro-organismos tanto em condições aeróbias como anaeróbias.

Segundo Beller *et al.* (2001), o etanol pode também aumentar a população microbiana capaz de degradar os BTEX e auxiliar a taxa de degradação destes. Para alguns autores a presença de etanol pode favorecer a degradação dos BTX e dos demais compostos hidrofóbicos da gasolina (BELLER *et al.*, 2001; MORALES, 2008). Para outros, ele inibe em

concentrações de 25 mg L⁻¹ (DEEB *et al.*, 2002). A inibição da degradação dos BTX, na presença de etanol pode ocorrer, porque o etanol demanda grande quantidade de oxigênio na sua degradação e pode prejudicar a degradação de outros compostos existentes no meio, devido à geração de condições anaeróbias (CORSEUIL *et al.*, 1998; HUNTZ & ALVAREZ, 2002; CORSEUIL *et al.*, 2009).

Além disso, segundo Bhupathiaraju *et al.* (2002) se o poluente encontra-se em solos abaixo da superfície, as concentrações de oxigênio normalmente são menores sem o poluente e com o poluente serão menores ainda. Segundo Diel *et al.* (2007), o rendimento da degradação de um poluente em meio anaeróbio é menor do que em condições aeróbias, pois nestas condições, utilizam outros aceptores de elétrons além do oxigênio.

3.6.2 Umidade e teor de oxigênio no solo

O teor de água no solo influencia quanti-qualitativamente a atividade dos micro-organismos por determinar a atividade das populações microbianas e o tipo de metabolismo (aeróbio e/ou anaeróbio) dominante num determinado local (ALEXANDER, 1999). Segundo Atlas (1980), para que os hidrocarbonetos sejam degradados é necessária a presença de um transportador de elétrons, que é o oxigênio (CORSEUIL *et al.* 1998; DIEI *et al.*, 2007), em condições aeróbicas. Na ausência do oxigênio, os íons nitrato (NO₃⁻¹), nitrito (NO⁻¹), férrico (Fe⁻³) e sulfato (SO₄⁻²) do solo podem ser reduzidos pelos micro-organismos na respiração anaeróbia (CORSEUIL *et al.*, 1998; DIEI *et al.*, 2007).

A biodegradação de resíduos petroquímicos no solo é realizada, principalmente, por micro-organismos aeróbios presentes nas camadas superficiais do solo (BHUPATHIRAJU *et al.*, 2002). Estudos demonstram que a biodegradação de hidrocarbonetos na ausência de oxigênio, utilizam outros aceptores finais de elétrons, mas em níveis substancialmente mais baixos em relação à biodegradação em condições aeróbias (CHEN & TAYLOR, 1997; BHUPATHIRAJU *et al.*, 2002; BOTTON & PARSON, 2007; SIDDIQUE *et al.*, 2007).

Corseuil *et al.* (1998), estudaram a degradação, preferencial do etanol em relação aos compostos BTX, em microcosmos com condições aeróbias e anaeróbias, e concluíram que, em ambas condições, o etanol era preferencialmente utilizado, pelos micro-organismos, em

relação aos compostos aromáticos. Este fato pode impedir que a população microbiana capaz de degradar os compostos BTX expresse completamente seu potencial catabólico, levando a um retardo na degradação destes hidrocarbonetos (CORSEUIL *et al.*, 2009).

As bactérias aeróbias, principais responsáveis pela degradação dos derivados de petróleo no solo, preferem umidade ideal na faixa de 50-70% da capacidade de campo (CARDOSO *et al.*, 1992; SABATÉ *et al.*, 2005; LABUD *et al.*, 2007), que corresponde aos teores de umidade de 10 a 16,1% (FRIONI, 1990) ou de 12 a 18% (SHEWFELT *et al.*, 2005); dependendo do tipo de solo. Os solos com baixos teores de umidade reduzem o crescimento e a sobrevivência dos micro-organismos, e conseqüentemente, a degradação do poluente no solo, isto foi verificado nos experimentos de Shewfelt *et al.* (2005) para teor de umidade de 9% ou menos.

O teor de umidade de um solo é responsável pelas modificações das trocas gasosas e, ao mesmo tempo, pelo transporte dos nutrientes utilizados pelos micro-organismos para seu crescimento. A umidade ótima para diferentes atividades metabólicas varia entre os tipos de solo, teor de argila, grupos de micro-organismos, vegetação, etc. Além disto, o teor de umidade no solo tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio, uma vez que a água e o ar ocupam o mesmo espaço poroso no solo (ALEXANDER, 1999).

3.6.3 pH do solo

O pH da maioria dos solos no Brasil varia entre 4 e 8,5, onde os horizontes superficiais destes em climas mais úmidos, o solo é ácido, devido as lixiviações das bases. Nas regiões mais secas ou semi-áridas são geralmente alcalinos. No entanto, estes valores não refletem as condições dos diversos microambientes dos solos, devido à dupla camada difusa, ao metabolismo microbiano e a outras forças dinâmicas. Isto ocorre, pois na camada difusa podem existir camadas de colóides orgânicos e argilas que são carregadas negativamente, e de modo geral, tem cátions atraídos a esta camada. Então, o aumento da concentração de cations (incluindo H^+) da dupla camada, torna o pH das superfícies carregadas muito menor do que na solução do solo. Também a flutuação do pH do solo causada pela atividade metabólica dos micro-organismos é dependente do tipo de substrato metabolizado. Além disso, outros fatores

que afetam os organismos, indiretamente são influenciados pelo: pH, disponibilidade e a toxicidade de nutrientes minerais (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Conforme Jacques (2005), o pH do solo afeta diretamente a atividade dos micro-organismos através dos efeitos dos íons H^+ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, assim como indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes, e na solubilidade do alumínio e dos metais pesados, que podem ser tóxicos aos micro-organismos. O pH afeta significativamente as taxas de biodegradação, pois determina o tipo de micro-organismo que participará na degradação dos compostos orgânicos, além de reduzir a solubilização e a lixiviação de metais pesados, fato que pode ocorrer a pH inferior a 5,0. A biodegradação é mínima em solo ácido e o estímulo da biodegradação pode ser obtido com o aumento do pH a valores próximos à neutralidade ou levemente alcalinos, o que favorece a atuação bacteriana (MIELNICZUK, 1991).

Segundo Cardoso *et al.* (1992), a ação do pH sobre os micro-organismos do solo depende de sua tolerância a esse fator, como numerosas bactérias que apresentam crescimento satisfatório entre valores de pH 6,0 a 9,0. Para fungos os valores variam entre pH 2,0 a 8,0. Para Moreira & Siqueira (2006), os fungos são mais adaptados a valores de pH menores que 5 e bactérias, incluindo actinomicetos e cianobactérias a valores de pH entre 6 e 8.

O pH do solo exerce influência na dinâmica do poluente no solo, devido a possibilidade de sorção destes poluentes aos colóides orgânicos e minerais (contaminante ionizáveis) e na degradação biológica dos poluentes (MIELNICZUK, 1991). Segundo a literatura a utilização de pH 6,5 a 7 (MARINS *et al.*, 2002; PRANTERA *et al.*, 2002; MALINA *et al.*, 2002; KIM *et al.* 2002; SHEWFELD *et al.* 2005) ou 7-8 é bem frequente (SABATÉ *et al.*, 2005; LABUD *et al.*, 2006), e muito pouco em pH 5 (SPINELLI *et al.*, 2002). Logo o ideal pH e os nutrientes presentes no solo pode gerar melhores resultados na biodegradação dos hidrocarbonetos, principalmente de gasolina e/ou óleos.

3.6.4 Nutrientes no solo

Um dos fatores que tem sido observado influenciarem significativamente no solo são aplicações de nutrientes tais como nitrogênio, fósforo e micronutrientes, pois aceleram a atividade de micro-organismos nativos que utilizam hidrocarbonetos como única fonte de carbono (PRANTERA *et al.*, 2002; PALA *et al.*, 2002; SABATÉ *et al.*, 2004; SPINELLI,

2005; BENTO *et al.*, 2005; SHEWFELT *et al.*, 2005). Segundo Pranter *et al.* (2002), a maior limitação da biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos, como única fonte de carbono é o uso de nutrientes, em particular o nitrogênio. Entretanto, existem estudos com fonte adicional de carbono como de glicose que podem favorecer a biodegradação de contaminante no meio (KIM *et al.*, 2002; SABATÉ *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007; MORALES, 2008).

3.6.4.1 Fonte adicional de carbono - glicose

Para alguns autores, uma fonte adicional de carbono prontamente disponível como a glicose pode melhorar a degradação de um contaminante hidrofóbico como dos hidrocarbonetos da gasolina ou de óleos (HESS *et al.*, 1990; ALVAREZ & VOGEL, 1991; HENDRIKSEN *et al.*, 1992; YADAV & REDDY, 1993; SABATÉ *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007; MORALES, 2008). Conforme dados da literatura as concentrações de glicose mais utilizadas em meios (líquidos ou em solo), citadas, foram de: 0,1 % (SHIM *et al.*, 2002); 0,2 % (KIM *et al.*, 2002; SABATÉ *et al.*, 2004; MORALES, 2008); e 1% (MIELNICZUK, 1991; YADAV & REDDY, 1993).

Nos estudos de Morales (2008) com isolados bacterianos em meio mineral com 1% de gasolina comercial (22 % de etanol) foram observados percentuais de degradação maiores com glicose. Tanto que o isolado UFRGS 62 em meio mineral com 0,2% de glicose e 1% de gasolina comercial, no tempo de 72 horas, apresentou redução dos compostos (etanol, benzeno, tolueno, meta-xileno, para-xileno e orto-xileno) em relação ao controle de: 51, 50, 48, 36, 30 e 48%, respectivamente.

A presença de 1% de glicose em meio mineral com hidrocarbonetos BTXE favoreceu a degradação na presença de cepas de fungos basidiomicelares (ou *Basidiomycete*, YADAV & REDDY, 1993). A concentração de glicose em 1%, em geral, não apresentou resultados significativos, principalmente para contaminantes de borras oleosas em diferentes concentrações (2,5; 5; e 10%) em solo (MIELNICZUK, 1991). Para Shim *et al.* (2002), nos seus experimentos foram utilizadas concentrações de 0 e 0,1% de glicose com H₂O₂ (0,1%), em meio mineral na presença de Benzeno ou BTX, e os melhores resultados na degradação destes compostos foi na presença de 0,1% de glicose em biorreator.

Morais & Tauk-Tornisielo (2004), utilizaram diferentes concentrações (5, 10 e 15%) de gasolina ou glicose como única fonte de carbono para verificar o crescimento de alguns isolados (*A. baumannii*, *B. cereus* e *O. anthropi*) com a incubação à 30°C, por 48 horas. Neste experimento verificaram que quanto maior a concentração da fonte de carbono menor o crescimento do isolado; exceto para os isolados *B. cereus* que cresceu em concentração de 15% de glicose e *A. baumannii* que, em 48 horas, mostrou melhor crescimento nas três concentrações de gasolina do que nas de glicose avaliadas.

3.6.4.2 Relações de nutrientes (C:N:P OU C:N)

A aplicação de nutrientes no meio contaminado pode gerar elevada taxa de degradação, dependendo do tipo do meio e da concentração do contaminante. Os nutrientes são considerados um dos fatores limitantes ao crescimento microbiano. Estes são necessários para sintetizar componentes celulares, como o nitrogênio para os aminoácidos e as enzimas, o fósforo para o trifosfato de adenosina (ATP) e o ácido desoxirribonucléico (DNA), o enxofre para algumas proteínas e coenzimas, o cálcio para estabilizar a parede celular e o magnésio para estabilizar os ribossomos (PRITCHARD & COSTA, 1991, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Após um derramamento de gasolina no solo, há um aumento considerável de matéria orgânica poluente, passível de ser utilizada pelos micro-organismos autóctones. Se esta concentração for suficientemente alta, haverá deficiência de outros nutrientes (principalmente N e P) requeridos para esta grande demanda. Nestas circunstâncias, a adição de fonte de nitrogênio e ou fósforo ao local se faz necessário para a manutenção da atividade metabólica dos micro-organismos (CUNHA *et al.*, 1996; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006)

A utilização de fosfato no solo, no entanto, deve ser bem dimensionada, uma vez que pode acarretar sérios problemas, reduzindo a eficiência do processo de biodegradação. Na presença de sais de cálcio, ferro e magnésio, abundantes em solos, pode haver formação de sais de fosfato, insolúveis em água, e acarretar bloqueio dos poros, reduzindo a permeabilidade do solo e a disponibilidade no meio. Para promover a quantidade suficiente de nutrientes inorgânicos como nitrogênio e fósforo, deve-se levar em conta a interação de

muitos íons com os componentes encontrados na camada subterrânea do solo, promovendo assim, um transporte adequado (CUNHA *et al.*, 1996; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006)

Segundo vários autores, as relações de C:N:P mais utilizadas foram de: 100:10:1 ou 10: 1:0,1 (MOHNAM *et al.*, 2000; PALA *et al.*, 2002; SABATÉ *et al.*, 2004, SPINELLI, 2005; BENTO *et al.*, 2005). Porém muitos destes autores com estas relações de nutrientes não obtiveram os melhores percentuais de degradação dos poluentes, mesmo em conjunto com outros processos como a bioventilação (PALA *et al.*, 2002; SABATÉ *et al.*, 2004). Estes autores, também usaram fonte adicional de carbono com 0,2% de glicose (SABATÉ *et al.*, 2004) sem a adição de outros nutrientes com o pH do solo corrigido para 7 (PALA *et al.*, 2002) e obtiveram melhores resultados de degradação.

Para Prantera *et al.* (2002), a relação de C:N de 10:1 pode ser adequada para solos contaminados com gasolina com processos de bioventilação. Segundo Shewfelt *et al.* (2005), as relações avaliadas de carbono e nitrogênio (C:N) tem sido identificadas como parâmetros críticos que afetam as taxas de degradação segundo a literatura. Nos experimentos que utilizaram adição de nitrogênio com diferentes relações de C:N (20:1; 10:1; 5:1) e duas formas de nitrogênio (amônia com e sem nitrato) em três diferentes teores de umidade com o processo de bioventilação, apresentaram melhores resultados na degradação da gasolina, somente com a relação de C:N de 10:1, com a forma amoniacal do nitrogênio e teor de umidade entre 18 a 12 %.

Conforme Jacques (2003), as relações C:N ou C:N:P podem ocorrer de formas distintas em cada área contaminada com o mesmo contaminante, como ocorreu com os autores ZHOU & CRAWFOR (1995). Segundos estes autores (Zhou & Crawf, 1995), as maiores degradações da gasolina no solo foram observadas com as relações C:N variando de 18:1 a 50:1. Entretanto, estes autores, no seu trabalho, utilizaram a relação C:N de 18:1 e verificaram inibição da degradação da gasolina. Atagana *et al.* (2003), observaram, durante seis meses, que as degradações dos hidrocarbonetos com as relações C:N de 25:1, 20:1, 15:1, 10:1 e 5:1 e C:N:P de 10:1:2 foram próximas em média de 55%, sendo que a relação 25:1 foi a que proporcionou maior degradação e a relação 5:1 a que gerou menor, com valores de 68,7 e 33,0%, respectivamente. (JACQUES, 2005)

As formas de nitrogênio adicionadas na degradação de hidrocarbonetos têm afetado as taxas de degradação segundo a literatura (SHEWFELT *et al.*, 2005). O nitrogênio tem sido utilizado de várias formas, incluindo a uréia (MIELLICK, 1991), cloreto de amônio (MOHNAM *et al.*, 2000; SHEWFELT *et al.*, 2005), nitrato de amônio (Cunha *et al.*, 1996,

1997, 2000; PALA *et al.*, 2002; SABATÉ *et al.*, 2004; SPINELLI, 2005; SHEWFELT *et al.*, 2005), sulfato de amônio (BENTO *et al.*, 2005) e outros sais de amônio.

A taxa de degradação foi relativamente baixa com o uso de nitrato ou na forma combinada com amônio, devido provavelmente à baixa eficiência microbiana em metabolizar o nitrato (SHEWFELT *et al.*, 2005), ou seja, o nitrato pode ter inibido a microbiota e assim causado tal redução na degradação. Isso pode ocorrer porque o íon nitrato necessita primeiramente ser reduzido para o íon amônio e depois ser prontamente disponível à microbiota do meio que requerer menor energia para assimilá-lo (CUNHA *et al.*, 1996; JÔNIO *et al.*, 2000; SHEWFELT *et al.*, 2005; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Este fato foi verificado pelos autores Shewfelt *et al.* (2005), que utilizaram o reagente amônio como única fonte de nitrogênio aplicada na relação de C:N 10:1 e obtiveram melhor degradação da gasolina no solo nas condições estudadas.

Os nutrientes são considerados um dos fatores limitantes ao crescimento microbiano. Estes são necessários para sintetizar componentes celulares, como o nitrogênio para os aminoácidos e as enzimas, e o fósforo para o trifosfato de adenosina (ATP) e o ácido desoxirribonucléico (DNA), o enxofre para algumas proteínas e coenzimas, o cálcio para estabilizar a parede celular e o magnésio para estabilizar os ribossomos (PRITCHARD & COSTA, 1991, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

O solo é o maior reservatório dos nutrientes essenciais aos organismos, importantes componentes do protoplasma de todos os organismos vivos. Existe uma estimativa de que cada célula procariótica possua cerca de 25 milhões de macromoléculas de 2.500 tipos diferentes, que podem ser agrupadas em proteínas, polissacarídeos, lipídeos, DNA e ácido ribonucléico (RNA). A deficiência de nutriente no solo ou meio podem afetar os micro-organismos nos seguintes processos: 1- síntese de enzimas; 2- estabilização da parede celular; 3- divisão celular; 4- mobilidade; e interações simbióticas (ou co-metabolismo), entre outros (Moreira & Siqueira, 2006). Micro-organismos requerem principalmente nitrogênio e fósforo para incremento de biomassa, assim, a disponibilidade desses nutrientes na área contaminada é um fator crítico para a biodegradação (PRITCHARD & COSTA, 1991; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

3.6.5 Microbiota do meio

Os micro-organismos são os principais agentes responsáveis pela ciclagem de vários elementos tais como o carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e outros na natureza. Em muitos ecossistemas existe uma comunidade autóctona (nativa) de micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos de uma forma geral (hidrocarbonoclasticos). A competência enzimática em degradar hidrocarbonetos não é restrita a apenas alguns gêneros de micro-organismos, pois, vários grupos de bactérias, fungos e actinomicetos têm mostrado possuir essa capacidade. (KATAOKA, 2001)

3.6.5.1 Degradação

Os micro-organismos degradam compostos orgânicos, para fornecer carbono e energia para o crescimento, e reprodução das células microbianas. A biodegradação de compostos orgânicos ocorre em ambas às condições anaeróbias e/ou aeróbias dependendo das estruturas químicas das moléculas e das condições do ambiente (CARDOSO *et al.*, 1992; CALABRESE & KOSTECKI, 1992; MAIER *et al.*, 2000, NYER, 2000; TIBURTIUS *et al.*, 2004). A biodegradação completa ou mineralização, em condições aeróbias, envolve oxidação de compostos originais de modo a formar dióxido de carbono e água (CALABRESE & KOSTECKI, 1992; MAIER *et al.*, 2000; NYER, 2000; MIRANTE, 2000; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Moreira & Siqueira (2006), postularam três características essenciais para a utilização de hidrocarbonetos pelos micro-organismos em condições aeróbias:- um sistema eficiente de sorção 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. A degradação aeróbica dos hidrocarbonetos aromáticos BTX pode ocorrer de diversas formas; como pelo oxigênio. Com a presença do oxigênio ocorre a oxidação direta do anel aromático por uma mono-oxigenase, que adiciona uma molécula de oxigênio ao anel aromático ou uma dioxigenase, que adiciona duas moléculas de oxigênio, a esta etapa da degradação chama-se

ataque inicial (GIBSON & PARALES, 2000). As bactérias que, na presença de oxigênio, degradam hidrocarbonetos aromáticos, utilizam enzimas dioxigenases para ativar e clivar o anel, estando envolvidas na degradação de BTEX (MESEARCH *et al.*, 2000). As dioxigenases atuam no processo de biodegradação dos compostos BTEX e compõem um sistema enzimático multicomponente possuindo uma faixa ampla de especificidade pelo substrato. Além disso, convertem os hidrocarbonetos aromáticos aos correspondentes arenos cis-diol (GIBSON & PARALES, 2000) ou intermediários do catecol (JUNCA & PIEPER, 2004), que são tipicamente quebrados por uma *ortho*- ou *meta*-dioxigenase. Entretanto, os mais frequentes na literatura são as *meta*-dioxigenases ou catecol 2,3-dioxigenases, (MESARCH *et al.*, 2000; JUNCA & PIEPER, 2004; HENDRICKX *et al.*, 2006) (Figura 3.4).

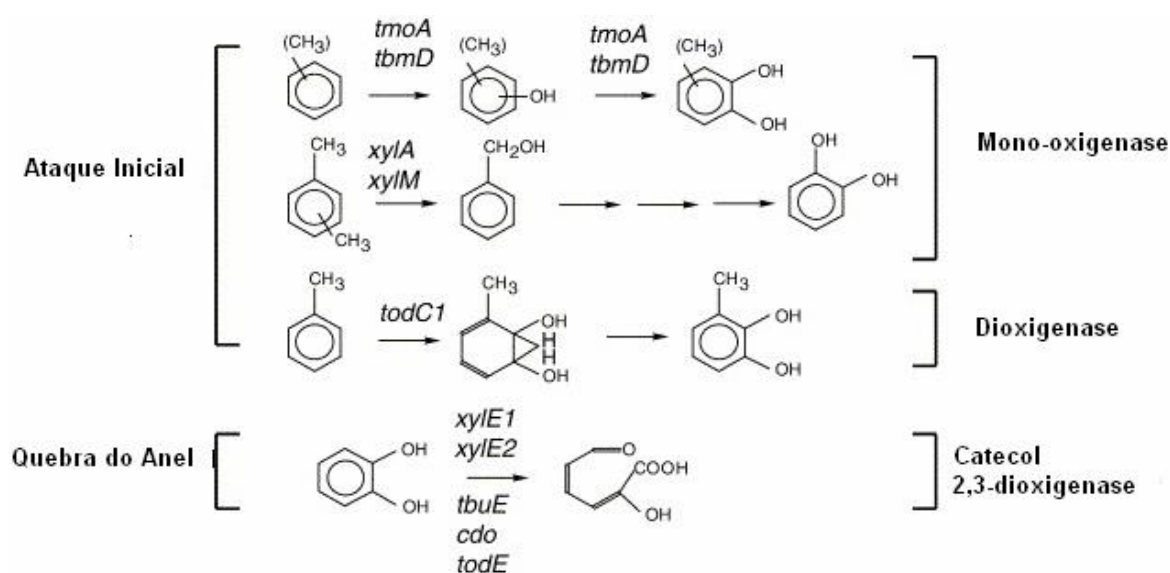


Figura 3. 4 Apresentação esquemática de algumas reações enzimáticas possíveis, durante a degradação dos hidrocarbonetos BTEX (modificado de HENDRICKX *et al.*, 2006).

Os micro-organismos desenvolvem várias formas naturais de degradar compostos orgânicos hidrofóbicos, como pela excreção de biossurfactantes no meio aumentam a biodisponibilidade de hidrocarbonetos a serem degradados. A biodegradação de um composto ocorrerá somente se enzimas microbianas estiverem presentes, obedecendo a primeira etapa da degradação que envolve a produção e captação do substrato pela célula, que depende da solubilidade do composto orgânico e da via metabólica necessária para degradação deste substrato (BENTO *et al.*, 2008).

Para isto foram propostas duas formas possíveis de produção de biossurfactantes e de bioemulsificantes para capacitar as células microbianas como: a) produção extracelular e captação pelo contato direto com microgotículas dispersas na fase aquosa; b) produção associada à parede celular e captação pelo contato direto das células ao composto orgânico, através de modificações celulares, como hidrofobicidade celular (facilitando a penetração do hidrocarboneto no espaço peristáltico) ou fímbrias (pseudosolubilização). Assim, os microorganismos podem elevar a taxa de captação e de biodegradação com a presença de biossurfactantes ou emulsificantes (MAIER, 2003; BENTO *et al.*, 2008).

3.6.5.2 Biossurfactantes e bioemulsificantes

Biossurfactantes são moléculas que apresentam uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, e tendem a favorecer a biodisponibilidade do poluente a microbiota do meio. Estas moléculas reduzem a tensão superficial e interfacial do meio de crescimento, e são excretadas ou permanecem fixas ao envoltório celular do micro-organismo. Estes aumentam a solubilidade, e a disponibilidade dos hidrocarbonetos no ambiente (CAMEOTRA & BOLLAG, 2003). Quando se adiciona um surfactante se obtém uma mistura estável ou uma emulsão de dois líquidos imiscíveis como óleo e água. A estabilidade da emulsão é garantida pela formação de filmes na superfície das gotículas de óleo na fase aquosa, que tendem a se manter por longos períodos, refletindo a efetividade do emulsificante (MAIER, 2003).

Biossurfactantes e bioemulsificantes são sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos durante o crescimento em diferentes fontes de carbono, e geram moléculas que reduzem a tensão superficial (ou interfacial) ou agem como agentes emulsificantes, ou apresentam ambas as propriedades (BENTO *et al.*, 2008). Geralmente a produção de biossurfactantes e bioemulsificantes está associada ao crescimento celular em meios de cultura ou em meios mínimos (mineral) com fonte de carbono (solúvel ou insolúvel) na fase estacionária, sendo considerados como metabólitos secundários (TAHZIBI *et al.*, 2004, BENTO *et al.*, 2008).

Os biossurfactantes podem ser surfactantes de baixo peso molecular (glicolipídios, ácidos graxos e fosfolipídios) e de alto peso molecular (polímeros). Os surfactantes de baixo peso molecular apresentam a propriedade de diminuir a tensão superficial, quando presentes

em meio aquoso. Os surfactantes de alto peso molecular, chamados de bioemulsificantes, são responsáveis pela formação e estabilidade da emulsão, porém não causam necessariamente a redução da tensão superficial, pois podem não apresentar a composição anfipática (hidrofílica e hidrofóbica, BENTO *et al.*, 2008) Os biossurfactantes poliméricos tem capacidade de emulsificar o meio e são produzidos por várias bactérias e leveduras, mas a redução da tensão superficial do meio é considerada baixa, em torno de 52 mN m^{-1} (BODOUR & MAIER, 2003).

A redução da tensão superficial ocorre devido às características dos biossurfactantes que transferem as moléculas do interior de um líquido para interface líquido /gás, que realizam menores interações intermoleculares do que do interior do líquido (MAIER, 2003; MULLIGAN, 2005). A tensão superficial é a força que atua na superfície dos líquidos (Bodour & Maier, 2003) e pode ser quantificada, através da medida da força exigida para mover um anel de platina (método Du Nouy) ou a utilização do método Wilhelmy que está sobre um líquido através do ar. Este método é amplamente utilizado devido a sua reprodutibilidade (MAIER, 2003; BODOUR & MAIER, 2003; CUNHA *et al.*, 2004; BENTO *et al.*, 2008). No entanto, algumas substâncias do meio de cultura, podem reduzir a tensão superficial na ausência de um surfactante como: peptona, solventes, metanol e etanol (MILLER & ZHANG, 1997). Por isso, é importante durante as análises de cada amostra realizar a também a do branco.

Quando os biossurfactantes são ou estão presentes no solo aumentam a solubilidade e liberam os contaminantes sorvidos nos minerais e na matéria orgânica. O aumento da biodisponibilidade dos compostos aos micro-organismos pode resultar em maior biodegradação (OCHOA-LOZA *et al.*, 2007). Esta técnica pode ser utilizada, tanto, em biorremediações *in situ*, como em processos de lavagem de solo, onde, a água da lavagem recuperada, passa por um processo subsequente de degradação (SINGH *et al.*, 2007). Conforme Al-Tahhan *et al.* (2000), o biossurfactante aumentou a interação entre célula e hidrocarboneto, devido a perda da camada lipolissacáridica (LPS), principal constituinte da parede celular de bactérias Gram negativas.

Nos estudos de Rahman *et al.* (2007), foi observado aumento da degradação de hidrocarbonetos do petróleo, estimulado pelo biossurfactante ramnolipídico em microcosmos, contendo meio líquido e solo. Foi observado que, a adição do surfactante aumentou a degradação dos hidrocarbonetos e que o tratamento com adição de nutrientes e com o surfactante obteve melhores resultados. Os ramnolipídeos estão entre os mais efetivos biossurfactantes utilizados na remoção de compostos hidrofóbicos de áreas contaminadas,

pois possuem ótima capacidade de redução da tensão superficial (25 a 30 mN m⁻¹) e alta capacidade de emulsificação (50 a 80%) (GUERRA-SANTOS,1984), baixa concentração micelar crítica (5 a 65 mg L⁻¹) e alta afinidade por moléculas orgânicas hidrofóbicas.

Os ramnolipídeos são produzidos por *P. aeruginosa* durante o crescimento em várias fontes de carbono e podem ser analisados principalmente por método semi-quantitativo (SIEGMUND & WAGNER, 1991; PINZON & JU, 2009 a e b). Este método propõe o uso de placas contendo azul de metileno e brometo de cetil trimetilamina com Agar e adição inoculo. E, o inoculo adicionado à placa quando forma halo azul produz biossurfactantes do tipo *ramnolipídeos* e a área do halo formado pode estar relacionada com a quantidade de biossurfactantes formados (SIEGMUND & WAGNER, 1991; PINZON & JU, 2009 a e b).

3.7 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO

Para a avaliação da degradação são propostas metodologias que estimem o número de micro-organismos (heterotróficos totais e degradadores) e que consomem vários substratos específicos, monitorados pela respiração microbiana (consumo de oxigênio e/ou produção de dióxido de carbono) e de degradação do substrato (desaparecimento de poluentes individualmente e/ou na totalidade) (BALBA *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2000; KATAOKA, 2001).

Uma alta estimativa de população de micro-organismos heterotróficos totais não apresenta necessariamente correlação direta com a biodegradação (Kataoka, 2001). A quantificação da microbiota do solo ou do meio líquido contaminado com hidrocarbonetos geralmente é avaliada pela estimativa direta e indireta de bactérias heterotróficas pela unidade formadora de colônias (UFC, SHIM *et al.*, 2002; SABATÉ *et al.*, 2004; SHEWFELT *et al.*, 2005; ASPRAY *et al.*, 2007, CUNHA *et al.*, 2007), e pela estimativa de número mais provável (NMP) de heterotróficos totais e de degradadores, (SABATÉ *et al.*, 2004; BENTO *et al.*, 2005; SHEWFELT *et al.*, 2005).

Os métodos respirométricos avaliam a intensidade da atividade microbiana do solo com e sem contaminante, pela respiração microbiana através da produção de dióxido de carbono e/ou pelo consumo de oxigênio, mas principalmente pela liberação de CO₂, (SABATÉ *et al.*, 2004; SPINELLI, 2005; BENTO *et al.*, 2005; SHEWFELT *et al.*, 2005).

Esses métodos são utilizados como um primeiro teste para se avaliar a pronta ou inerente biodegradabilidade de poluentes em solo ou água (SHEWFELT *et al.*, 2005; ASPRAY *et al.*, 2007), conduzidos sob condições ótimas com respeito à umidade, temperatura, nutrientes, aeração (se o teste for aeróbio) e até a inoculação microbiana. Além disso, quando se obtém uma conversão de carbono do contaminante em torno de 30 % (CETESB, 1990) ou de 50 a 60% (ATLAS, 1993) de liberação de CO₂ num período de tempo específico, pode indicar que, sob condições apropriadas, os poluentes serão biodegradados pelos micro-organismos.

A extensão e a proporção de degradação são comumente avaliadas por determinações de evolução de carbono e dióxido de carbono (C-CO₂), e pelo consumo de O₂ ou pelo desaparecimento do substrato teste. Para a avaliação de um substrato volátil, a cromatografia gasosa (CG) com detector de ionização de chama (FID; CUNHA *et al.* 2004 e 2007; SHIM *et al.*, 2002, PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2004 SABATÉ *et al.*, 2004) é bastante utilizada. A cromatografia gasosa é uma técnica muito usada para quantificar misturas de compostos orgânicos (CUNHA *et al.* 2004 e 2007; PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2004; SKOOG *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009), como de gasolina e de outros combustíveis (SILVA *et al.*, 2009), onde os hidrocarbonetos podem ser separados e identificados, (MARCHAL, *et al.*, 2003; SKOOG *et al.*, 2006;). O detector de ionização de chama (DIC ou FID em inglês, MARCHAL, *et al.*, 2003; SKOOG *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009) é utilizado geralmente para análise de compostos orgânicos voláteis. Estes podem ser extraídos do solo ou do meio líquido pela técnica de *headspace* (CORSEUIL *et al.*, 2004; PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2004), de *purg trap* (PRINCE & SUFLITA, 2007) ou em *Shaker* com amostra e metanol (CUNHA *et al.*, 2007).

A medida mais direta da eficiência da biodegradação é o monitoramento da taxa de consumo dos poluentes. Para caracterização dos componentes individuais de uma classe específica de hidrocarbonetos pode-se utilizar a cromatografia líquida de alta precisão (CLAE) ou a cromatografia gasosa (CG) acoplada a um espectrômetro de massa (CG-MS; SKOOG *et al.*, 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdanur, A. **Remediação de Solo e Água Subterrânea Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo: Estudo de Caso na Refinaria**. 2005. 156 p. Dissertação (Mestrado) em Ciências do Solo. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 2005.
- Accioly, A. M. A.; Siqueira, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: Novais, R. F.; Alvarez V.; V. H.; Schaefer, C. E. G. R. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 299-352. 2000.
- Al-Tahan, R. A. et al. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.8, p.2981-2985, 2000.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biodiesel. **ANP, 2010**. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo e do Gás Natural 2010. Endereço eletrônico: www.anp.gov.br – (acesso: janeiro 2011).
- _____. **ANP, 2007**. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo e do Gás Natural 2007. Endereço eletrônico: www.anp.gov.br – (acesso: junho 2008).
- _____. **ANP, 2006** - Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo e do Gás Natural 2007. Endereço eletrônico: www.anp.gov.br – (acesso: em junho 2008).
- _____. **ANP, 2001**. Portaria Número 309/ 2001, estabeleceu as especificações para comercialização de gasolinas automotivas em todo o território nacional e definiu obrigações dos agentes econômicos sobre o controle de qualidade do produto. www.anp.gov.br – (acesso: em junho 2008).
- _____. **ANP, 1997** – Portarias via http://www.anp.gov.br/documentos/portarias/p009_1997.pdf. (Acesso: em julho de 2008)
- Alexander, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2nd ed. New York:Academic Press, 1999,453p.

- Alvarez, P. J.; Vogel, T. M. Substrate interactions of benzene, toluene, and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.10, p. 3262-3268, 1991.
- ANFAVEA**. Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. 2010. Disponível em: < www.anfavea.com.br >. Acesso: 12/02/2010.
- Antunes, F. S.; Campos, T. M. P.; Costa, A.; Cunha, P. O.; Guimarães Jr., J. R. V.; Mano, D. M.; Vargas, E. A.; Nunes, C. M. F.; Silva, M. I. P. Evaluation of bioventing on a gasoline-ethanol contaminated undisturbed residual soil. **Journal of Hazardous Materials**, v.110, p. 63-76, 2004.
- Aspray, T. J.; Carvalho, D. J. C.; Philip, J. C. Application of soil slurry respirometry to optimise and subsequently monitor ex situ bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p 6, 2007.
- Ashok, B. T.; Saxena, S. Musarrat, J. Isolation and characterization of four polycyclic hydrocarbon degrading bacteria from soil near an oil refinery. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 246-248, 1995.
- Atlas, R.M. **Handbook of Microbiological Media**. CRC Press, Boca Raton, 1993 p. 174 - 757
- Atlas, R.M. Microbiological Aspects of oil spills. **Environmental Notes**, n.9, p. 495-499, 1980.
- Atlas, R.M. **Microbiology: Fundamentals and Applications**. 2nd ed. New York: MacMillan, 1988. 805p. Cap.15: Environmental Quality: Biodegradation of Wastes and Pollutants
- Atlas, R.M.; Bartha, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4th ed. Menlo Park : Benjamin/Cummings, 1998. 694p.
- Balba, M.T.; Awadhi, N.; Al-Daher, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evolution. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, pp. 155-164, 1998.
- Banat, I. M.; Desai, J. D. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, p. 47-64, 1997.

- Beller, H. R.; Kane, S. R.; Legler T. C. Chapter 4: Effect of ethanol on hydrocarbon-degrading bacteria in the saturated zone: microbial ecology studies. University of California, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, CA 94550, **Environmental Restoration Division**, 2001.
- Beller, H. R.; Spormann, A. M.; Sharma, P. K.; Cole, J. R.; Reinhard, M. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate reducing bacterium. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p.1188-1196, 1996.
- Bento, F. M.; Camargo, F. A. O.; Okeke, B. C. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresour. Technol.**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.
- Bento, F. M.; Gaylarce, C. C.; Camargo, F. A. O. Biosurfactantes. In: Bento et al. **Microbiologia Ambiental**, 2 ed., Editores Itamar Soares de Melo e João Lúcio de Azevedo, Embrapa, 2008.
- Bèraud, J. F. Introduction. In: **Handbook of diagnostic procedures for petroleum-contaminated sites**. LECOMTE, P., MARIOTTI, C. (Ed.) Chichester: John Wiley & Sons, 1997.
- Bhupathiraju, V. K.; Krauter, P.; Holman, H. N.; Conrad, M. E.; Daley, P. F.; Hunt, J. R.; Hernandez, M.; Alvarez-Cohen, L. Assessment of in-situ bioremediation at a refinery waste-contaminated site and an aviation gasoline Site. **Biodegradation**, v.13, p. 79-90, 2002.
- Bhupathiraju, V. K.; Krauter, P.; Holman, H. N.; Conrad, M. E.; Daley, P. F.; Templeton, A. S.; Hunt, J. R.; Hernandez, M.; Alvarez-Bidoia, E. D.; Marques, M. L. O.; Otenio, M. H.; Roseiro, J. C.; Silva, M. T. L. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 258-261, 2005.
- Bodour, A.A.; Drees, K.P.; Maier, R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.6, p.3280-3287, 2003.

- Bongnolo, G., Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*. p.152:41-52, 1999.
- Boopathy, R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 63-67, 2000.
- Bossert, T; Kachel, W.M.; Bartha, R. Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.47, n.4, p.763-767, 1984.
- Botton, S. & Parsons, J.R. Degradation of BTX by dissimilatory iron-reduction cultures. *Biodegradation*, Dordrecht, v.18, p.371-381, 2007.
- Braddock, T.; Stiver, W.H. Zytner, R. G. Biodegradation of diesel fuel in soil under various nitrogen addition regimes. *Soil sediment Contaminated*. v. 10, n. 5, p. 539-553, 2001.
- Brasil. Ministério da saúde **Portaria nº 518/2004**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Cairney, S. et al. The neurobehavioural consequences of petrol (gasoline) sniffing. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*, New York, v.26, p.81-89, 2002.
- Calabrese, E. J.; Kostecki, P. **Hydrocarbon contaminated soils and groundwater**. United States of America: Lewis publishers, 1991. 293p.
- Cameotra, S.; Bollag, J.M. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, Philadelphia, v.30, n.2, p.111-126, 2003.
- Caramão, E. B.; Vilar, R. B. C.; Silva, R.; Schossler, P.; Veses, R. C.; Piatnicki, C. M. S.; Samios, D. Preliminary characterization of anhydrous ethanol used in Brazil as automotive fuel. *Journal of Chromatography A*, p.367-373, 2003.
- Cardoso, E. J.; Tsai, B. N.; Neves, S. M. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.

Casarini, D. C. P. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. CETESB, São Paulo. 2001. 247p.

Chang, S. H.; Devinny, J.; Bioaugmentation for soil bioremediation. In: Wise, D. L.; Trontolo, D. J. (Eds.) **Bioremediation of contaminated soils**. Marcel Dekker, New York, p. 465-488, 2000.

Chen, C. I.; Taylor, R. T. Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.48, p.121-128, 1997.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, **CETESB. 2010. Relação de áreas contaminadas**; São Paulo, SP, 2010. (acessado em: dezembro de 2010 e janeiro de 2011).

_____. **CETESB. 2009. Relação de áreas contaminadas**; São Paulo, SP, 2009. (acessado em: setembro de 2010).

(http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp) (acessado em: setembro de 2010).

_____. **CETESB 2008. Relação de áreas contaminadas**. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp. Acesso em: setembro de 2008.

_____. **CETESB, 2007. O Gerenciamento de Áreas Contaminadas no Estado de São Paulo. Lista das áreas contaminadas (novembro de 2007)**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>> Acesso em: maio de 2008

_____. **CETESB, 2006. O Gerenciamento de Áreas Contaminadas no Estado de São Paulo. Lista das áreas contaminadas (2006)**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>> Acesso em: maio de 2008.

_____. **CETESB, 2005. Relação de áreas contaminadas**. Disponível em: [_valores_2005.pdf](#), arquivo consultado em julho de 2008. 5p.

http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp (Acesso: julho de 2007)

_____. **CETESB, 2005**. Decisão de Diretoria Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005, Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001, e dá outras providências. Disponível na internet via: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela>

_____. **CETESB, 2001** . Manual de gerenciamento de áreas contaminadas. São Paulo (SP). Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>> Acesso em: dezembro de 2007.

_____. **CETESB, 2001**. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo/ Dorothy, C.P. C. et al., São Paulo, 2001, 73p.

Conselho Nacional de Ambiente -**CONAMA** – Resolução 273/2000 e Resolução 319/2002. <http://www.cetesb.sp.gov.br/licenciamento/legislacao/federal/resolucoes> (acesso: em dezembro 2007)

Cordazzo, J. **Modelagem e Simulação Numérica do Derramamento de Gasolina Acrescida de Álcool em Águas Subterrâneas**. 120p. Dissertação de mestrado em Engenharia Mecânica. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

CUNHA, C.D.; ROSÁRIO, M.; ROSADO, A.S.; LEITE, S. G. F. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. **Process Biochemistry**, Chicago, v. 39, p. 2277-2282, 2004.

Corseuil H. X.; Costa, A. H. R; Nunes, C. C. Biorremediação de águas subterrâneas impactadas com gasolina e etanol com o uso de nitrato. *Engenharia Sanitária Ambiental*, v. 14, n. 2, p. 265-274, 2009.

Corseuil, H. X.; Costa, A. H. R.; Wendt, M. F. Biorremediação com injeção de nitrato de águas subterrâneas contaminadas por vazamento de gasolina. **XIV Congresso Brasileiro de Águas Subterrânea**, In: Florianópolis, RS, 11p., 2006,

Corseuil, H. X.; Fernandes, M. Atenuação natural de hidrocarbonetos em um aquífero contaminado com gasolina com etanol. **21º Congresso Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 10 p, 2001.

- Corseuil, H. X.; Fernandes, M. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 4, n. 1 e 2, p. 71-75, 1999-a.
- Corseuil, H.X. et al. **Co-solvency effect in aquifers contaminated with ethanol amended gasoline. In:** Natural attenuation of chlorinated petroleum Hydrocarbons, and other organic compounds, 3, Battelle. Conference proceedings from the fifth International In Situ and On-site Bioremediations Symposium. San Diego: Battelle Press, p. 135-140, 1999-b.
- Corseuil, H. X.; Kaipper, B. I. A.; Fernandes, M. Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol. **Water Research**, Orland, v. 32, n. 7, p. 2065-2072, 1998.
- Corseuil, H. X.; Martins, M. D. Contaminação de Águas Subterrânea por Derramamento de Gasolina: O Problema é Grave? In: **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 2, n. 2, 1997.
- Corseuil, H. X.; Martins, M. D. Contaminação de Águas Subterrânea por Derramamento de Gasolina: O Problema é Grave? In: **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 2, n. 2, 1997.
- Corseuil, H. X.; Weber, W. J. Jr. Potential biomass limitations on rates of degradation on monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. **Water Research**, v.28, p.1415-1423, 1994.
- Coutinho, R. C. P.; Gomes, C. C. Técnicas para remediação de aquíferos contaminados por vazamentos de derivados de petróleo em postos de combustíveis. XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 19 p., 2006
- Corseuil, H. X.; Costa, A. H. R.; Wendt, M. F. Biorremediação com injeção de nitrato de águas subterrâneas contaminadas por vazamento de gasolina. **XIV Congresso Brasileiro de Águas Subterrânea**, In: Florianópolis, RS, 11p., 2006,
- Cunha, C. D. **Avaliação da biodegradação de gasolina em solo**. 1996. 97 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

- Cunha, C. D.; Leite, S. G. F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 31, p. 4-49, 2000.
- Cunha, C. D.; Leite, S. G. F.; Rosado, A. S.; Rosário, M. **Biorremediação de água Subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente**. Rio de Janeiro: CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL/ MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. CETEM /MCT, 45p. (Série Tecnologia Ambiental, 47), 2008
- Deeb, R.A.; Sharp, J.O.; Stocking, A.; Mcdonald, S.; West, K.A.; Laugier, M.; Alvarez, P.J.J.; Kavanaugh, M.C.; Alvarez-Cohen, L. Impact of ethanol on benzene plume lengths: microbial and modeling studies. **Journal of Environmental Engineering**, Amsterdam, v.128, n.9, p.868-875, 2002.
- Diel, L.; Lookman, R. Microbial systems for in-situ soil and grouwater remediation. **Environment and Process Technology**, p. 61-77, 2007
- Donaldson, S. G.; Glenn, C. M.; Miller, W. W. Remediation of gasoline-contaminated soil by passive volatilization. **Journal of Environmental Quality**, v.21, p. 94-102, 1992.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA -**Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos**. Manual de Métodos de Análises de Solos. Rio de Janeiro, 1997.
- Fairbanks, M. M. Consumidor Ganha Novas Gasolinas. **Revista Química e Derivados**, v.298, p.16-18, 1992.
- Fatorelli, L. **Proposta de Avaliação de Risco Ecológico para Contaminações de Petróleo e Derivados** - Estudo de Caso. 2005. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- Feris, K.; Marckay, D.; Sieyes, N.; Chakraborty, I.; Einarson, M.; Hristova, K.; Scow, K. Effect of ethanol on microbial community structure and function during natural attenuation of benzene, toluene, and o-xylene in a sulfate-reducing aquifer. **Environmental Science Technoly**, v. 42, p. 2289-2294, 2008.

- Fernandes, M. Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos monoaromáticos em aquíferos contaminados com gasolina. Florianópolis, Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental- Universidade Federal de Santa Catarina), pp. 115., 1997.
- Ferreira, J.; Zuquette, L. V. **Considerações sobre as interações entre contaminantes constituídos de hidrocarbonetos e os compostos do meio físico.** Instituto de Geociências, 557p, 1998.
- Frioni, Lillíán. **Ecología microbiana del suelo.** Montevideo: Universidade de la Republica, p.519, 1990.
- Gatte Jr, W. 35 anos da criação do proálcool: do álcool-motor ao veículo *flex fuel*. **XII SEAMED/USP** (seminários em administração da Universidade de São Paulo), dezembro de 2010.
- Gerba, C. P.; Maier, R. M.; Pepper, I. L. **Environmental Microbiology.** Academic Press, United States, 2000, 585p.
- Gibson, D.T.; Parales, R.E. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology** 11: 236-243, 2000.
- Guerra-Santos, L.; Käppeli, O.; Fiechter, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.48, n.2, p.301-305, 1984.
- Guiguer, N. **Poluição das águas subterrâneas e do solo causada por vazamentos em postos de abastecimento.** Waterloo Hydrogeologic, Inc. 356p, 2000.
- Guimarães, C. H. D. **Avaliação de Risco Ambiental de Sítios Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo.** 315 p. Tese Mestrado em Engenharia Civil. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, 2003.
- Hendrickx, B. et al. Alternative primers sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTXE degradation: Distribution of the genes in BTXE degrading isolates and in subsurface soils of a BTXE contaminated industrial site. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v.64, p.250-265, 2006.

- Hendriksen, H. V.; Larsen, S.; Ahring, B. K. Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.365-370, 1992.
- Hess, T. F.; Shimidt, S. K.; Silvensteinm J.; Howe, B. Supplemental substrate enhancement of 2,4-dinitrophenol mineralization by a bacterial consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1551-1558, 1990.
- Hicks, R. J.; Stotzky, G.; Voris, P. Review and evaluation of effects of xenobiotic chemicals on microorganisms in soil. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.35, p.195-253, 1990.
- Hunt, C. S.; Alvarez, P. J. J., Effect of ethanol on aerobic BTX degradation. **Bioremediation**, v.4, n. 1, 6 p., 1997.
- Hunt, C. S.; Ferreira, D. S.; Corseuil, H. X.; Alvarez, P. J. J., Effect of ethanol on aerobic BTEX degradation. In: *In situ and Onsite Bioremediation*, Alleman B. C. and A. L. Leeson, v. 4, n.1, p. 49-54, 1997.
- Huntz, C. S.; Alvarez, P. J. J. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. **Revista Iationamericana de microbiologia**, v. 44, n. 2, p. 83-104, 2002
- Jindrová, E.; Chocova, M.; Demnerová, K., Brenner, V. Bacterial Aerobic Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene. **Folia Microbiology**, v. 47 (2):83-93, 2002.
- Jonio, H.; Bibeau, L.; Heitz, M. Biofiltration of air contaminated by styrene: effect of nitrogen supply, gas flow rate, and inlet concentration. **Environmental Science Technology**, v.34, p.1764-1771, 2000.
- Junca, H.; Pieper, D. H. Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries. **Environmental Microbiology**, Braunschweig, v.6, n.2, p.95-110, 2004.
- Kao, C. M.; Wang, C. C. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. **Wat. Res.**, v. 34, n. 13, p. 3413-3423, 2000.

- Kataoka, A. P. A. **Biodegradação de resíduos oleosos de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de lanfarming**. Rio Claro (SP): tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2001, 202 p.
- Karlson, U.; Willumsen, P.A. Screening of bacteria, isolated from PAH- contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation** , v.7, p. 415-423, 1997.
- Kim, D.; Kim, Y. S.; Kim, S. K.; Kim, S. W.; Zyistra, G. J.; Kim, Y. M.; Kim, E. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.7, p.3270-3278, 2002.
- Koch, A.L. **“Growth Measurement.”** In: P. Gerhard (Ed.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 257-260. American Society for Microbiology, Washington, D,1994.
- Labud, V.; Garcia, C.; Hernandez, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. **Chemosphere**, v. 15, p.59-60, 2007.
- Lawrence, A.; Jonsson. S.; Borjesson, G. Ethanol, BTEX, and microbial community interations in E-blend contaminated soil slurry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 654-666, 2009.
- Lee, S. J., Choi, N. C., Kim, D. J. Effect of glucose on toluene biodegradation during transport through quartz sand column. **Geophysical Research Abstracts**, Lindau, v.9, p. 2514, 2007.
- Leite, Rogério Cezar de Cerqueira; LEAL, Manoel Régis L. V. O bicombustível no Brasil. **Novos Estudos**, n. 78, 2007. Aspray, T. J.; Carvalho, D. J. C.; Philip, J. C. Application of soil
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- Maier, R. M.; Pepper, I. L.; Gerba, C. P. **Environmental Microbiology**. Academic Press, United States, 2000. 585p.

- Maier, R. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.52, p.101-121, 2003.
- Malina, G.; Grotenhuis, J.T.C.; Rulkens, W.H. Vapor extraction/Biovent sequential treatment of soil contaminated with volatile and semivolatile hydrocarbon mixtures. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.6, n.2, p.159-176, 2002.
- Mancini, T. M. **Métodos De Caracterização de Áreas Potencialmente Contaminadas por Hidrocarbonetos de Petróleo**. 2002. 187p. Trabalho de Formatura. Rio Claro (SP): Universidade Estadual Paulista - Instituto de Geociências, 2002.
- Marchal, R.; Penet, S.; Solano-Serena, F.; Vandecasteele, J.P. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. **Oil & Gas Science and Technology**, v 58(4), p: 441-448, 2003.
- Marchetti J.M.; Miguel, V.U.; Errazu, A.F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Colorado, v.11, n.6, p.1300-311, 2007.
- Mariano, A. P.; Angelis, D. F.; Bonotto, D. M.; Piróllo, M. P. S.; Contiero, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. In: **XXII Interamerican Congress of Chemical Engineering**, Buenos Aires, 2006.b.
- Mariano, A. P.; Crivelaro, S. H. R.; Angelis, D. F.; Bonotto, D. M. Use of vinasse, an ethanol distillery waste, as an amendment to bioremediation of diesel oil contaminated soils. In: **XXII INTERAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING**, Buenos Aires, 2006.a.
- Mariano, A.P.; Tomasele, R.C.; Oliveira, L.M.; Contiero, J., Angelis,D.F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African Journal of Biotechnology*, v.7, n.9, p.1323-1328, 2008.
- Mesarch, M. B.; Nakatsu, C. H.; Nies, L. Development of catechol 2, 3- dioxygenase specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.2, p.678-683, 2000.
- McGill, W. B.; Rowell, M. J.; Westlake, D. W. S. Biochemistry, ecology and microbiology of petroleum components in soil. In: Paul, E. A.; Land, J. N. **Soil Biochemistry**, v. 5, p. 22-296, 1981. 1981

- Mielniczuk, C. **A população microbiana e a degradação de resíduos petroquímicos no solo**, Porto Alegre: UFRGS - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 1991, 135 p., Dissertação (Mestrado).
- Milanez, A. Y.; Filho, P.S. C; Rosa, S. E. S. **Perpectivas para o etanol brasileiro**. **BNDES Setorial**, *Rio de Janeiro*, n. 27, p. 21-38, março 2008
- Miller, R. M., Zhang, Y. Chapter 4 Measurement of biosurfactant-enhanced solubilization and biodegradation of hydrocarbons. **Bioremediation Protocols: Humana Press: Nova Jersey**, p.59-66,1997.
- Mindrisz, A. C. **Avaliação da contaminação da água subterrânea de poços tubulares, por combustíveis fósseis, no município de Santo André, São Paulo**:uma contribuição à gestão ambiental. 254p. Tese de doutorado. São Paulo (SP): Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2006.
- Mirante, C. V. A. Biorremediação, 2000.[www. geocities.com/ reciclagem 2000/ biorremediação. Htm](http://www.geocities.com/reciclagem2000/biorremediação.Htm)McGILL, W.B, ROWELL, MJ, WESTLAKE, D.W.S. Biochemistry, ecology and microbiology of petroleum components in soil. In: PAUL, E.A.; LAND, J.N. **Soil Biochemistry**, NewYork,, v.5, p.229-296, 2000.
- Mohammed, N.; Allayla, R. Effect of groundwater velocity on pilot scale bioremediation of gasoline contaminated sandy aquifers. **Water, Air, and soil pollution**, v.120, p. 315-329, 2000.
- Morais, E. B.; Tauk-Tornisielo, S. M. Crescimento de bactérias isoladas de solo em gasolina, São Paulo, v. 71, p: 601-603, 2004
- Morales, D. L. **Biodegradação da fração BTX e etanol da gasolina comercial e da gasolina pura por microrganismos isolados de locais impactados**. Porto Alegre: UFRGS- Programa de Pós-graduação do Instituto de Ciências Básicas da Saúde Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, 118 p., Dissertação (Mestrado), 2008.
- Moreira, M.S.F.; Siqueira, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora UFLA. 2002.606p.

- Moreira, M.S.F.; Siqueira, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, Minas Gerais: Editora UFLA (Universidade Federal de Lavras), 2006. 626p.
- Mulligan, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p.183-198, 2005.
- Namkoong, Wan; Park, Joon-Seok; Vandergheynst, Jean S. Biofiltration of gasoline vapor by compost media. **Environmental Pollution**, v.121, p. 181-187, 2003.
- Nyer, E. K. **Practical techniques for groundwater and soil remediation**. Lewis publishers, United States of America, 2000. 214 p
- Ochoa-Loza, F. J. et al. Effect of clays, metal oxides and organic matter on rhamnolipid biosurfactant sorption by soil. **Chemosphere**, Oxford, n.66, p.1634-1642, 2007.
- Oh, K.T.; Kang, C. M.; Kubo, M.; Chung, S.Y. Culture condition of *Pseudomonas aeruginosa* F722 for biosurfactent production., **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, p. 471-476, 2006.
- Oh, K.T.; Lee, Y. W.; Kubo, M.; Kim, S. J.; Chung, S.Y. Isolation, identification and characterization of bacteria degrading crude oil. **Journal Kor. Science Environmental Engineering** v.22, p. 1851-1859, 2000.
- Oliveira, E. **Contaminação de aquíferos por hidrocarbonetos provenientes de vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneo**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Instituto de Geociências, São Paulo, 1992. 111p.
- Oliveira, F. S., Teixeira, L. S. G., Araujo, M. C. U., Korn, M. Screening analysis to detect adulterations in Brazilian gasoline samples using distillation curves. **Fuel**, v. 83, p. 917-923, 2004.
- Otenio, M. H.; Silva, M. T. L.; Marques, M. L. O.; Roseiro, J. C.; Bidoia, E.D. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, p.258-261, 2005.
- Pala, D.M.; Freire, D. Dias De Carvalho; Sant'Ana Jr, G. Lippel. Bioremediation of clay soils impacted by petroleum. **Engenharia térmica**, edição especial, p.29-32, 2002

- Passman, F. J., Mcfarland, B. L., Hillyer, M. J. Oxygenated gasoline biodeterioration and its control in laboratory microcosms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, p. 95-106, 2001
- Paul, E. A.; Clark, F. E. **Soil microbiology and biochemistry**. California: Academic press, Inc., p. 275, 1989.
- Penner, G. C. **Estudos Laboratoriais da Contaminação do Solo por Gasolina com o Uso de Detetor de Fotoionização**. 107p. Dissertação de Mestrado. São Carlos (SP): Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2000.
- Peressutti, S. R.; Alvarez. H. M.; Pucci, O. H. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of experimental oil pollution in Patagonian soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 21-30, 2003.
- Pinzon, N.M.; Kwang, L; Ju Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p.975-981, 2009b.
- Pinzon,N.M.; Kwang , L; Ju Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide **Biotechnology Letters**, v. 31, n 10, p. 1583-1588, 2009a.
- Pirollo, M. P. S. Estudo da Produção de Biossurfactantes Utilizando Hidrocarbonetos. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – São Paulo, 2006.
- Pirollo, 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 hydrocarboncontaminated site. **Journal Applied Microbiology**, v.105, p. 1484-1490, 2008.
- Plaza, G.; Wypych, J.; Berry, C.; Brigmon, R. L. Utilization of monocyclic aromatic hydrocarbons individually and in mixture by bacteria isolated from petroleum-contaminated soil. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.23, p. 533-542, 2007.

- Powers S.E. et al. The transport and fate of ethanol and BTEX in groundwater contaminated by gasohol. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 79-123, 2001.
- Prantera, T. M.; Drozdowicz, A.; Leite, S. G.; Rosato, Q. S. Degradation of gasoline aromatic hydrocarbons by two N₂- fixing soil bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 25: p.85-89, 2002.
- Prata, F.; Lavorenti, A.; Regitano, J. B.; Tornisielo, V. L. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 36, n.7, p. 975-981, 2001.
- Prenafeta-Boldú, F. X.; Ballersted, H.; Gerritse, J.; Grotenhuis, J. T. C. Bioremediation of BTEX hydrocarbons: effect of soil inoculation with the toluene grownin fugs *cadophialophora sp. Strain T1*. **Biodegradation**, v. 15, p. 59-60, 2004.
- Prince, R.; Sufflita, J. M.; Anaerobic biodegradation of natural gas condensate can be stimulated by the addition of gasoline biodegradation, **Biodegradation**, v. 18, p: 515-523, 2007.
- Pritchard, P. H.; Costa, C. F. EPA's Alaska oil spill bioremediation project. **Environment. Scienc Techonology.**, v. 25, p. 372-379, 1991.
- Rahman, K. S. M.; Bnat, I. M.; Thahira, J.; Thayumanavan, Tha.; Lakshmanaperumalsamy, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Techonology**, v. 81, p. 25-32, 2002.
- Rahman, K.S.M. et al. **Environmental bioremediation technologies**. Berlin: Springer, 2007, p. 391-408.
- Raikhlin-Eisenkraft, B. et al. Determination of Urinary Hippuric Acid in Toluene Abuse. **Journal of Toxicology**, v.39, p.73-76, 2001.
- Raimundo, R. S; Rizzo, A. C. L. Efeito da adição de surfactantes na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solo. Disponível em:

- <http://www.cetem.gov.br/html/serie_anais_IX_jic_2001/renatar.pdf>. (Acesso em: 29 de Março, 2004). 2001
- Rice, D. Background on ethanol. **Underground Tank Technology Update**, Madison, v.14, n.4, p.2-3, 2000.
- Sabaté, J., Vinas, M., Solanas, A. M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, n. 1, p. 19-25, 2004.
- Salsa, C. A genealogia do etanol. **Cidania & Meio Ambiente**, p.30-31, 2009.
- Schneider, M.R. **Intemperismo de fontes de contaminação em aquíferos impactados por derramamentos de gasolina e álcool e a influência sobre o risco à saúde humana**. 2005. 192 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- Serena, F. S.; Marchal, R.; Ropars, M.; Lebeault, J. M.; Vandecasteele, J. P. Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. **Journal of applied microbiology**, n. 86, p.1008-1016, 1999.
- Shailubhai, K. Treatment of Petroleum Industry Oil Sludge in Soil. **Reviews**, Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1986, p. 202, 206.
- Shewfelt, K.; Lee, H.; Zyhuier, R. Optimization of nitrogen for bioventing of gasoline contaminated soil. **Journal Environmental Engineering**, vol. 4, 29-42 pp, 2005.
- Shim, H.; Shin, E.; Yang, S. A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 203-216, 2002.
- Siddique, T. et al. Metabolism of BTXE and naphtha compounds to methane in oil sands tailings. **Environmental Science Technology**, Washington, v.41, n.7, p.2350- 2356, 2007.

- Siegmund, I.; Wagner, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnology, Technology**, Northwood, v.5, p.265-268, 1991.
- Silva, C. C. G. **Otimização de uma unidade de *air stripping* para remover BTEX de águas residuárias.** Dissertação de Mestrado. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Química, 2004.
- Silva, F. L. N.; Santos, J. R.; Neto, JR J. M. M.; Silva, R. L. G. O. Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada no posto do Estado Pauí. **Revista Nova**, v. 32, n. 1, 56-60, 2009.
- Silva, R. L. B. **Contaminação de Poços Rasos no Bairro Brisamar, Ítaguai, RJ, por Derramamento de Gasolina:** Concentração de Btex e Avaliação da Qualidade da Água Consumida Pela População. 182p. Tese de Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, 2002.
- Singh, H. **Mycoremediation: fungal bioremediation**, p. 115-148, 2006.
- Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Alexander, M. **Fundamentals of analytical chemistry.** 7nd ed. New York: Saunders College, p.205-209, 2001.
- Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F.J.; Crouch, S. R.; *Fundamentos de Química Analítica*, 8. ed., Thomson: São Paulo, 2006.
- Soares A. A. **Avaliação da Biorremediação de Água Subterrânea Contaminada com Gasolina:** Experimentos em Microcosmos e em Campo. 2006. 172p. Dissertação de mestrado em Ciências. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.
- Solano- Serena, F. et al. Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 1008-1016, 1999.
- Solano-Serena, F.; Marchal, R.; Vandecasteele, J. P. Biodegradation of aliphatic and alicyclic hydrocarbons. In: **Petroleum Microbiology**, p;173-240. IFP Publications, 2008.

Spinelli L.; Schnaid. F.; Selbach, P. A., Oliveira, J. R.; Selbach, B. Ensaios de laboratório aplicados à biodegradação de diesel e gasolina em solo. **Anais do III Simpósio de Prática de Engenharia Geotécnica da Região sul**, GEOSUL'2002, Joinvile, SC, p. 123-127, 2002.

Spinelli, L. de F. **Biorremediação, toxicidade e lesão celular em derrames de gasolina**. Porto Alegre: UFRS- Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, 2005.194 p., Tese (Doutorado).

Spinelli L.; Schnaid. F.; Selbach, P. A., Oliveira, J. R.; Bento, F. M. Enhancing bioremediation of diesel oil and gasoline in soil amended with na agroinstry slude. **Journal Air & waste manage**, v. 55, p. 421-429, 2005.

Tahzibi, A.; Kamal, F.; Assadi, M. M. Improved production of rhamnolipids by a pseudomonas aeruginos mutant. **Iraniam Biomedical journal**, Iranian, v. 8, p.1, 25-31, 2004.

Tiburtius, E. R. L.; Zamora, P. P. Contaminação de águas por BTXE e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, São Paulo, v.27, p.441-446, 2004.

Trovão, R. S. **Análise ambiental de solos e águas subterrâneas contaminadas com gasolina**: estudo de caso no Município de Guarulhos. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Minas e de Petróleo. São Paulo (SP): Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2006.224p.

Skoog, W, D. M.; Holler, F.J.; Alexander, M. **Fundamentals of analytical chemistry**. 7nd ed. New York: Saunders College, 2001. p.205-209.

Souza, D. B.; Brito, G. C. B.; Vasconcelos, C. N.; Braga, L. C. Estudo de microorganismos presentes em ua área contaminada por gasolina comercial. **Revista de Estudo Ambientais** (online), v. 12, n.2, p. 38-46, jul./ dez. 2010.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **USEPA, 2008**. Disponível na Internet via <http://www.epa.gov/superfund/index.htm>. Arquivo acessado em 2008.

_____.**USEPA, 2006**. <http://ww.itopf>. Acesso em novembro de 2006.

_____.USEPA, 2003. Chapter III-Behavior of hydrocarbons in the subsurface, 2003.
Disponível em: <http://www.epa.gov/oust/pubs/fpr_c3.pdf> Acesso em: abril de 2008.

_____.USEPA. 2000-a. Bioaccumulation testing and interpretation for the purpose of sediment quality assessment: status and needs. EPA 83-R-00-001. Washington, D.C. 20460, p. 111.

_____.USEPA, 2000-b. Innovative remediation technologies: field-scale demonstration projects in north america, 2 nd edition, United States, p 1-77.

_____.USEPA. 1996. METHOD 8000 (8015-B Nonhalogenated organics using GC/FID), CD-ROM, revision 2, December, 1996

_____.USEPA. 1996. METHOD 5000 - Sample preparation for volatile organic compounds (5021-Solids Sample, Volatile organics compounds, Automated headspace) and METHOD 8000 (8015-B Nonhalogenated organics using GC/FID), CD-ROM, revision 2, December, 1996.

_____.USEPA. 1996. METHOD 5000 - Sample preparation for volatile organic compounds (5021-Solids Sample, Volatile organics compounds, Automated headspace) and v.39, p.983-988, 2004.

_____.USEPA. 1996. METHOD 8015A. Nonhalogenated organics using CG/FID. EPA, revision 2, 28p. 1996.

_____.USEPA 1990. Assessing UST corrective action technologies: early screenig of clean-up technologies for the saturated zone. EPA/600/2-90/027. p.124, 1990.

Ulrich, G. **The fate and transport of ethanol-blended gasoline in the environment, surbec-art**, Oklahoma, 1999

Ulrich, G. The fate and transport of ethanol-blended gasoline in the **environment, surbec-art**, Oklahoma, 1999

Wongsa, P.; Tanaka, M.; Ueno, A.; Hasanuzzaman, M.; Yomoto, I.; Okuyama, H. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. **Current Microbiology**, v. 49, p. 415-422, 2004.

Wrenn, B. A.; Haines, J. R. Venosa, A. D. ; Kadkhodayan, M. ; Suidan, M.T. Effects of nitrogen source on crude oil degradation. **Journal Industry Microbiology**, v.13, p. 279-286, 1994.

Yadav, J. S.; Redy, C. A. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Application Environmental Microbiology**, v. 59, p. 756-762, 1993.

4 DESCRIÇÃO E ESQUEMA GERAL DO PLANEJAMENTO DOS ESTUDOS

A parte experimental foi realizada em três estudos conforme se apresenta resumidamente na figura 4.1. Para a realização destes estudos todos os solos e os combustíveis utilizados foram gentilmente cedidos pela Companhia Petroquímica do Sul (COPEL, atual BRASKEM). Estes materiais (combustíveis e solos) foram deslocados com veículos do Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH), para o Laboratório de Biorremediação de Solos, do Departamento de Solos, da UFRGS, em sacos dentro de caixas de isopor, com gelo, que após a chegada foram armazenados sob refrigeração a 4°C.

As análises dos combustíveis foram fornecidas pela BRASKEM. As análises de solo *in natura* foram analisadas pelo Laboratório de Análises de Solo da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Todos os experimentos e análises da parte experimental foram realizados em triplicatas. No Laboratório de Biorremediação do Departamento dos Solos, da UFRGS foram realizadas as análises biológicas, respirométricas e de detecção de biossurfactantes. As análises química, referentes à cromatografia gasosa, das amostras de solo e de meio mineral com e sem combustível pelos processos de biorremediação, foram realizadas no laboratório de Química Analítica Ambiental, do Instituto de Química, da UFRGS.

As análises biológicas foram realizadas com a esterilização, quando necessária, do material, das soluções, dos meios e do combustível utilizado nos ensaios. A gasolina comercial, utilizada no meio líquido, foi esterilizada por filtração, utilizando membranas com porosidade de 0,22 µm, e após foi armazenada em frasco esterilizado, fechado hermeticamente, com o objetivo de evitar ao máximo a perda de alguns compostos por volatilização. Para evitar a foto-oxidação, os frascos foram cobertos por papel alumínio e acondicionados à temperatura de 4°C.

O sistema fechado foi utilizado em todos os estudos visando verificar a degradação do combustível pela atividade microbiana do solo, através da liberação do CO₂ (teste respirométrico) e dos compostos voláteis dos combustíveis (por cromatografia gasosa) em meio líquido, ou no solo, em laboratório. O sistema fechado com e sem solo constituísse de um frasco de vidro de 1,5 L contendo amostra de cada tratamento, que foi fechado

hermeticamente. Os tratamentos utilizados no teste respirométrico foram de processos de biorremediação (solo com 5% de combustível com e sem adição de aceleradores do processo), testemunho (solo com ou sem aceleradores do processo, sem combustível) e branco (frasco vazio para quantificar somente a liberação de CO₂ do meio).

O sistema fechado com meio líquido consistia de frasco de vidro de 50 mL para análises biológicas e de vidro de 20 mL de *headspace* para análises químicas. Cada frasco continha 10 mL meio mineral M1, com 1% de gasolina, com inóculo ou sem inóculo (controle). Estes foram hermeticamente fechados, onde após o período de amostragem e de análise cada amostra foi descartada devido à volatilização da mesma. O sistema aberto foi estruturado em tubos de PVC, de diâmetro de 5 cm e altura de 100 cm. Nestes foram adicionadas as amostras de cada tratamento, e monitoradas em três profundidades diferentes (1, 50 e 100 cm), conforme período de amostragem. Os tratamentos utilizados foram: processos de biorremediação por atenuação natural e por bioestimulação (solo *in natura* com 5% de combustível com e sem adição de 1% de glicose, respectivamente); testemunho (solo com ou sem 1% de glicose, sem combustível). Estes sistemas abertos foram monitorados no meio sujeito, aos vários fatores como diferentes profundidades do solo (1, 50 e 100 cm), e ambientais (no verão com temperaturas médias de 35 a 40°C e, no outono com temperaturas médias de 25 a 30°C). Pelas análises biológicas (dos degradadores com NMP e de heterotróficos com NMP e UFC), químicas (por cromatografia gasosa; pela redução dos compostos voláteis como etanol, BTX, C9+ e TPH correspondente a cada combustível avaliado no solo), teor de umidade e de pH.

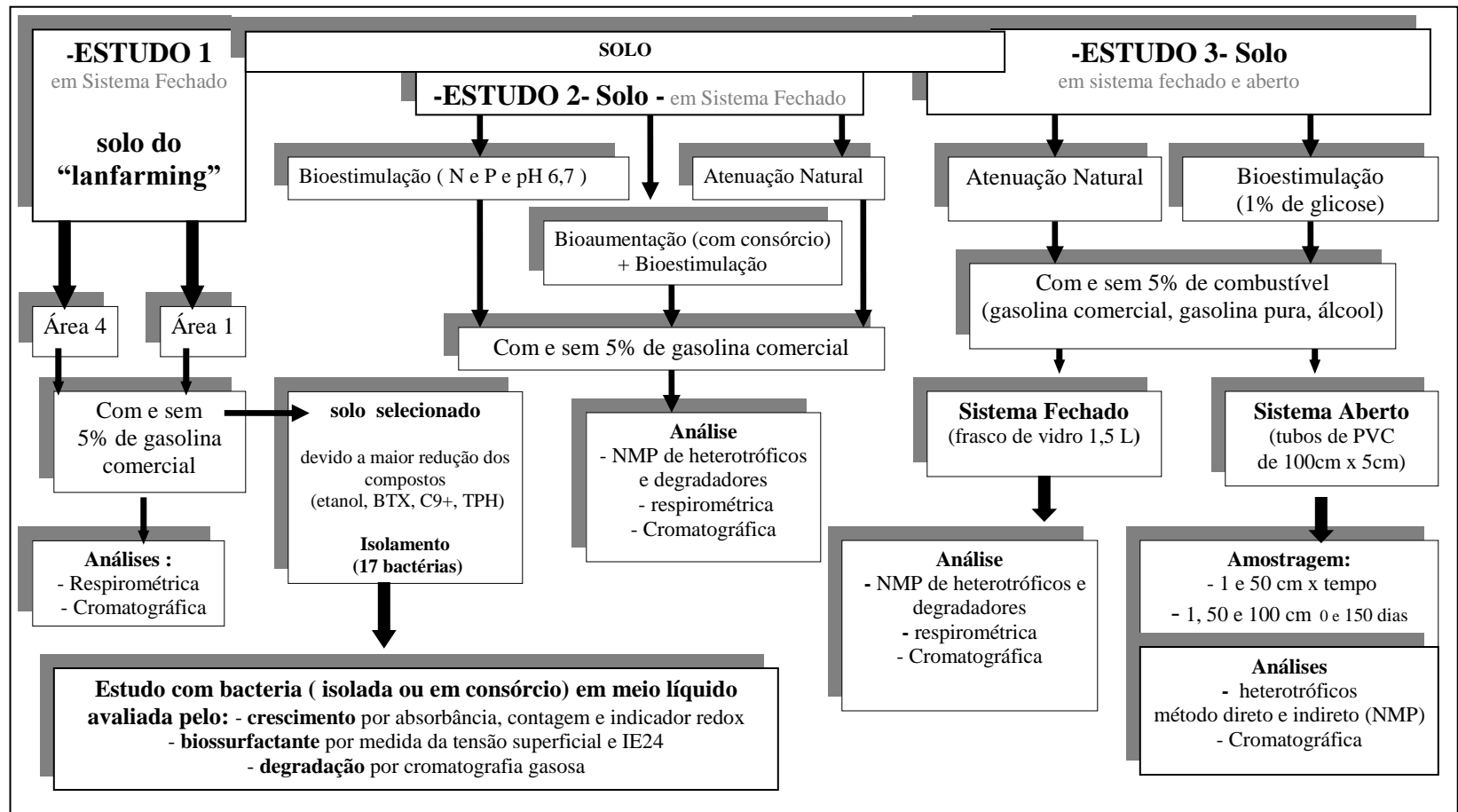


Figura 4. 1 Fluxograma geral dos três estudos realizados.

OBS: IE24= índice de emulsificação avaliado depois de 24 horas;

NMP = Número Mais Provável..

5 ESTUDO 1

Biodegradação da gasolina comercial (adição de 24% de álcool) em meio líquido por isolados bacterianos (sozinhos ou na forma de consórcio) obtidos do solo *landfarming*

RESUMO

A gasolina comercial no Brasil contém etanol, o qual aumenta a solubilidade do benzeno, tolueno e xilenos (BTX), em águas, além de poder ser preferencialmente degradado por micro-organismos em relação aos hidrocarbonetos da gasolina comercial. Os micro-organismos podem utilizar os derivados do petróleo como fonte de carbono e, de energia para seu crescimento.

Na fração da gasolina considerada hidrofóbica, os micro-organismos podem coexistir na mesma e no ambiente e produzir biossurfactantes, que facilitam a degradação e a remediação da gasolina em solos e águas contaminadas. Os micro-organismos geradores de biossurfactantes podem ser utilizados como aditivos em solos e águas contaminadas, facilitando a sua biodegradação.

Este trabalho teve como objetivo o isolamento de micro-organismos de solo de *landfarming* com histórico de contaminação de 21 anos com resíduo petroquímico. Foi avaliado o comportamento dos isolados em meio mineral com 1% de gasolina comercial (24% de etanol). Os parâmetros utilizados para avaliar os micro-organismos obtidos, e selecionar os de maior potencial de degradação foram: o crescimento microbiano, a geração de biossurfactantes e a redução dos compostos da gasolina comercial. A partir dos micro-organismos que apresentaram melhores resultados de biodegradação formou-se consórcios constituídos de 4 distintos micro-organismos.

Constatou-se que houve crescimento microbiano na presença da gasolina comercial, e na maioria dos isolados houve, em parte, a degradação dos compostos da mesma, bem como a produção de biossurfactantes. O etanol foi degradado parcialmente pelos isolados obtidos, porém os dados não nos permitem afirmar que o mesmo foi preferentemente degradado em relação aos hidrocarbonetos. Os consórcios analisados apresentaram eficiência de 95 a 98%

na degradação da maioria dos compostos da gasolina comercial, no tempo selecionado, de 72 horas.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Solo do *landfarming*

O solo utilizado nos experimentos foi classificado como Argissolo vermelho distrófico (EMBRAPA, 1999), proveniente de um sistema de tratamento de resíduos petroquímicos, *landfarming*, fornecido pela Companhia Petroquímica do Sul (COPEL, Brasil, RS), atual BRASKEM. O *landfarming* utilizado continha 12 células de 3.000 m², cada uma, que foram construídas em 1989, para disposição de diferentes taxas de borras oleosas da indústria petroquímica, contendo uma complexa mistura de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Duas células de diferentes áreas foram escolhidas para este trabalho, como da: área 4 por ter recebido a borra 7 dias antes da coleta e a área 1, por ter recebido a borra 30 dias antes da coleta. As amostras de solo das áreas 1 e 4 foram coletadas, aleatoriamente de 5 pontos de amostragem, em profundidades de 0-30 cm em cada área. Estas amostras foram transportadas para o laboratório em condições adequadas e com temperatura de 4°C.

5.1.2 Meios líquidos (ou mineral) utilizados para o crescimento dos micro-organismos

Os meios líquidos utilizados foram M1 (RICHARD & VOGEL, 1999), na maioria dos experimentos, e BH (*Bushnell-Haas*) com indicador redox TTC (cloreto de trifeniltetrazólio) no teste colorimétrico, para avaliar a degradação preliminar da gasolina com isolados. Além destes, foi usado o caldo nutritivo para acelerar o crescimento dos isolados estocados, em meio Agar nutritivo.

O meio M1 (Richard & Vogel, 1999), usa em sua composição macro nutrientes e sub-

nutrientes em água. A quantidade e os reagentes que compuseram os macros nutrientes foram de (g.L⁻¹): 0,7 KCl, 2,0 KH₂PO₄, 3,0 Na₂HPO₄, 1,0 NH₄ NO₃ ;em água deionizada. Para obter a completa composição do meio M1, foi adicionado 1 mL L⁻¹ de solução de sub-nutrientes com a seguinte composição de (g.L⁻¹): 4,0 MgSO₄, 0,2 FeSO₄, 0,2 MnCl₂, 0,2 CaCl₂ g.L⁻¹; em água deionizada.

O meio BH (*Bushnell-Haas*, 1941), consiste de (g L⁻¹): MgSO₄, 0,2, CaCl₂, 0,02, KH₂PO₄, 1,0, K₂HPO₄, 1,0, NH₄NO₃, 1,0, FeCl₃, 0,05. O caldo nutritivo foi composto de: 3 g de extrato de carne e 5 g de peptona diluídos em 1 L de água deionizada. O meio Agar nutritivo consiste de (g L⁻¹): 3,0 de extrato de carne, 5,0 de peptona, 15 de Agar; em água deionizada. Após, adição dos reagentes, a solução foi avolumada em 1L e o pH ajustado para 7. Os meios minerais foram esterilizados em autoclave a 120° C, por 20 min.

5.1.3 Gasolina comercial

A gasolina comercial com 24% de etanol foi cedida pela Cia Petroquímica do Sul (COPEL, hoje BRASKEM). A mesma foi transportada e estocada em frascos de vidro cor âmbar hermeticamente fechados e acondicionada em ambiente com temperatura de 4 °C. A gasolina comercial utilizada no solo do *landfarming* não foi esterilizada e a adicionada ao meio mineral sim. A gasolina comercial esterilizada foi submetida a sistema de filtração a vácuo com membrana (0,22 µm) para retirar os micro-organismos existentes. A gasolina comercial estéril foi armazenada em frasco de vidro, hermeticamente fechado coberto com papel alumínio para evitar a fotoxidação e acondicionada à temperatura de 4 C°.

5.1.4. Seleção da área para isolamento dos micro-organismos

Para a seleção da área com micro-organismos de maior potencial na degradação dos compostos (etanol, BTX, C9+ e TPH) da gasolina comercial, foram realizados os seguintes tratamentos (conforme metodologia de Jacques, 2005): **a-** branco (frasco de 1,5 L vedado, sem solo nem gasolina comercial de modo a medir o CO₂ presente no meio); **b-** testemunho

da área 1 (frasco de 1,5 L vedado, com 200g de solo da área 1); **c-** testemunho da área 2 (frasco de 1,5 L vedado, com 200g de solo da área 2); **d-** atenuação natural **da área 1** (frasco de 1,5 L vedado, com 200g de solo da área 1 e 5 % de gasolina comercial); **e-** atenuação natural **da área 4** (frasco de 1,5 L vedado, com 200g de solo da área 4 e 5 % de gasolina comercial). Em todos os frascos foram adicionados béqueres de 50 mL, com 20 mL de NaOH 0,4 M, para sorção do CO₂ e posterior análise respirométrica, os quais foram substituídos por novos frascos com NaOH após cada período de amostragem. Os tratamentos foram incubados a temperatura ambiente e as análises respirométrica e cromatográfica foram realizadas nos períodos de 0, 10, 20 e 30 dias.

5.1.5. Análise respirométrica

A análise respirométrica foi feita para medir a concentração de dióxido carbono (CO₂) das amostras de solo dos tratamentos e do ambiente detectado no branco (frasco sem solo), liberado durante o período de ensaio, em sistema fechado. Esta análise se baseia na determinação do CO₂ liberado pela ação dos micro-organismos sobre a matéria orgânica existente no solo (Stotsky, 1965). O CO₂ liberado durante o ensaio foi sorvido em solução de hidróxido de sódio (NaOH). Esse CO₂ foi sorvido pela solução de hidróxido de sódio (NaOH, 0,4 mol L⁻¹) de 20 mL contida no béquer de 50 mL que estava dentro do frasco de vidro de amostragem, em sistema fechado. A cada coleta de amostra e determinação de CO₂, os frascos de amostragem foram abertos para reirada dos béqueres que continham o CO₂, sorvido pelo NaOH. Após esta etapa, novos béqueres foram colocados dentro dos frascos de amostragem que foram fechados imediatamente.

Aos béqueres retirados dos frascos de amostragem foi adicionado 1 mL de cloreto de bário (BaCl₂, 1 mol L⁻¹) em cada béquer para cessar a sorção de CO₂, do ambiente. Depois da adição de BaCl₂ procedeu-se a titulação da seguinte maneira: adicionou-se duas gotas de indicador fenoftaleína a solução contida no béquer, e esta solução contida no béquer foi transferida para um erlenmeyer de 100 mL que ficou sob agitação magnética durante a adição de ácido clorídrico (HCl, 0,4 mol.L⁻¹), contido em bureta de 50 mL. O término da titulação foi visualizado pela mudança da coloração rosa, fenoftaleína em meio básico, para incolor, fenoftaleína em meio ácido. A quantidade de CO₂ foi expressa em miligramas por kg de solo, segundo a equação 1 (Stotsky, 1965), mostrada a seguir.

$$(C \rightarrow CO_2) = (B - V) \times C_{HCl} \times \frac{\bar{M}_{CO_2}}{2} \times F \quad (1)$$

onde:

$(C \rightarrow CO_2)$ = massa do CO_2 , em $mg\ kg^{-1}$ de solo.

B = volume de ácido clorídrico, em mL, gasto para titular o branco.

V = volume de ácido clorídrico, em mL, gasto para titular a amostra.

C_{HCl} = concentração do ácido clorídrico em $mol.L^{-1}$.

\bar{M}_{CO_2} = massa molar do CO_2 em $g\ mol^{-1}$ dividida por 2, corresponde ao equivalente-grama do CO_2 .

$F = 10$, fator de conversão de massa, de $mg/100mg$ do solo para $mg\ kg^{-1}$ do solo.

5.1.6 Isolamento do micro-organismos do solo

Em frasco de vidro de 50 mL, com 9 mL de meio M1, foi adicionado um grama de solo da melhor área obtida no item 5.1.4 e 1% v v⁻¹ de gasolina comercial estéril (como única fonte de carbono e energia). Os frascos foram hermeticamente fechados, com tampas de borracha cobertos com fitas de teflon que foram lacradas com septos de alumínio. E, esses frascos foram incubados por 7 dias, em *Shaker* com 150 rpm, a 30°C. A cada 7 dias, uma alíquota de um mL de solução foi transferida para outro frasco contendo 9 mL de meio contendo 1% v v⁻¹ de gasolina comercial estéril. Após, o mesmo foi lacrado e incubado nas mesmas condições anteriores. Depois de três transferências, 21 dias, as culturas foram diluídas em solução salina (NaOH 0,85%), e inoculadas em meio Agar nutritivo incubadas por 24 horas, a 30°C, para caracterização da morfologia colonial e celular. As colônias formadas apresentaram diferentes morfologias e colorações, as quais foram purificadas por repiques, passando de um meio Agar nutritivo para outro. Os 17 isolados bacterianos obtidos foram estocados em meio Agar nutritivo em tubos inclinados, a 4°C.

5.1.7 Obtenção do inóculo

As células de cada isolado, estoque obtidas no item 5.1.6, foram inoculadas em caldo nutritivo, e incubadas a 30°C em 150 rpm, por 24 horas. Após este período, os isolados em caldo nutritivo foram centrifugados (10.000 rpm, 10 min, a 15°C) e lavados com água deionizada estéril, por três vezes, onde cada sobrenadante foi descartado e o inóculo de cada isolado foi adicionado ao meio mineral. O inóculo de cada isolado em meio mineral obteve uma densidade ótica (D.O), em absorvância (A), que foi medida em espectrofotômetro (Spectrumlab, 22PC, Brasil), em 600 nm. O inóculo padrão de cada isolado com absorvância determinada foi obtido em função do volume de inóculo diluído em certo volume de meio mineral (M1 ou BH) e apresentou um número de células (ou unidade formadora de colônias, UFC) mL⁻¹. Este número de células de cada inóculo padrão foi obtido por diluições decimais, que foram inoculadas em meio de cultura em placa de Petri e incubadas a 30°C, em 24 horas. Após, 24 horas foi realizada a contagem de UFC da amostra de cada isolado no respectivo período de amostragem.

5.1.8 Preparação do inóculo padrão

A preparação dos inóculos foi diferente para os isolados e para os consórcios. Para o inóculo padrão de cada isolado, no tempo zero, foi utilizado 0,02 mL de um isolado diluído em 9,98 ml de meio mineral, para obter densidade ótica de 0,07 de absorvância (A), com correspondência de 10⁴ UFC mL⁻¹. O inóculo do consórcio foi composto de 4 isolados escolhidos aleatoriamente, onde de cada isolado foi adicionado um volume de 0,010 mL, em 9,96 ml de meio mineral, de modo a obter 0,140 de absorvância, com correspondência de 10⁸ UFC mL⁻¹. Estes valores apresentam pequenas variações de acordo com cada isolado bacteriano utilizado. Também, deve-se salientar que, os inóculos preparados dos isolados bacterianos (10⁴ UFC mL⁻¹) tiveram menor biomassa que a dos consórcios bacterianos (10⁸ UFC mL⁻¹).

5.1.9 Teste de biodegradabilidade por indicador TTC

A biodegradação preliminar (ou qualitativa) da gasolina comercial com 24% de etanol ($v v^{-1}$), por isolados bacterianos foi verificada com o uso do indicador redox cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), como um aceptor final de elétrons, o qual é reduzido para trifenil formazan (TPF) (ALEF, 1995; BENTO *et al.*, 2005). A redução do TTC a TPF foi avaliada visualmente pela mudança na coloração do meio, de incolor (oxidado), para lilás e roxo (reduzido). Esta técnica tem sido empregada em vários trabalhos (COMACK & FRAILE, 1997; HANSON *et al.*, 1993; ROY *et al.* 2002; MARIANO *et al.*, 2008a, b; PIROLLO *et al.*, 2008; JUNIOR *et al.*, 2009), e é muito utilizada para estimar a atividade da enzima desidrogenase no solo, baseada no uso do indicador redox TTC.

Neste teste foi utilizado inóculo padrão de 0,02ml de cada isolado, em 9,98 mL do meio da mistura de 400 mL de BH, com 100 mL de TTC. O TTC foi obtido a partir de 0,025g de TTC em 100 mL de água destilada. Para a obtenção do inóculo padrão, anteriormente mencionado, se determinou a densidade de 0,07 contendo concentração de inóculo de 10^4 UFC mL^{-1} , em 10mL de meio mineral contendo 1% ($v v^{-1}$) de gasolina comercial, em frasco de vidro, de 50 mL fechado hermeticamente. Também foram feitos ensaios controle, não inoculados. Todos os frascos foram cobertos com papel alumínio para evitar a fotoxidação. Após, os frascos foram incubados a 30 °C, sob agitação constante (150 rotações por minuto-rpm), por 72 horas. Todos os testes foram feitos em triplicata.

5.1.10 Experimento de Biodegradação com isolados ou consórcio

Para o monitoramento da biodegradação da gasolina por isolados ou consórcios, foram montados ensaios com meio mineral M1, contendo inóculo padrão de cada isolado ou consórcio, (conforme item 5.1.8), e 1% ($v v^{-1}$) de gasolina comercial estéril, em frascos hermeticamente fechados, com tampas de silicone e lacres de alumínio. Eses frascos foram incubados sob agitação orbital (150 rpm) a 30°C, por 72 horas. Conjuntamente foram montados experimentos controles, os quais não continham inóculos, somente 10 ml de meio M1 com 1% $v v^{-1}$ de gasolina comercial estéril. Para os experimentos dos testes biológicos

foram usados frascos de vidro de 50 mL e, para os testes de monitoramento da redução dos compostos da gasolina por técnica cromatográfica, foram usados frascos *headspace* de 20 mL conforme Figura 5.1. Devido à alta capacidade de volatilização dos compostos da gasolina, para cada período de amostragem foi utilizada uma amostra, sendo a mesma descartada após a análise.



(a)



(b)

Figura 5. 1 Frascos utilizados nas análises biológicas e químicas, em sistema fechado.

OBS: (a) Frasco de vidro de 50 ml (para análises biológicas); (b) Frasco *headspace* ou de vidro de 20 ml (para análises químicas: cromatográficas)

A gasolina estéril foi adicionada diretamente no meio mineral contendo o inóculo padrão ou não (controle), através de micro seringa (*Hamilton 81317*).

5.1.11 Análises biológicas

5.1.11.1 Biomassa

Neste estudo foram isolados 17 micro-organismos, os quais foram avaliados quanto ao crescimento microbiano, nos tempos zero e 72 horas. Sete isolados apresentaram melhores resultados e estes foram avaliados pelo crescimento as dispensas da gasolina comercial estéril, como única fonte de carbono no meio mineral, em períodos de 12 em 12 horas, por 72 h. Dos

sete isolados, foram formados 3 consórcios, com 4 isolados aleatoriamente, dos sete selecionados, os quais foram avaliados em relação a biomassa nos tempos zero e 72 horas. Neste experimento foi utilizado 1 mL de amostra (com isolado ou consórcio), o qual foi diluído quando necessário, para obter a leitura em absorbância dentro da escala do equipamento (espectrofotômetro, *Spectrumlab*, 22 PC), em 600 nm (OH *et al.*, 2006). Experimentos controles, sem a presença de isolados ou consórcio (inóculo) foram paralelamente avaliados. A calibração do aparelho foi feita com a água destilada.

A contagem de células viáveis das amostras foi avaliada em 0 e 72 horas, pelo método de placa usando Agar nutritivo. A unidade formadora de colônia (UFC) das amostras das culturas e do controle foi determinada após incubação de 24 horas, a 30°C.

5.1.11.2 Detecção de biosurfactante

A capacidade do isolado bacteriano em produzir biosurfactante, foi realizada em meio mineral M1 com 1% (v v⁻¹) de gasolina comercial, por incubação a 30° C, em 150 rpm, por 72 horas. A produção de biosurfactante foi avaliada nos períodos de zero e 72 horas, pela redução da tensão superficial e pelo índice de emulsificação (IE) obtido, após 24 horas de estabilização (IE24%).

O índice de emulsificação foi avaliado na presença e na ausência de células, removidas através de centrifugação em 10.000 rpm, por 10 min, a 15 °C. Para isto, 2 mL do meio de cultura foram misturados a 2 mL de gasolina comercial, em um tubo de vidro pyrex de fundo chato (100 mm x 15 mm). O tubo foi agitado em vortex por dois minutos e deixado em repouso por 24 horas, para obtenção de emulsão estável. O índice de emulsificação (IE24%) foi obtido pela medida da altura da coluna emulsificada de gasolina comercial, dividido pela altura total da mistura e multiplicada por 100.

A tensão superficial da amostra de cada isolado na ausência de células, foi determinada nos período de 0 e 72 horas, a 25° C e após estabilização por 1h. As medidas de tensão superficial foram realizadas em tensiômetro digital (Gibertini, Milão, Itália), utilizando o método da placa de Wilhelmy. A calibração do aparelho foi realizada com água destilada (69 mN m⁻¹), e mistura de meio M1 com gasolina comercial com tensão superficial de 67 mN m⁻¹.

5.1.12 Análise por cromatografia

A capacidade dos isolados e consórcios bacterianos para degradar compostos da gasolina comercial (etanol, BTX, C9+ e TPH) em amostras com meio M1 e de solo, foi avaliada por cromatografia nos períodos de zero e 72 horas, em meio líquido, e, diferentes períodos de amostragem em solo. A metodologia usada em solo e em meio líquido para as análises de cromatografia seguiu a descrição abaixo:

A) Solo:

Cerca de dois gramas de solo de cada tratamento foram removidos, pesados e adicionados a frascos de *headspace* com adição de 10 mL de água deionizada. Após lacrar os frascos, com septos de silicone e lacres de alumínio, estes foram agitados por 30 segundos e submetidos à análise em um cromatógrafo a gás (Shimadzu 17A, Japão), equipado com detector de ionização em chama com sistema de injeção *headspace* automático (HS/GC/FID), em coluna DB5 (5% fenil metil polisiloxano-30mx 0,25 mmX 0,25 mm) e com gás de arraste H₂ (fluxo de 1,0 mL min⁻¹). As condições cromatográficas de análise foram realizadas segundo o método USEPA 8015-B-96 e 5021-96: que utilizaram temperatura e tempo de condicionamento do frasco de 80 °C, por 15 minutos; programa de temperatura do forno de 40 °C, por 3 minutos, seguido de taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹ até 90 °C, mantido por 5 minutos com posterior aquecimento de 10 °C min⁻¹ até 150°C, permanecendo por um minuto. As temperaturas do injetor e detector foram 120 °C e 210 °C, respectivamente. Volume de injeção: 1,0 µL no modo *splitless*. Nestas condições o tempo de análise foi de 43 minutos.

A análise quantitativa foi realizada pela técnica de padronização externa, na faixa de concentração de 5 a 30 mg.kg⁻¹ e detalhada no Anexo 1. A redução dos compostos da gasolina na amostra de solo, no tempo estudado foi obtida em relação ao tempo zero da mesma. Para cada batelada de amostras analisadas foi feito uma curva analítica padrão.

B) Meio líquido

Neste experimento não se realizou coleta, visto que as amostras de meio mineral com e sem 1% (v.v⁻¹) de gasolina comercial estéril e na presença ou não de isolados, foram realizadas dentro no frasco de *headspace* de 20 mL, em sistema fechado. As descrições destas amostras em meio líquido encontram-se no item **5.1.10**. As concentrações dos compostos

avaliados em meio líquido de cada amostra foram obtidas pelo método de calibração externa, na faixa de concentração de 30 a 5 mg mL⁻¹ e detalhada no Anexo 1. A verificação da redução dos compostos da gasolina da amostra, no meio líquido, foi calculada em relação ao ensaio controle do mesmo período. O ensaio controle consistiu de mistura meio mineral M1 e gasolina comercial (9,9:0,1 v v⁻¹), isenta de inóculo, de modo a descontar perdas por degradação abiótica (volatilização e fotodegradação). Os resultados foram apresentados na forma de redução percentual do etanol, BTX, C9+ e TPH da amostra, em relação ao ensaio controle. Para cada batelada de amostras analisadas foi realizado uma curva padrão.

5.1.13 Detecção de biossurfactante tipo ramnolípideo

Este método de detecção de *ramnolípideos* tem sido bastante usado para descrever a produção deste tipo de biossurfactante (BENTO *et al.*, 2008; PINZON & JU, 2009 a), o qual indica a produção de ramnolípidios pelas colônias inoculadas, através da presença de halos (círculos) azuis, em torno das colônias (TULEVA *et al.*, 2002; BENTO *et al.*, 2005b). Os halos são formados na presença de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), e azul de metileno em Agar (PINZON & JU, 2009 b), devido a um par de íons insolúveis entre o ramnolípideo e o brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), e azul de metileno. O tamanho do halo pode estar correlacionado com a quantidade de produção de *ramnolípideo* (SIEGMUND & WAGNER, 1991; PINZON & JU, 2009 a e b), porém este método não é quantitativo e pode sofrer interferências de outros pigmentos, gerando um falso resultado (PINZON & JU, 2009 b). Os *Ramnolípideos* são grupos de biossurfactantes produzidos geralmente por bactérias *Pseudomonas aeruginosas*, que podendo ser avaliados por método semi-quantitativo proposto por SIGMUND & LANG (1991). A confirmação da presença do biossurfactante *ramnolípideo* se dá através da redução da tensão superficial e/ou de elevado índice de emulsificação do meio. O método também pode ser usado para selecionar qualquer biossurfactante aniônico de baixa massa molecular (BODOUR & MAIER, 2002).

Para a realização deste teste, cada um dos isolados foi inoculado no meio (CTAB com azul de metileno em Agar) com o auxílio de uma alça de platina. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 30°C, durante 72 horas.

5.1.14 Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicatas e o resultado das análises respirométricas e cromatográficas foram analisadas estatisticamente pelas comparações das médias e variância pelo teste de Tukey, e com diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.2.1 Seleção da área do solo para isolamento de micro-organismos

A Figura 5.1 apresenta o gráfico das análises respirométricas nos experimentos das áreas 1 e 4 de solo do *landfarming*, as quais receberam resíduos petroquímicos por mais de 21 anos.

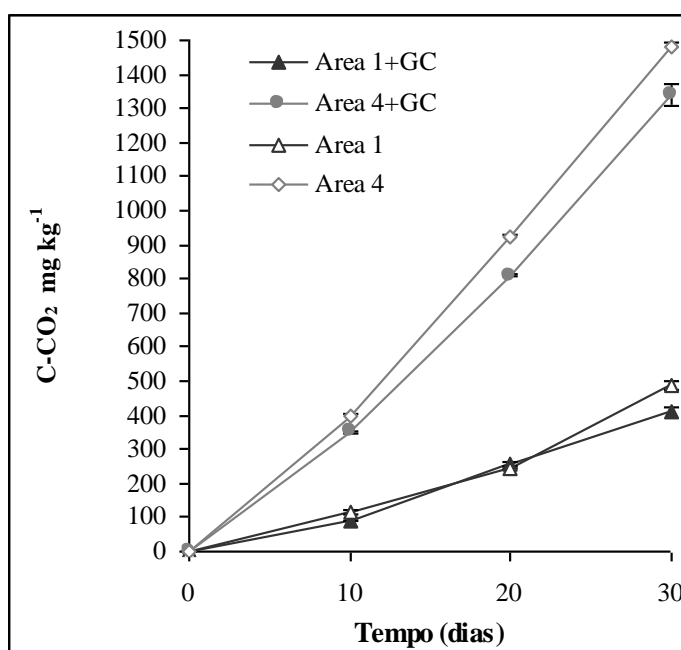


Figura 5.2 Concentração do C-CO₂ produzido pelos micro-organismos do solo do *landfarming* das áreas 1 (borra 30 dias antes da coleta) e 4 (7 dias antes da coleta) com e sem gasolina comercial (CG), durante 30 dias.

O solo do *landfarming* de cada área tem histórico diferentes de recebimento de resíduo (área 4 recebeu resíduo **7 dias** antes da coleta e a área 1, **30 dias** antes), o que pode explicar a maior produção de C-CO₂ acumulado da área 4 (recebeu borra 7 dias antes da coleta), em relação à área 1 (que recebeu borra 30 dias antes da coleta), apresentando um valor mais alto do que a área 1, de 72%. Tal fato certamente promoveu enriquecimento e seleção de uma população microbiana com capacidade de degradar complexos hidrocarbonetos, o que pode

explicar o comportamento similar de ambas as áreas não terem apresentado diferença significativa na produção de C-CO₂, na presença ou não da gasolina comercial. Este comportamento indica que os micro-organismos autóctones não foram afetados na presença da gasolina comercial, e que provavelmente os micro-organismos degradadores dos resíduos petroquímicos foram eficientes na degradação dos hidrocarbonetos (de cadeias lineares, ramificados, cíclicos e aromáticos), tanto que forneceram elevada percentagem de mineralização. Segundo a literatura (DEVINNY & CHANG, 2000) o sucesso de biodegradação é dependente do nível metabólico e da adaptação genética da população microbiana no seu meio.

A Tabela 5.1 mostra o % de redução dos compostos da gasolina comercial nos solos da área 1 e 4, para um período de 30 dias.

Tabela 5. 1 Percentual (%) de redução dos compostos da gasolina (etanol, BTX, C9+ e TPH) em amostras de solo de cada tratamento (*landfarming* das áreas 1 e 4 com gasolina comercial, A-1 e A-4, respectivamente) no período de tempo avaliado em relação ao tempo zero.

Tempo (dia)	% de redução dos compostos da Gasolina comercial no solo das áreas em relação ao tempo zero											
	Etanol		Benzeno		Tolueno		Xileno Total		C9+		TPH	
	Desvio padrão		Desvio padrão		Desvio padrão		e Desvio padrão		Desvio padrão		Desvio padrão	
	A-1	A-4	A-1	A-4	A-1	A-4	A-1	A-4	A-1	A-4	A-1	A-4
10	73	70	82	59	73	48	77	50	81	61	84	66
	±1	±2	±4	±2	±2	±4	±1	±3	±4	±3	±2	±1
20	89	71	89	77	84	69	88	72	91	76	91	80
	±6	±3	±0	±1	±0	±1	±0	±1	±0	±1	±3	±2
30	91	71	93	79	91	75	91	74	91	73	93	79
	±5	±1	±1	±3	±0	±1	±1	±4	±1	±4	±1	±3

Analisando os dados da tabela, percebe-se elevada redução de todos os compostos da gasolina comercial monitorados, principalmente na área 1, aos 30 dias. Todos os compostos da gasolina avaliados apresentaram uma faixa de redução no solo da área 1 de 73 a 84,0% e da área 4 de 48 a 70 %, em 10 dias. Com o passar do tempo, a redução destes compostos foi aumentando acentuadamente na área 1 e bem mais tênue na área 4, uma vez que a faixa de redução de todos os compostos avaliados em 30 dias, no solo da área 1 foi de 91 a 93 % e da área 4 de 71 a 79%. O decréscimo mais tênue na área 4 pode ser atribuído ao fato de que a

população microbiana que recebeu a borra sete dias antes da montagem dos experimentos, estava fisiologicamente mais ativa à presença dos hidrocarbonetos mais pesados presentes nas borras oleosas, tornando-os mais eficiente na redução dos mesmos, e parcialmente eficiente nos mais leves (C₄-C₁₂) da gasolina.

Pelos dados obtidos, verificou-se que apesar da área 1 ter apresentado menor produção de CO₂, a mesma apresentou maior consumo dos componentes da gasolina comercial, provavelmente por conter micro-organismos com maior potencial de degradação destes compostos, nas condições estudadas. Isto pode ser explicado considerando que os micro-organismos tiveram preferência pela degradação dos compostos da gasolina em relação aos compostos da borra. Preferência oposta pode ter ocorrido com a microbiota da área 4.

5.2.2 Crescimento de micro-organismos

O solo da área 1 apresentou micro-organismos com maior eficiência na redução dos hidrocarbonetos estudados, sendo que este solo foi selecionado para o isolamento de micro-organismos. Deste solo foram obtidos 17 isolados (denominados, UFRGS 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17), que foram avaliados pela capacidade de crescimento na presença da gasolina comercial existente no meio mineral. Os resultados do crescimento microbiano foram obtidos pela densidade ótica e contagem da população microbiana, e a degradação qualitativa da gasolina pode ser verificada com a redução da TTC, conforme Figura 5.3 e a Tabela 5.2.

A Figura 5.3 apresenta o perfil da densidade ótica versus tempo, para um período de 72 h de incubação destes micro-organismos, onde se observa que todos os micro-organismos cresceram e os que mais sugeriram adaptação da gasolina comercial no meio foram os isolados 2, 6, 7, 13, 14, 16 e 17.

Segundo os dados obtidos nesta tabela, os isolados 2, 5, 6, 7, 12, 14, 15 e 17, foram os que geraram os melhores resultados de crescimento (UFC mL⁻¹) e redução do TTC. Por estes dados foram selecionados sete isolados (denominados 2, 5, 6, 7, 14, 15 e 17), visto que dos oito isolados acima enfocados, com melhores resultados, um foi descartado, o isolado 12, por ter semelhante coloração e menor densidade ótica que o isolado 14, conforme Figura 5.3.

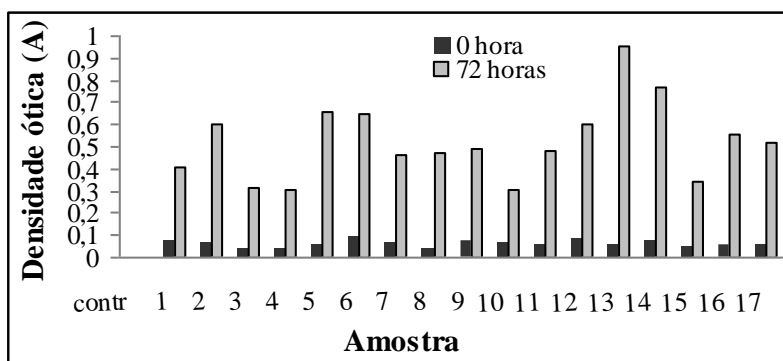


Figura 5. 3 Crescimento dos 17 isolados avaliado por densidade ótica (A), em meio mineral com gasolina comercial, nos períodos de 0 e 72 horas de incubação.

Tabela 5. 2 Crescimento dos micro-organismos e redução do TTC conforme isolado bacteriano, em meio mineral e gasolina comercial, em 72 horas de incubação.

Amostra	(UFC mL ⁻¹)		TTC ^a
	0 hora	72 horas	72 horas
Controle	nd	nd	-
Isolado 1	1,21x10 ³	37 x10 ⁵	+
Isolado 2	341 x10 ³	113 x10 ⁷	+++
Isolado 3	33 x10 ⁴	127 x10 ⁷	+
Isolado 4	99 x10 ³	88 x10 ⁸	++
Isolado 5	341 x10 ³	37 x10 ⁸	+++
Isolado 6	33 x10 ⁴	77 x10 ⁶	++++
Isolado 7	136 x10 ⁴	38 x10 ⁸	+++
Isolado 8	213 x10 ⁴	193 x10 ⁷	+
Isolado 9	30 x10 ³	70 x10 ⁴	+
Isolado 10	158 x10 ³	70 x10 ⁸	+
Isolado 11	117 x10 ³	49 x10 ⁷	-
Isolado 12	44 x10 ⁴	42 x10 ⁸	+++
Isolado 13	44 x10 ³	48 x10 ⁷	-
Isolado 14	63 x10 ³	142 x10 ⁷	+++
Isolado 15	158 x10 ⁴	99 x10 ⁷	+++
Isolado 16	117 x10 ³	103 x10 ⁷	-
Isolado 17	60 x10 ⁴	70 x10 ⁸	++++

^a TTC redução: + **Coloração fraca**; ++ **Coloração mediana**; ++++ **Coloração Intensa**; - **não detectado (nd)**.

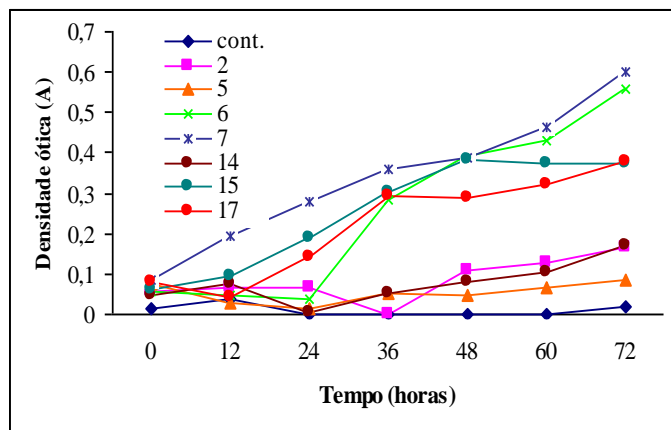


Figura 5. 4 Crescimento dos 7 isolados avaliados por densidade ótica (A), em meio mineral com gasolina comercial de 12 em 12 horas, por 72 horas de incubação.

Os resultados da produção de biossurfactantes pelas medidas de tensão superficial sem células e pelo índice de emulsificação (EI 24%), com e sem células, e do tipo *ramnolípideo*, estão apresentados nas Figuras 5.5, 5.6 e 5.7, respectivamente.

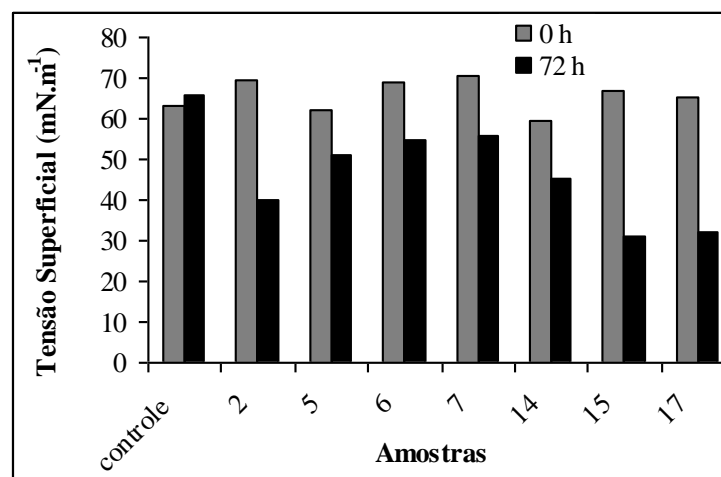


Figura 5. 5 Medida da tensão superficial de cada isolado em meio mineral com gasolina comercial nos tempos zero e 72 horas de incubação.

Conforme Busquets *et al.* (2000), bons produtores de biossurfactantes são considerados aqueles micro-organismos que reduzem a tensão superficial de um meio para 40mN m^{-1} ou menos. Isto ocorreu com os isolados UFRGS 2, 15 e 17, no período de 72 horas. Além disso, verifica-se elevada redução da tensão superficial para aproximadamente 30 mN m^{-1} nos isolados UFRGS 15 e 17, indicando estes serem bons geradores de biossurfactantes.

Os isolados UFRGS 6, 7, 15 e 17, durante 72 horas produziram mais biomassa em relação aos demais isolados, embora os isolados UFRGS 6 e 7, não tenham reduzido a tensão superficial significativamente neste período.

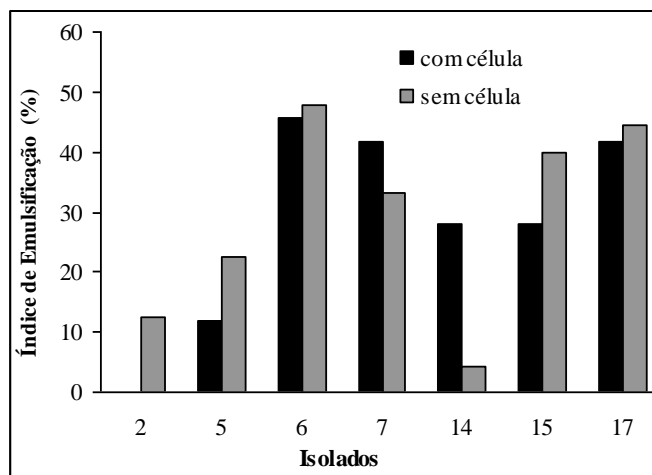


Figura 5. 6 Índice de emulsificação (EI 24%) de cada isolado com célula, por 72 horas de incubação em meio mineral com gasolina comercial.

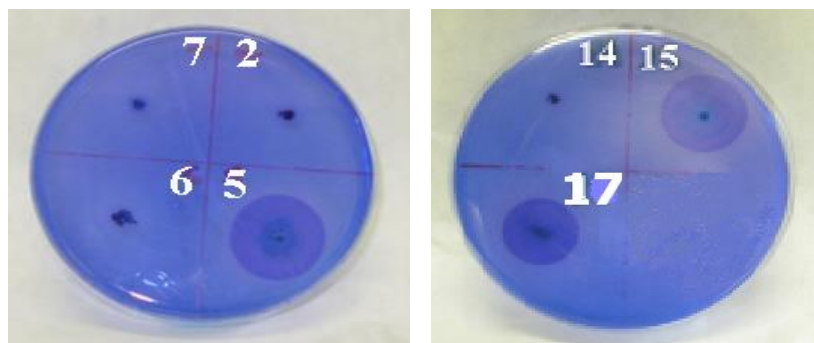


Figura 5. 7 Representação da produção de biossurfactantes do tipo *ramnolipídeo* em placas com agar (azul de metileno e CTAB) com inóculos dos isolados bacterianos UFRGS 2, 5, 6, e,7 (à esquerda) e UFRGS 14,15 e 17 (à direita).

Os níveis de IE24% foram obtidos acima de 10% em todos os sete isolados, por 72 horas, exceto para o isolado UFRGS 14, quando a condição de análises foi realizada sem a presença de células, sugerindo que alguns componentes com características de emulsificação extracelular foram produzidas. Quando os surfactantes são extracelulares, eles causam

emulsificação de hidrocarbonetos e quando eles são associados às células, eles facilitam a penetração dos hidrocarbonetos pelos espaços periplasmático (KOCH *et al.*, 1991). Nota-se que todas as medidas de IE24%, com células, no período de 72 horas, apresentaram IE24% acima de 30%, exceto os isolados UFRGS 2 e 5. Segundo Karlson & Willumsen (1997), micro-organismos podem ser bons produtores de biossurfactantes, quando eles geram IE24% de 40% ou mais. Neste experimento, os isolados que geraram estes valores foram UFRGS 6, 7 e 17 (com células) e UFRGS 6, 15 e 17 (sem células).

Pode-se visualizar a detecção de produção de biossurfactante através da redução da tensão superficial e elevação do IE24%, nas Figuras 5.4 e 5.5, no período de 72 horas. Pelas medidas de tensão superficial dos isolados nota-se que todos apresentaram redução.

Além disso, de acordo com a Figura 5.7, os isolados UFRGS 5, 15 e 17 produziram halo azul, que é resultado do complexo formado entre o biossurfactante com azul de metileno e CTAB, indicando a produção de *ramnolipídeos*, reforçando a capacidade destas bactérias de produzirem biossurfactantes (Tabela 5.3).

Cabe salientar que o isolado UFRGS 5 foi caracterizado como Gram-negativo e os isolados UFRGS 15 e 17 como Gram-positivo, conforme a Tabela 5.3. Também foram observados outros parâmetros com elevado IE24% e redução de tensão superficial para se confirmar a presença de biossurfactante do tipo *ramnolipídeo*. Isto foi observado nos isolados UFRGS 15 e 17, que mesmo sendo gram-positivos apresentaram elevados IE24% e grande reduções na tensão superficial (aproximadamente 30 mN m^{-1}), indicando que podem ser considerados geradores de biossurfactante do tipo *ramnolipídeo*.

Os resultados dos sete isolados bacterianos, em relação à degradação da gasolina comercial, por 72 horas, podem ser visualizados na Figura 5.8, pela redução dos compostos deste combustível (exceto, os isolados 2 e 14 não apresentaram degradação da gasolina comercial, no período estudado).

A Figura 5.8 apresenta os dados de redução para os compostos da gasolina comercial, em 72 horas. O etanol apresentou redução em todos os cinco isolados observados, seguido do benzeno que foi degradado por quatro dos isolados UFRGS (5, 7, 15 e 17) e parcialmente pelo isolado UFRGS 6. O isolado UFRGS 15 degradou em maior percentual dos compostos TPH. O isolado UFRGS 5 reduziu em maior percentual os xilenos totais, C9+, tolueno e o etanol juntamente com o isolado UFRGS 17, em relação aos demais isolados observados. Os isolados UFRGS 2 e 14 não apresentaram redução dos compostos da gasolina comercial no período e nas condições estudadas, não constando na Figura 5.8

Tabela 5. 3 Isolados bacterianos selecionados em meio mineral com gasolina comercial, por 72 horas de incubação, foram avaliados pela morfologia celular, pela contagem de bactérias e pela detecção de biossurfactante do tipo *ramnolípideo*.

Isolados bacterianos	Morfologia celular	Total de Bactérias (UFC mL ⁻¹)		Detecção de <i>Ramnolípideo</i> ^a
		0 hora (D.O =0,007)	72 horas	
Controle	Gram (+ ou -)	nd	nd	nd
Isolado UFRGS 2	Cocos, +	88,5x10 ⁴	72x10 ⁶	-
Isolado UFRGS 5	Bastonete, -	66,0x10 ³	330x10 ⁶	+
Isolado UFRGS 6	Bastonete, -	88,0x10 ³	74x 10 ⁶	-
Isolado UFRGS 7	Bastonete, +	200x10 ³	100 x 10 ⁶	-
Isolado UFRGS 14	Cocos, +	150x10 ⁴	6010 ⁷	-
Isolado UFRGS 15	Bastonete, +	155x10 ⁴	40x10 ⁷	+
Isolado UFRGS 17	Bastonete, +	885x10 ³	72x10 ⁶	+

^a detecção de *Ramnolípideo*: * círculo de complexação + e -, não detecção (nd)

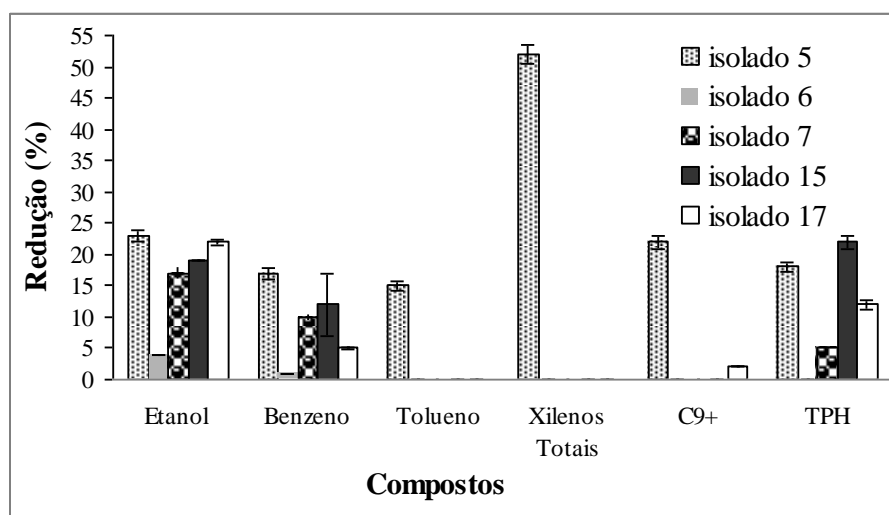


Figura 5. 8 Degradação estimada pela redução dos compostos etanol, BTX, C9 e TPH da gasolina comercial em meio mineral de cada isolado bacteriano em relação ao controle, por 72 horas de incubação.

A Figura 5.8 apresenta os dados de redução para os compostos da gasolina comercial, em 72 horas. O etanol apresentou redução em todos os cinco isolados observados, seguido do benzeno que foi degradado por quatro dos isolados UFRGS (5, 7, 15 e 17) e parcialmente pelo isolado UFRGS 6. O isolado UFRGS 15 degradou em maior percentual os compostos TPH. O isolado UFRGS 5 reduziu em maior percentual os xilenos totais, C9+, tolueno e o etanol juntamente com o isolado UFRGS 17, em relação aos demais isolados observados. Os isolados UFRGS 2 e 14 não apresentaram redução dos compostos da gasolina comercial no período e nas condições estudadas, não constando na Figura 5.8.

Em geral quando o isolado cresce só na presença do etanol, não há período de adaptação, porque o etanol pode ser degradado pelos constituintes enzimáticos associados a rotas metabólicas existentes (ALVAREZ *et al.*, 2002). Neste estudo, o etanol está presente na gasolina comercial e, por ser composto simples e hidrofílico, tender a ter, a degradação preferencial em relação aos BTX da gasolina em meio líquido. (RICE, 2000; CORSEUIL *et al.*, 2009). Isto pode ocorrer devido à presença de enzimas constitutivas que são produzidas naturalmente pelos micro-organismos por meio de vias metabólicas. No entanto, para degradar BTX as enzimas necessárias demandam tempo e a presença de contaminante para serem induzidas (DEEB *et al.*, 2002).

O etanol quando preferencialmente degradado (Cordazzo, 2000; Beller *et al.*, 2001) pode consumir o oxigênio e os demais aceptores de elétrons do meio, e inibir ou impedir a biorremediação dos BTX (ALVAREZ *et al.*, 2001; CORSEUIL *et al.*, 2009). Este fato do etanol ser preferencialmente degradado em relação aos BTX pelos isolados nas condições e períodos estudados não foi verificado, conforme **Figura 5.8**.

O fato de o etanol poder ser preferencialmente degradado implica na permanência do benzeno no meio, o que é extremamente prejudicial, visto ser ele altamente tóxico e apresentar propriedades carcinogênicas e mutagênicas. Além disto, segundo Trovão (2006), o benzeno é o composto mais recalcitrante dos BTX em condições anaeróbias. Entretanto outros autores informam que os xilenos são os mais recalcitrantes. Neste experimento observou-se que nas condições estudadas, cinco dos isolados iniciaram a degradação do benzeno e só um dos isolados (UFRGS 5) apresentou degradação dos xilenos. Tal comportamento pode indicar que neste caso, os xilenos foram os mais recalcitrantes para a maioria dos isolados.

5.2.3 Crescimento microbiano dos isolados no consórcio

Os três consórcios estudados (UFRGS N1, N2 e N3), foram monitorados pelo crescimento microbiano (medida de absorbância e contagem em placa), dados apresentados na Tabela 5.4, e pela redução dos compostos etanol, BTX, C9+ e TPH, da gasolina em meio líquido (Figuras 5.9 e Tabela 5.5).

Tabela 5. 4 O crescimento microbiano em meio mineral com gasolina comercial com 24% de etanol, de 0 e 72 horas de incubação, foi avliado pela absorbância e pela contagem de células bacterias totais (UFC) de cada consórcios (com os respectivos isolados)

Consórcio	Absorbância (A) e UFC (mL ⁻¹), nos tempos zero e 72 horas				
	Isolados (UFRGS)	0 hora		72 horas	
		A	UFC	A	UFC
CONTROLE	<i>Não tem</i>	0,002	0	0,007	0
UFRGS N1	2, 5, 6 e 17	0,115	2 x10 ⁸	0,746	2,4 x10 ¹²
UFRGS N2	6, 7, 14 e 17	0,140	1,5 x10 ⁸	0,656	2,2 x10 ¹²
UFRGS N3	5, 6, 15 e 17	0,140	1,55 x10 ⁸	0,675	2 x 10 ¹²

Tabela 5. 5 Reduções dos compostos etanol, BTX, C9 e TPH da gasolina comercial de cada consórcio, em relação ao controle (sem bactérias), em meio mineral, por 72 horas de incubação.

Consórcio	% médio de redução dos compostos da Gasolina Comercial em cada consórcio em relação ao controle, em 72 horas de incubação							
	Etanol	Benzeno	Tolueno	m-xileno	p-xileno	o-xileno	C9+	TPH
UFRGS N1	98,89	36,57	97,42	97,39	97,80	98,63	99,90	96,91
Desvio padrão	±0,13	±4,84	±0,21	±0,24	±0,63	±2,3	±0,12	±0,24
UFRGS N2	99,33	97,98	67,01	97,84	98,18	98,86	99,90	97,47
Desvio padrão	±0,70	±0,29	±5,09	±0,20	±0,53	±2,1	±0,01	±0,72
UFRGS N3	99,49	98,35	98,27	14,74	26,34	47,93	99,19	94,71
Desvio padrão	±0,49	±0,13	±0,20	±0,14	±0,34	1,7	0,20	0,63

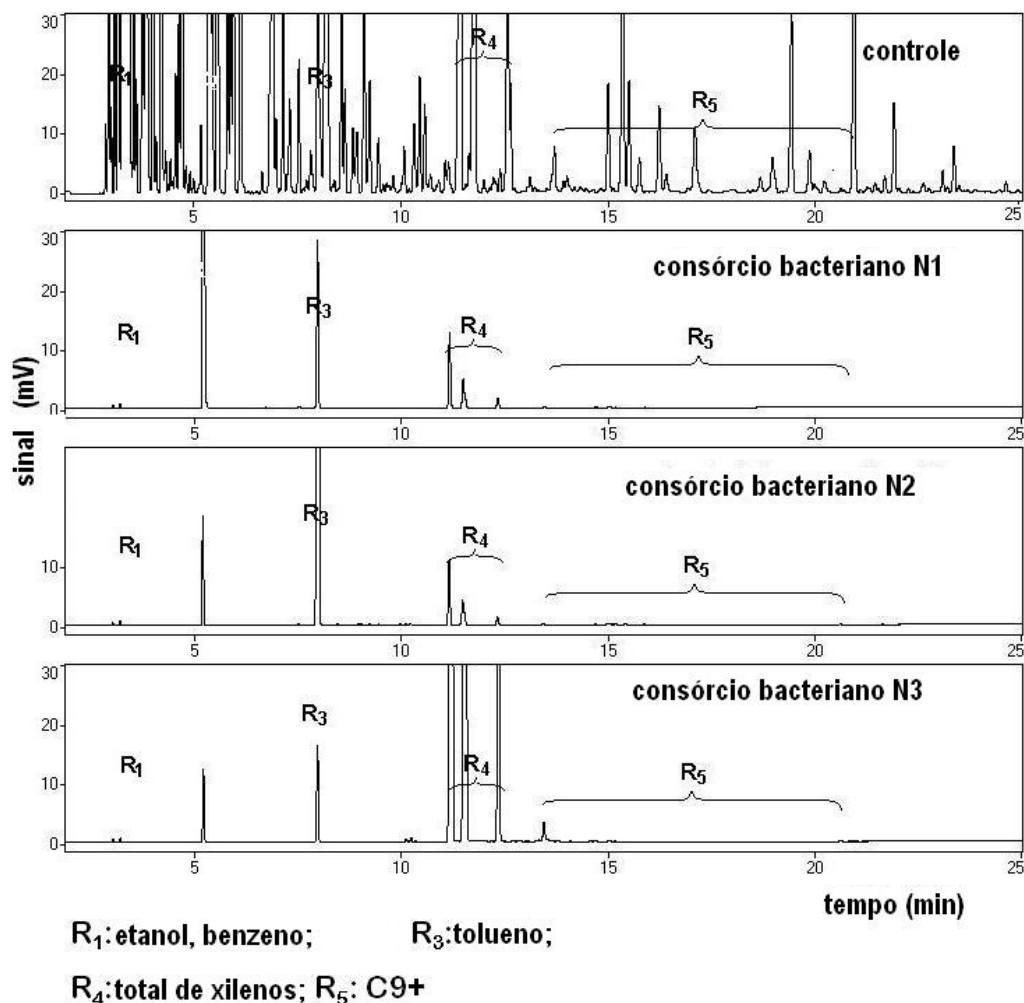


Figura 5. 9 Cromatogramas dos compostos etanol, BTX, C9 e TPH da gasolina comercial em relação ao controle (sem bactérias) de diferentes consórcios no meio mineral com 1% de gasolina comercial (24% de etanol), em 72 horas de incubação.

Os três consórcios avaliados degradaram a maioria dos compostos da gasolina comercial, em 72 horas. Na Tabela 5.5, nota-se a redução do etanol em praticamente 99%, em 72 horas, para todos os consórcios. A maioria dos compostos da gasolina (TPH) foi degradada na faixa de 95 a 98% pelos consórcios, em 72 horas de incubação. Também se observa maior redução dos compostos da gasolina nos consórcios em relação aos isolados, provavelmente devido a maior diversidade genética, fisiológica e morfológica destes no consórcio. O melhor desempenho de cada consórcio em relação aos isolados que o compõe demonstra a importância de se considerar o papel do co-metabolismo no tratamento de poluentes, onde cada espécie tem uma função específica nas sequências de reações enzimáticas responsáveis pela metabolização de cadeias complexas de hidrocarbonetos (Mariano, 2006a). O consórcio microbiano é dependente da interação resultante das espécies que podem facilitar mais a ação

metabólica complementar, somada pelos isolados na forma de consórcios, no processo de co-metabolismo, e assim podem aumentar a possibilidade de elevados valores de redução no ambiente (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 1999; MARCHAL *et al.*, 2003).

Os consórcios UFRGS N1, N2 e N3 foram formados pelos isolados conforme Tabela 5.4. Os isolados destes consórcios apresentaram espécies com diferentes morfologias e colorações, e exibiram competentes enzimas degradativas na presença de 1% de gasolina comercial (24% de etanol). Devido a isto foram observadas reduções de até 98% dos compostos da gasolina em estudo.

Além disso, nos consórcios (UFRGS N1, N2 e N3) notou-se uma preferência de degradação de compostos da gasolina comercial, visto que pelo menos um dos compostos não foi acentuadamente reduzido como os demais compostos avaliados. No consórcio UFRGS N1 verifica-se menor degradação do composto benzeno (35%), no consórcio UFRGS N2 uma redução relativa do composto tolueno (67%) e no consórcio UFRGS N3 reduções menores para os compostos xilenos (como 15% de meta-xileno, 27% de para-xileno e 45% de orto-xileno).

Isto pode ter ocorrido devido aos baixos teores de oxigênio do meio, ou devido à presença do etanol que pode ter gerado inibição parcial na degradação de pelo menos um dos compostos BTX. Segundo a literatura o etanol tem degradação preferencial pela microbiota do meio por ser hidrofílico (SILVA, 2002; MARIANO, 2006; SOARES, 2006), ter cadeia curta e pode ser facilmente degradado em ambas as condições, aeróbias e anaeróbias, por enzimas (dos ciclos metabólicos centrais presentes) (CHAPELLE, 1993; HUNT *et al.*, 1997a; HUNT *et al.*, 1997b; MADIGAN *et al.*, 1997). Porém, a degradação preferencial do etanol em relação aos BTX, neste estudo, não foi verificada.

5.4 CONCLUSÃO

O acompanhamento da atividade microbiana neste estudo mostrou maior liberação de CO₂ no solo da área 4 em relação a área 1, do *landfarming* que receberam gasolina comercial. Entretanto, o solo da área 1 do *landfarming* apresentou maior potencial de degradação dos compostos da gasolina comercial nas condições estudadas e, por isso, o mesmo foi utilizado para isolar os micro-organismos.

Dos sete isolados selecionados (UFRGS 2, 5, 6, 7, 14, 15, 17) a maioria apresentou, em parte, a degradação dos compostos da gasolina comercial e a produção de biossurfactantes. Além disso, os isolados UFRGS 5, 15 e 17 apresentaram biossurfactantes do tipo *ramnolipídeo*.

A maior degradação dos compostos da gasolina comercial ocorreu na forma de consórcio, com valores máximos de 95 a 98%, em 72 horas. Isto ressalta a importância de se considerar o papel do co-metabolismo no tratamento de poluentes nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, P.J.J.; Hunt, C.S. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. **Revista Latino Americana Microbiologia**, v.44, n.2, p. 83-104, 2002.
- Barker, J.F.; Hubbard, L.A.; Lemon, L.A. The influence of methanol and MTBE on the fate and persistence of monoaromatic hydrocarbons in groundwater. In *Proceedings of the petroleum hydrocarbons and organic chemical in groundwater: prevention, detection, and restoration*; **Natl. Water Well Association**: Dublin, Ohio, 1990.
- Beller, H.R.; Kane, S.R.; Legler T.C. Chapter 4: Effect of ethanol on hydrocarbon-degrading bacteria in the saturated zone: microbial ecology studies. In *Subsurface Fate and Transport of Gasoline Containing Ethanol*; Rice, D.W.; Depue, R.T., Eds.; University of California: Livermore, CA, 2001.
- Bento, F. M.; Camargo, F. A. O.; Okeke, B. C. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.
- Bento, F.M.; Gaylarde, C.C.; Camargo, F.A.O. Biosurfactantes. In **Microbiologia Ambiental**; Soares, I. M.; Azevedo, J. L., Eds.; Embrapa: Jaguariúna, SP, Brazil, 2008.
- Bodour, A. A.; Maier, R. M. Biosurfactants: types, screening methods and applications. In: **Encyclopedia of Environmental Microbiology**. Bitton, G., Ed.; John Wiley: N.Y., 2002; 750-770 p..
- Bognolo, G., Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloid Surface A*. 1999, 152, 41-52.
- Braddock, J. F.; Catterall, P. H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, v. 3, n. 2, p. 81-81, 1999.
- Bushnell, L. D.; Hass, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal Bacteriology**, v.41, p.653-673, 1941.

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

Chapelle, F.H. *Ground-Water Microbiology and Geochemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1993.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, CETESB, **Relação de áreas contaminadas**; São Paulo, SP, Brazil, 2008.

(http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp) (accessed Sept 2008).

Cordazzo, J. *Modelagem e Simulação Numérica do Derramamento de Gasolina Acrescida de Álcool em Águas Subterrâneas*. MSc Thesis, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil, 2000, 120p.

Deeb, R.A.; Alvarez-Cohen, L. Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortium and *Rhodococcus*. **Biotechnol Bioengineering**, v. 62, n.5, p. 526-36, 1999.

Devinny, J.; Chang, S.H. Bioaugmentation for soil bioremediation. In **Bioremediation of Contaminated Soils**; Wise, D.L.; Trontolo, D.J., Eds.; Marcel Dekker, New York, NY, 2000; 465-488.

Empresa Comercial de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análises de Solos**; Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 1999, 212 pp.

Fiechter, A.; Käppeli, O.; Koch, K.A.; Reiser, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal Bacteriology**, v. 173, p. 55-58, 1991

Guimarães, C.H.D. **Avaliação de Risco Ambiental de Sítios Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo**; MSc Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 2003, 315 pp.

- Hanson, K.G.; Desai, J.D.; Desai, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Technology**, v.7, n.10, p.745-748, 1993.
- Hunt, C.S.; Ferreira, D.S.; Corseuil, H.X.; Alvarez, P.J.J. Effect of ethanol on aerobic BTEX degradation. In *In situ and on-site bioremediation*, Alleman, B. C.; Leeson, A.L.; Eds.; Batelle Press: Columbus, OH; v. 4, n. 1, p. 49-54, 1997.
- Jean, J.-S.; Lee, M.-K.; Wang, S.-M.; Chattopadhyay, P.; Maity, J.P. Effects of inorganic nutrient levels on the biodegradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) by *Pseudomonas spp.* in a laboratory porous media sand aquifer model. **Bioresource Technology**, v. 99, n.16, p. 7807-7815, 2008.
- Jindrová, E.; Chocova, M.; Demnerová, K.; Brenner, V. Bacterial aerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene. **Folia Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 83-93., 2002.
- Junior, J. S.; Mariano, A. P.; Angelis, D. F. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **Afr. Journal Biotechnology**, v.8, n.12, p. 2774-2778, 2009.
- Karlson, U.; Willumsen, P.A. Screening of bacteria, isolated from PAH- contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v.7, p. 415-423, 1997.
- Koch, K.A. et al. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal Bacteriology**, v. 17, n.3, p. 4212-4219, 1991.
- Lawrence, A.; Jonsson S.; Borjesson, G. Ethanol, BTEX and microbial community interactions in E-blend contaminated soil slurry. *Int. Biodeterioration & Biodegradation*, v. 63, p. 654-666, 2009.
- Madigan, J.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. In **Brock Biology of Microorganisms**; 8th ed, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1997.
- Maier, R. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. **Advance Applied Microbiology**, v. 52, p.101-121, 2003.

- Marchal, R.; Penet, S.; Solano-Serena, F.; Vandecasteele, J. P. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. **Oil Gas Science Technology**, v.5, n. 4, p. 441-448, 2003.
- Mariano, A.P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. PhD Thesis, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brazil, 2006, 162 pp.
- Mariano, A.P.; Angelis, D.F.; Bonotto, D.M.; Piróllo, M.P.S.; Contiero, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. In XXII Interamerican Congress of Chemical Engineering, Buenos Aires, 2006.
- Oh, K.-T.; Kang, C.-M.; Kubo, M.; Chung, S.-Y. Culture condition of *Pseudomonas aeruginosa* F722 for biosurfactant production. **Biotechnol. Bioprocess Engineering** v. 1, n. 6, p. 471-476, 2006.
- Pinzon, N.M.; Ju, L.-K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 82, n.5, p. 975-981, 2009.
- Pinzon, N.M.; Ju, L.-K.; Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. **Biotechnology Letter.**, v. 31, n.10, p.1583-1588, 2009.
- Pirollo, 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 Applied Microbiology**, v.105, p.1484-1490, 2008.
- Rice, D. W.; Powers, S. E.; Alvarez, B. J. J. Potential scenarios for ethanol containing gasoline released into surface and subsurface waters. In *Health and Environmental Assessment of the Use of Ethanol of a fuel Oxygenated – Report to the California Environmental Policy Council in Response to Executive Order D-5-99*. v. 4, *Potential Ground and Surface Water Impacts*; Rice, D. W.; Cannon, G., Eds.; Lawrence Livermore National Laboratory: Livermore, CA UCRL-AR-135949 v. 4 Ch. 1.
- Richard, J.Y.; Vogel, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **Intern. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 4, n. 2-3, p. 93-100, 1999.

- Roy, S.; Hens, D.; Biswas, D.; Kumar, R. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 18, p. 575-581, 2002.
- Siegmund, I.; Wagner, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnology Technology**, v. 5, n. 4, p. 265-268, 1991.
- Silva, F.L.N.; Santos Jr., J.R.; Neto, J.M.M.; Silva, R.L.G.N.P. Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do Estado Piauí. **Revista Nova**, v. 32, n. 1, 56-60, 2009.
- Silva, R. L. B. **Contaminação de Poços Rasos no Bairro Brisamar, Ítaqui, RJ, por Derramamento de Gasolina: Concentração de BTEX e Avaliação da Qualidade da Água Consumida Pela População**. PhD Thesis, Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 2002, 182 p.
- Soares A. A. **Avaliação da Biorremediação de Água Subterrânea Contaminada com Gasolina: Experimentos em Microcosmos e em Campo**. MSc Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2006, 172p.
- Stotzky, G. Microbial respiration. In: **In Methods of soil analysis**; Black, C.A., Ed., American Society of Agronomy: Madison, WI, 1551-1572, 1965
- Trovão, R. S. **Análise ambiental de solos e águas subterrâneas contaminadas com gasolina: estudo de caso no município de Guarulhos**. MSc Thesis, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, SP, Brazil, 2006, 224 p.
- Tuleva, B. J.; Ivanov, G. R.; Christova, N. E. **Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain**. *Zeitschrift Naturforsch.* v. 57, p. 356-360, 2002
- Ulrich, G. **The fate and transport of ethanol-blended gasoline in the environment: a literature review and transport modeling** (online, PDF): submitted by Governors' Ethanol Coalition, Lincoln, Nebraska. 2009. ([http://www.ethanol - g ec.org/publicat.htm](http://www.ethanol-g ec.org/publicat.htm)).
- United States Environmental Protection Agency – USEPA – Method 5021, Solids Sample, Volatile organic compounds, Automated headspace, 1996.

United States Environmental Protection Agency – USEPA – Method 8015B, Nonhalogenated organics using CG/FID, 1996.

6 ESTUDO 2

Aplicação dos processos, em escala de laboratório, de atenuação natural, bioestimulação por nutrientes, com e sem bioaugmentação (consórcio bacteriano) em solo contaminado com 5% de gasolina comercial.

RESUMO

No Brasil existem inúmeros postos e tanques de armazenamento de combustível, que possuem um longo tempo de utilização com precárias condições de manutenção. Com isto vazamentos podem ocorrer e provocar graves problemas ambientais. O maior problema da contaminação refere-se aos compostos benzeno, tolueno e xilenos (BTX), componentes da gasolina que possuem propriedades cancerígenas e mutagênicas. A gasolina comercial no Brasil, além dos compostos BTX, contém 24% v v⁻¹ de etanol, um composto que aumenta a solubilidade destes na água.

Em geral locais contaminados com gasolina têm sido tratados por estratégias ou processos de biorremediação, que parecem ser bastante promissores na remediação de áreas contaminadas, além de serem ambientalmente corretos. No presente trabalho foram utilizados diferentes processos de biorremediação, atenuação natural, bioestimulação (nitrogênio e fósforo na relação C:N:P de 10:1:0,1, e pH corrigido para 7) e bioaugmentação com bioestimulação, em solos contaminados com 5% m m⁻¹ de gasolina comercial (24% de etanol), com o objetivo de avaliar os diferentes processos em relação à atividade microbiana. Para tal foram conduzidos dois experimentos independentes, denominados de sistema fechado A e sistema fechado B, constituídos de frascos de 1,5 L hermeticamente fechados contendo solo contaminado com 5% de gasolina comercial, com os três processos de biorremediação citados acima. O sistema fechado A foi utilizado para realização das análises respirométrica (liberação de CO₂) e biológicas, enquanto que o sistema fechado B foi utilizado para a verificação das concentrações dos compostos etanol, BTX, C₉+ (compostos com número de carbonos de 9 até 11) e TPH (hidrocarbonetos totais do petróleo) da gasolina comercial pelos diferentes processos de biorremediação, acima mencionados.

Pela atividade microbiana do sistema fechado A verificou-se que os tratamentos com gasolina comercial que mais liberaram CO₂ foram os processos de atenuação natural e

bioaugmentação com bioestimulação. Além disso, as análises biológicas de heterotróficos revelaram maior presença de micro-organismos também para esses processos, no período de 60 dias. Nos processos de biorremediação em solo com gasolina comercial no teste do sistema fechado B, verificou-se que a redução de todos os compostos avaliados foi em torno de 99% e, as concentrações dos compostos tolueno e xilenos apresentaram-se abaixo do valor de interdição ambiental (CETESB, 2005). Isto não ocorreu com o composto benzeno, pois o mesmo apresentou-se mais recalcitrante nas condições estudadas até o final dos ensaios (50 dias).

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Dois experimentos independentes, denominados de sistema fechado A e sistema fechado B (frascos de 1,5 L hermeticamente fechados), para os diferentes tratamentos foram realizados. O sistema fechado A foi utilizado para realização das análises respirométrica (liberação de CO₂) e biológicas, enquanto que o sistema fechado B foi utilizado para a verificação da concentração dos compostos etanol, BTX, C9+ (compostos com número de carbonos de 9 a 11) e TPH (hidrocarbonetos totais do petróleo) da gasolina comercial pelos diferentes processos de biorremediação.

Os tratamentos utilizados nos sistemas fechados A e B foram os seguintes: **a-** testemunho 1 (solo *in natura* com pH 5); **b-** testemunho 2 (solo *in natura* com adição de nitrogênio e fósforo na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7); **c-** atenuação natural (solo *in natura* com 5% de gasolina comercial); **d-** bioestimulação (solo *in natura* com adição de nitrogênio e fósforo na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7 com 5% de gasolina comercial); **e-** bioestimulação com bioaugmentação (solo *in natura* com adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7, e adição de inóculo 10⁶ UFC g⁻¹ do consórcio N1, com 5% de gasolina comercial). O consórcio denominado de N1 (composto de 4 isolados bacterianos), foi selecionado no estudo 1 e aplicado neste experimento. Este consórcio foi selecionado visto que o isolado 5 presente nos demais consórcios, obtidos no estudo 1, perdeu sua atividade microbiana durante os períodos de estocagem. O consórcio N1 foi adicionado ao solo *in natura* com inóculo de 10⁸ UFC g⁻¹, procedimento sugerido pela literatura (CUNHA *et al.*, 2000; PRANTERA *et al.* 2002; PALA *et al.* 2002), nos dois sistemas fechados, A e B.

O solo empregado foi na forma *in natura*, ou seja, sem nenhum tipo de contaminação. As amostras deste solo foram coletadas em uma área localizada na Companhia Petroquímica do Sul (COPEL, hoje BRASKEM). O solo empregado como amostra foi classificado como argiloso vermelho distrófico (segundo EMBRAPA, 1999). Este foi transportado e estocado (em sacos fechados), adequadamente e acondicionados em ambiente com temperatura de 4°C. Antes dos experimentos o mesmo foi seco a temperatura ambiente em bandejas, seguido de peneiramento em peneira de 6 mm (Sabaté *et al.*, 2004) e quarteamento. As análises dos solos foram efetuadas de acordo com TEDESCO *et al.* (1995), no Laboratório de Análises de Solo da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo 3).

Para elevar o pH a 6,5 do solo utilizou-se o valor do índice SMP conforme análise fornecida (Anexo 3), e assim foi adicionou-se 6 000 kg por ha⁻¹ de reagente comercial com proporção de 3:1 de CaCO₃ e MgCO₃, este reagente foi incubado ao solo úmido por 60 dias. Após foram adicionados os nutrientes na proporção de 4,6 g de P em 100 g de solo (na forma de KH₂PO₄) e 5 g de N para 100g de solo (na forma de NH₄NO₃), para atender a relação de C:N:P de 10:1:0,1.

Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

6.1.1 Sistema fechado A e B

Nos experimentos do sistema fechado A foram utilizados 100 g de solo *in natura*, com e sem adição de 5% de gasolina comercial. Neste sistema utilizaram-se diferentes tratamentos para verificar a atividade microbiana do solo, através das análises respirométrica e biológica. O sistema fechado A apresentou um tratamento a mais, denominado de branco (sem solo) para se medir a liberação de CO₂ do ambiente e comparar com os valores medidos nas amostras de solo. Nos testes respirométricos do sistema fechado A foram adicionados aos frascos, béqueres de 50 mL contendo 20 mL de solução de NaOH 0,4 mol L⁻¹, para sorção do CO₂ e posterior análise, sendo estes substituídos, após cada período de amostragem, por novas soluções de NaOH 0,4 mol L⁻¹. Após a montagem dos tratamentos do sistema fechado A, os mesmos foram incubados a temperatura ambiente, e as análises respirométrica e biológica foram realizadas nos períodos de 0, 1, 3, 5, 7, 10, 20, 41 e 60 dias.

No sistema fechado B utilizou-se menor massa de solo (50 g de solo *in natura*) e menor período de amostragem (máximo 50 dias), para os diferentes tratamentos em estudo. Portanto, para o sistema fechado B foram utilizados frascos de vidro de 1,5 L com 50 g de solo *in natura*, com e sem adição de 5% de gasolina comercial. No sistema B foi feita somente a análise química, pela técnica cromatográfica, das concentrações dos compostos da gasolina comercial (etanol, BTX, os compostos C9 a C11, denominados aqui de C9+, e hidrocarbonetos totais do petróleo, denominados TPH). A coleta de amostra para a análise química foi realizada nos períodos 0, 1, 5, 19 e 50 dias.

6.1.1.1 Análise respirométrica

A análise respirométrica foi realizada para medir a concentração de CO₂ liberado durante o período de ensaio das amostras de solo dos tratamentos, em sistema fechado, segundo o descrito no item **5.1.5** do estudo 1.

6.1.1.2 Análises biológicas: População de micro-organismos heterotróficos e bacterianos.

A) População de micro-organismos heterotróficos

Foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços para a determinação da estimativa do número mais provável (NMP) de micro-organismos heterotróficos totais do solo no sistema fechado A, com uso de caldo nutritivo (PALA et al., 2002; BENTO *et al.*, 2005). O caldo nutritivo foi composto de 3 g de extrato de carne e 5 g de peptona, diluídos em 1,0 L com água deionizada e o pH ajustado para 7. O meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C, por 20 min, bem como o material utilizado. As placas de poliestireno foram esterilizadas por uma hora em câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta.

Utilizou-se um grama de amostra de solo (de cada tratamento) misturada em 9 mL de água estéril num tubo de ensaio. Uma alíquota de 100 μL dessa amostra foi adicionada em 900 μL de água estéril nos poços da placa de diluição. Após, as diluições sucessivas das amostras, foram retirados 10 μL de cada diluição e adicionados a 200 μL de caldo nutritivo presente na placa de poliestireno. Para cada diluição cinco replicatas foram feitas.

Concluída a adição dos inóculos na placa de poliestireno, esta foi coberta com papel alumínio e colocada em estufa a 30°C, por 24 horas. Para a maioria dos experimentos, após 24 horas, foram visualizados os resultados positivos de heterotróficos, os quais indicam a tubidez do meio e este são estimados, segundo a tabela estatística empregada por BRADDOCK & CATTERALL, (1999). Com o tratamento estatístico se obteve o número mais provável (NMP) de micro-organismos heterotróficos existentes na amostra de solo de cada tratamento. Esta medida foi expressa em estimativa do valor médio em $\log \text{g}^{-1}$ do NPM de heterotróficos totais por grama de solo.

B) Estimativa da população bacteriana

Para contagem de população bacteriana utilizou-se a técnica de plaqueamento. Essa técnica emprega meio Agar nutritivo que consiste de 3,0 de g L^{-1} de extrato de carne, 5,0 g L^{-1} de peptona e 15 de g L^{-1} de Agar, em pH ajustado para 7. Este meio foi esterilizado em autoclave a 120°C, por 20 min, assim como todo o material utilizado.

Um grama de amostra de solo (de cada tratamento estudado) foi adicionado a 9 mL de solução salina 0,85% m v^{-1} , num tubo de ensaio. Após, uma alíquota de 100 μL de amostra foi adicionada a 900 μL de solução salina 0,85% contidos nos poços da placa de diluição. A seguir foram inoculadas, em triplicata, 10 μL da amostra diluída na placa de Petri com o meio Agar nutritivo. Concluída a adição dos inóculos na placa, esta foi colocada em estufa a 30°C, por 24 h. Após este período foi realizada a contagem do número da unidade formadora de colônias (UFC) de bactérias das amostras de solo de cada tratamento. Esta medida foi expressa pela estimativa do valor médio em $\log \text{ml}^{-1}$ de UFC de bactérias por grama de solo.

6.1.1.2 Análise cromatográfica

As concentrações dos compostos etanol, BTX, C9+ e TPH da gasolina comercial no solo, nos diferentes processos de biorremediação estudados, no sistema fechado B, foram medidas por meio da técnica de cromatografia a gás, segundo procedimento descrito no item **5.1.12** do estudo 1 e detalhada no Anexo 1.

6.1.1.3 Análises de teor de umidade e de determinação do pH

A análise do teor de umidade foi realizada somente no testemunho 1, enquanto que a determinação do valor de pH foi realizada em todas as amostras.

Para determinar o teor de umidade do solo foram pesadas aproximadamente 50 g de solo do testemunho 1 em cápsula de inox, previamente pesada em balança analítica. Em seguida a cápsula com solo foi colocada em forno mufla a 105 °C, por 2 horas (TEDESCO *et al.*, 1995). A cápsula retirada da estufa foi esfriando por 10 a 15 min, em dessecador, antes de ser pesada novamente. O teor de umidade em percentual (% $m m^{-1}$) foi calculado pela diferença de massa de solo úmido e do seco dividido pela massa de solo úmido vezes 100.

A determinação do pH do solo de cada tratamento foi realizada em água (com relação de solo: água 1:1, $v v^{-1}$), com um total de 10 mL. A leitura do pH foi realizada em peagâmetro com eletrodo de membrana de vidro, previamente calibrada, segundo metodologia de TEDESCO *et al.*, 1995.

6.1.4 Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicatas e os resultados das análises respirométricas e cromatográficas foram analisados estatisticamente pelas comparações das médias e variância pelo teste de *Tukey*, com diferenças significativas de $p < 0,05$.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.2.1. Análise Respirométrica

Os resultados das medidas das concentrações de CO₂ produzidos pelos micro-organismos do solo, de cada tratamento no sistema fechado A, em função do tempo estão mostrados na Figura 6.1.

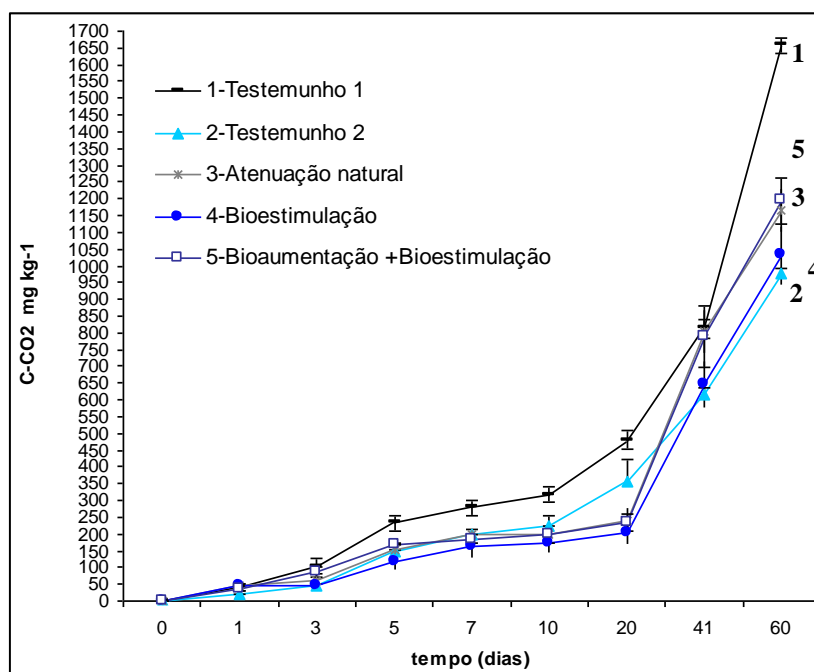


Figura 6. 1 Concentração de CO₂ liberada pelos micro-organismos do solo nos seguintes tratamentos: 1- testemunho 1 (solo *in natura* e pH 5); 2- testemunho 2 (solo *in natura*, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7); 3- atenuação natural (solo *in natura*, com 5% de gasolina comercial); 4- bioestimulação (solo *in natura* com 5% de gasolina comercial, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7); 5- bioestimulação com bioaumentação (solo *in natura* com 5% de gasolina comercial, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7 e adição de inóculo 10⁶ UFC g⁻¹ do consórcio N1), em função do tempo.

Pela Figura 6.1 verifica-se que os tratamentos que apresentaram maior liberação de CO₂ no solo, no tempo estudado (60 dias), foram o testemunho 1 (1.520,36 mg kg⁻¹), a bioaumentação com bioestimulação (1.152,26 mg kg⁻¹) e a atenuação natural (1.116,90 mg kg⁻¹) quando comparados com os processos de bioestimulação (1031,35 mg kg⁻¹) e o testemunho 2 (975,00 mg kg⁻¹). O fato de o testemunho 1 ter liberado uma concentração maior de CO₂ em relação ao testemunho 2, pode indicar que os nutrientes da relação C:N:P

adicionados podem ter inibido a atividade microbiana do solo, ao invés de aumentar a mesma, nas condições estudadas.

Segundo alguns autores (Mohammed *et al.*, 2000; Pala *et al.*, 2002; Sabaté *et al.*, 2004, Spinelli, 2005; Bento *et al.*, 2005), a relação de carbono, nitrogênio e fósforo (C:N:P) mais utilizada é de 100:10:1 ou de 10:1:0,1. Muitos desses autores, ao empregarem estas relações de C:N:P, não obtiveram as melhores degradações do contaminante estudado, mesmo com bioventilação (PALA *et al.*, 2002; SABATÉ *et al.*, 2004). No presente trabalho foi aplicada a relação de C:N:P de 10:1:0,1 e se observou que os nutrientes utilizados também não aceleraram a degradação da gasolina (contaminante), nas condições estudadas, confirmando os dados da literatura (PALA *et al.*, 2002; SABATÉ *et al.*, 2004; MADIGAN *et al.*, 2004; SHEWFELT *et al.*, 2005).

No presente trabalho, nos tratamentos com gasolina comercial, verificou-se que os processos de atenuação natural e bioaumentação com bioestimulação apresentaram concentrações semelhantes na liberação de CO₂ a partir de 41 dias. Isto indica que os processos de bioaumentação com bioestimulação, mesmo com a adição de nutrientes, não apresentaram total inibição à atividade microbiana dos micro-organismos do solo *in natura* e do consórcio inoculado. Tal comportamento se verifica pela maior liberação de CO₂ (figura 6.1) no processo de bioaumentação com bioestimulação em relação aos processos de bioestimulação e testemunho 2, nos períodos de 41 até 60 dias.

No presente estudo, os valores das concentrações de CO₂ indicam que a concentração de nutrientes utilizados podem ter inibido a microbiota do solo em cada tratamento que utilizou esta relação de nutrientes (testemunho 2, bioestimulação e bioaumentação com bioestimulação) em relação aos que não utilizaram (testemunho 1 e atenuação natural), nas condições estudadas. Entretanto, conforme Baker & Moore (2000), mesmo sendo dispendiosa a aplicação de nutriente no meio contaminado, os nutrientes podem gerar elevadas taxas de degradação, dependendo da forma como o nitrogênio foi adicionado. O nitrogênio tem sido utilizado nas formas de uréia (MIELLICK, 1991), cloreto de amônio (MOHAMMED *et al.*, 2000; SHEWFELT *et al.*, 2005), nitrato de amônio (CUNHA *et al.*, 1996, 1997, 2000; PALA *et al.*, 2002; SABATÉ *et al.*, 2004; SPINELLI, 2005; SHEWFELT *et al.*, 2005), e sulfato de amônio (BENTO *et al.*, 2005). Geralmente, o nitrogênio amoniacal (íon amônio, NH₄⁺) é preferido no metabolismo microbiano, pois este íon requer menor energia dos micro-organismos para ser assimilado (JÔNIO *et al.*, 2000; SHEWFELT *et al.*, 2005). Como neste trabalho, o nitrogênio disponibilizado como nutriente foi na forma de nitrato de amônio, o nitrato pode ter inibido ou influenciado a degradação dos compostos da gasolina pelos micro-

organismos, nas condições estudadas, concordando com SHEWFELT *et al.* (2005). Segundo estes autores, a taxa de degradação foi relativamente baixa com o uso de nitrato. Isto se deve à baixa eficiência microbiana em metabolizar o nitrato. Entretanto, estes mesmos autores verificaram que a forma amoniacal (íon amônio, NH_4^+) como única fonte de nitrogênio, na relação de C:N 10:1, apresentou melhor degradação da gasolina no solo, nas condições estudadas.

6.2.2 Análises Biológicas: Heterotróficos

A Figura 6.2 mostra os resultados da estimativa da população NMP de heterotróficos totais existentes nas amostras de solos, de cada tratamento no sistema fechado A, em função do tempo de ensaio (60 dias).

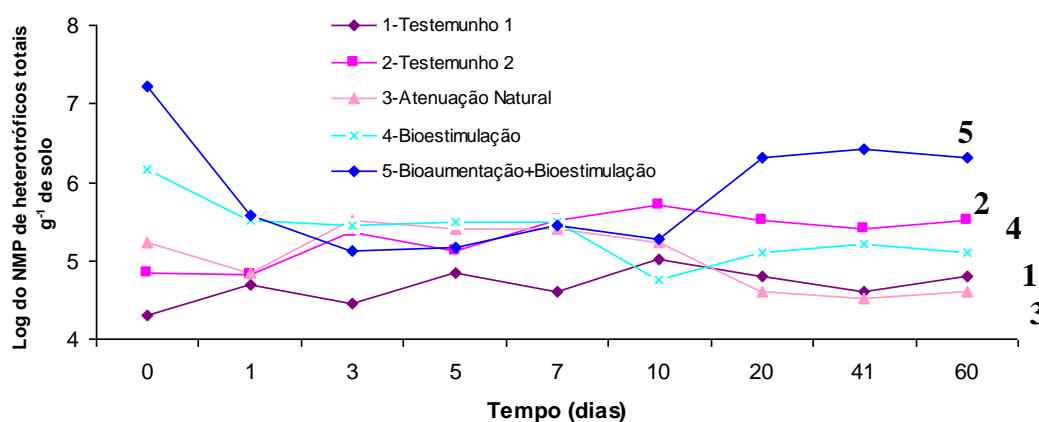


Figura 6.2 Logaritmo do Número Mais Provável (NMP) de heterotróficos totais do solo estudado nos seguintes tratamentos: 1- testemunho 1 (solo *in natura* com pH 5); 2- testemunho 2 (solo *in natura* com adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1 e pH corrigido para 7); 3- atenuação natural (solo *in natura* com 5% de gasolina comercial); 4- bioestimulação (solo *in natura* com 5% de gasolina comercial, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1 e pH corrigido para 7); 5- bioestimulação com bioaugmentação (solo *in natura* com 5% de gasolina comercial, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7 e adição de inóculo 10^6 UFC g^{-1} do consórcio N1), em função do tempo.

Pela Figura 6.2 observa-se que no tempo de ensaio de até um dia houve diminuição da NMP de heterotróficos totais, exceto nos testemunhos 1 e 2. A maior redução de micro-organismos observada foi no processo de bioaugmentação com bioestimulação. Já a partir de um dia de ensaio até 10 dias, os valores medidos da população de heterotróficos totais foram

relativamente constantes, com pequenas variações, em todos os ensaios. Porém, de 10 a 20 dias os tratamentos de bioaugmentação com bioestimulação e de atenuação natural mostraram um comportamento diferente dos demais tratamentos, onde no primeiro aumentou e no segundo diminuiu a estimativa do NMP de heterotróficos totais.

Nos tempos de 20 a 60 dias, os valores da estimativa do NMP de heterotróficos totais apresentaram poucas variações entre os tratamentos estudados. Isto ocorreu, provavelmente, devido aos baixos teores de oxigênio gerados no sistema fechado, devido aos períodos mais longos entre uma coleta e outra. Além disso, o testemunho 2 (com nutrientes no solo) apresentou baixos valores de NMP de heterotróficos totais (4,8 log), no tempo zero. Entretanto, o valor do NMP de heterotróficos totais aumentou para 5,8 log g⁻¹, em 10 dias de ensaio. A partir desse tempo (10 dias), até o final do ensaio o valor do NMP de heterotróficos totais diminuiu a aproximadamente, 1 log g⁻¹.

A variação observada nos valores do NMP de heterotróficos totais medidos (Figura 6.2) pode ser indicativo de mudança na biodiversidade da microbiota com a predominância de organismos hidrocarbonoclasticos (BENTO et al., 2005). Segundo Mariano (2006), a biomassa microbiana total ativa, pode diferir na composição de espécies e em regimes metabólicos. Isto pode também ter contribuído na variação dos valores do NMP de heterotróficos totais medidos (Figura 6.3). Pelas Figuras 6.2 e 6.3 nota-se que a gasolina comercial e/ou nutrientes, podem ter gerado a diminuição da microbiota (nativa ou com inóculo) do solo, já em 1 dia de ensaio. Isto é mostrado pela medida do NPM de heterotróficos totais (Figura 6.2), principalmente, nos tratamentos de bioaugmentação com bioestimulação e bioestimulação. As concentrações de CO₂ (Figura 6.2) medidas, nos tratamentos aqui estudados, aumentaram significativamente a partir de 20 dias de ensaio, sendo que no final do mesmo, todos os tratamentos apresentaram concentrações de CO₂ maiores que 900 mg kg⁻¹ de solo. Observa-se também, nestas mesmas figuras, que no período de 41 até 60 dias, as concentrações de CO₂ para os tratamentos de bioestimulação de bioestimulação (644,47 mg kg⁻¹ de solo em 41d e de 1.100,53 mg kg⁻¹ de solo em 60 d), e o testemunho 2 (534,77 mg kg⁻¹ de solo em 41d e de 853,01mg kg⁻¹ de solo em 60 d) os valores desses se aproximaram, parcialmente das concentrações do testemunho 1, no mesmo período de experimento. Como neste trabalho, o nitrogênio disponibilizado como nutriente foi na forma de nitrato de amônio, o nitrato pode ter inibido ou influenciado a degradação dos compostos da gasolina pelos micro-organismos, nas condições estudadas, principalmente no testemunho 2 e no processo de bioestimulação, concordando com SHEWFELT *et al.* (2005).

Já pela medida do NPM de heterotróficos totais verificou-se que para o mesmo período os valores medidos desses foram, praticamente, constantes nos tratamentos estudados. Também se pode observar que, a partir do período de 10 dias, até o de 20 dias houve diminuição da medida do NPM de heterotróficos totais nos tratamentos de atenuação natural ($1 \log g^{-1}$), do testemunho 1 ($0,5 \log g^{-1}$) e testemunho 2 ($0,5 \log g^{-1}$), e aumento nos tratamentos de bioestimulação ($0,5 \log g^{-1}$) e de bioaumentação com bioestimulação ($1 \log g^{-1}$).

Além disso, nota-se que o testemunho 1 foi o tratamento que mais liberou CO_2 (Figura 6.1) e que manteve um comportamento praticamente igual em relação ao valor medido do NPM de heterotróficos totais, durante todo o experimento. Os demais tratamentos apresentaram aumento da liberação de CO_2 com o aumento do tempo tendendo a se aproximar dos valores do testemunho 1. Houve mais variações dos valores das medidas do NPM de heterotróficos totais durante alguns períodos tais como: de 0 a 1 dia e de 7 a 20 dias. Também, nota-se no período de 7 a 20 dias, diminuição das medidas do NPM de heterotróficos totais na maioria dos processos, exceto nos processos de bioestimulação com e sem bioaumentação que continham gasolina comercial.

A redução de micro-organismos mostrada nestes tratamentos, provavelmente, ocorreu devido aos baixos teores de oxigênio no sistema fechado A nos períodos em que o experimento ficou por mais tempo fechado. Isto pode ter gerado um ambiente anaeróbio, que pode ter influenciado a degradação dos compostos pelos micro-organismos nestes períodos, conforme pode ser observado mais adiante no item 6.2.4.

6.2.3 Estimativa da População Bacteriana total

A Figura 6.3 mostra os resultados da estimativa da população média, através do logaritmo da unidade formadora de colônias (UFC) de bactérias totais nas amostras de solos dos tratamentos em função do tempo de experimento (60 dias).

Pela Figura 6.3 observa-se que os valores de UFC de bactérias medidos aumentaram até o primeiro dia de ensaio, exceto para os tratamentos 2 (testemunho com adição de C, N e P) e 4 (bioestimulação), os quais permaneceram praticamente constantes. A partir deste tempo

de ensaio, até o tempo final verificou-se uma variação, nos valores medidos de 4,5 a 6,5 \log^{-1} nos ensaios.

Nota-se ainda que, entre 5 a 10 dias de ensaio, o testemunho 2 e o tratamento 5 (bioestimulação com bioaugmentação) apresentaram aumento de 1 $\log g^{-1}$ de UFC de bactérias. A partir de 10 até 41 dias, percebe-se diminuição de 1 $\log g^{-1}$ de bactérias nestes mesmos tratamentos. Tal comportamento pode ser atribuído a pouca oxigenação do sistema fechado.

Nos períodos de 41 a 60 dias, por meio das medidas de UFC de bactérias, verificou-se que os valores medidos foram praticamente constantes nos tratamentos estudados e aproximaram-se das medidas de UFC de bactérias do testemunho 1.

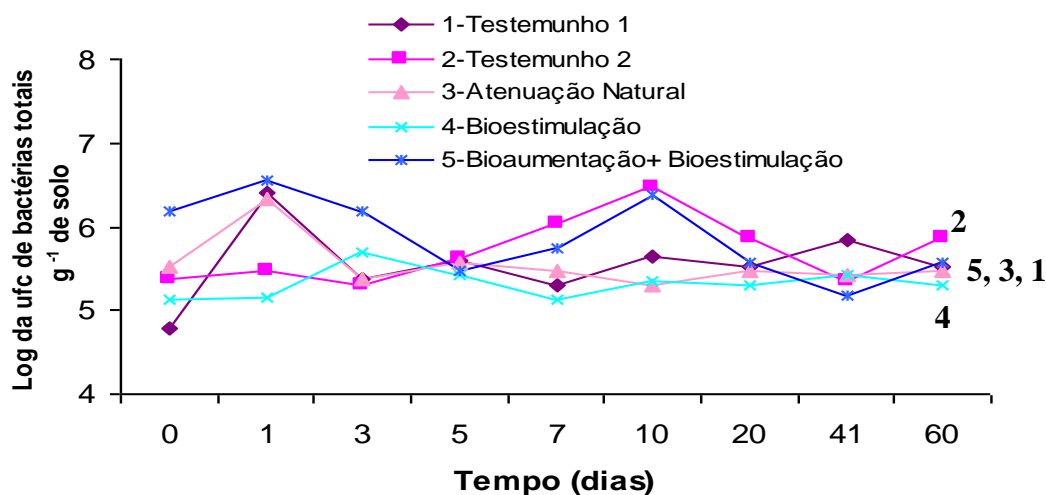


Figura 6. 3 Estimativa média do logaritmo da unidade formadora de colônias (UFC) de bactérias totais do solo estudado nos seguintes tratamentos: 1- testemunho 1 (solo *in natura* com pH 5); 2- testemunho 2 (solo *in natura* com adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1 e pH corrigido para 7); 3- atenuação natural (solo *in natura* com 5% de gasolina comercial); 4- bioestimulação (solo *in natura* com 5% de gasolina comercial, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1 e pH corrigido para 7); 5- bioestimulação com bioaugmentação (solo *in natura* com 5% de gasolina comercial, adição de N e P na relação C:N:P de 10:1:0,1, pH corrigido para 7 e adição de inóculo 10^6 UFC g^{-1} do consórcio N1), em função do tempo.

6.2.4 Análises cromatográficas

As Figuras 6.4 e 6.5 mostram os resultados das medidas das concentrações dos compostos etanol (Figura 6.5) e TPH (Figura 6.5), da gasolina comercial, em relação aos processos de biorremediação do solo, no sistema fechado B, em função do tempo de estudo.

Pelo gráfico mostrado na Figura 6.4 observou-se que as concentrações do composto etanol da gasolina comercial em solo nos processos estudados reduziram em tornos de 67,6 a 74,0%, em 1 dia de experimento, de 69,5 a 75,0% ,em 5 dias de experimento e de 94,0 a 95,6% aos 19 dias de experimento. Aos 50 dias, verifica-se que o composto etanol da gasolina comercial, em todos os processos avaliados, apresentou redução de até 99%, não apresentando diferenças significativas entre os demais processos.

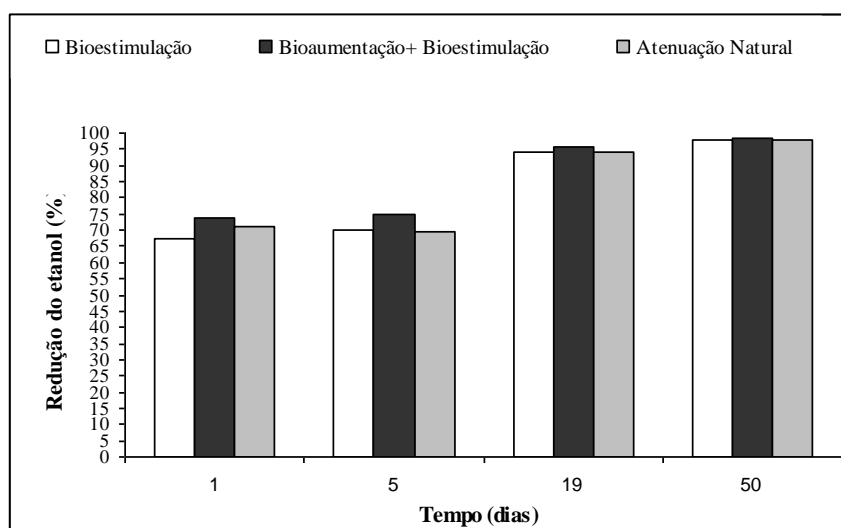


Figura 6. 4 Percentuais de Redução (%) do composto etanol em solo em relação aos tratamentos (bioestimulação, bioaugmentação com bioestimulação e atenuação natural) com gasolina comercial, em função do tempo.

Nota-se pela figura 6.4 que houve, em 5 dias de experimento a maior redução do composto etanol, uma vez que mais da metade foi reduzido. A partir daí, houve um decréscimo na taxa de redução, uma vez que aos cinquenta dias, ainda havia etanol presente nas amostras. Este decréscimo da taxa de redução do composto etanol, pode ter sido causado por vários fatores, como os nutrientes nos tratamentos que foram adicionados nitrogênio e fósforo e, principalmente, em todos os tratamentos podem ter ocorrido condições anaeróbias, a partir de 19 dias, devidos aos baixos teores de oxigênio, que podem ter sido gerados no sistema fechado.

O etanol pode influenciar na degradação dos compostos da gasolina pelos micro-organismos, visto ser este preferencialmente degradado em relação aos compostos BTX.

Segundo a literatura (SILVA, 2002; MARIANO, 2006; SOARES, 2006) a degradação preferencial do etanol pela microbiota do meio ocorre por ele ser hidrofílico, e por apresentar enzimas degradadoras mais facilmente que os hidrocarbonetos (RICE, 2000) e, também, por estar presente na maioria das rotas metabólica do ambiente (ALVAREZ *et al.*, 2002). As enzimas geradas na microbiota do solo que podem degradar os compostos BTX, demandam um maior tempo de contato com o contaminante para serem formadas (DEEB *et al.*, 2002) ao contrário do etanol. Além disso, o etanol pode influenciar na degradação dos hidrocarbonetos da gasolina, devido ao efeito de co-solvência (CORDAZZO, 2000; ALVEZ, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2004; SOARES, 2006) em solo e em água. E pode também desfavorecer ou favorecer a biodegradação dos hidrocarbonetos da gasolina. A biodegradação dos hidrocarbonetos da gasolina pode ter sido desfavorecida devido ao consumo preferencial do oxigênio do meio pelo etanol (CORDAZZO, 2000; CORSEUIL *et al.*, 2009) ou poderia ser favorecida devido a maior solubilidade destes compostos na presença de etanol (SOARES, 2006; MORAES, 2008) e, assim, tornando-os mais biodisponíveis a microbiota do meio.

Segundo Beller *et al.* (2001), o etanol pode ser degradado preferencialmente em relação aos BTEX. A degradação preferencial do etanol pode ser favorecida pelos aceptores de elétrons tais como, o oxigênio e o nitrato e, também pelos nutrientes essenciais disponíveis no meio. Esses fatores podem limitar o crescimento microbiano de bactérias capazes de degradar os BTEX, conseqüentemente, diminuir a taxa de degradação dos BTEX. Esses autores se contradizem quando afirmam que o etanol como contaminante do meio pode também aumentar a população microbiana que podem degradar os BTEX, e com isso auxilia na degradação destes.

Pela Figura 6.5 observa-se que a redução dos compostos TPH da gasolina comercial em solo nos tratamentos com bioestimulação, bioaugmentação com bioestimulação, e atenuação natural foram semelhantes nos períodos de 5, 19 e 50 dias de experimento. As concentrações dos compostos TPH da gasolina comercial, no solo dos processos estudados, reduziram em torno de 45,6 a 63,1%, em 1 dia, de 87,6 a 89,4%, em 5 dias, de 97,6 a 98,1%, em 19 dias de ensaio em 99%, para todos os processos avaliados. Aos 50 dias, as concentrações do TPH não apresentaram diferenças significativas entre os processos estudados.

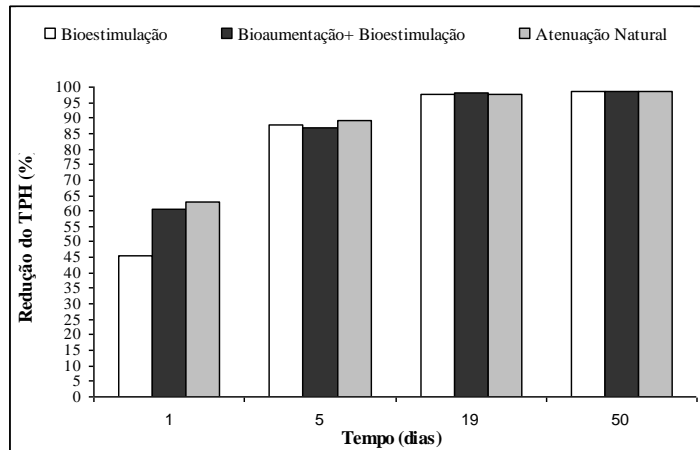


Figura 6.5 Percentuais de Redução (%) dos compostos TPH em solo em relação aos tratamentos (bioestimulação, bioaugmentação com bioestimulação, e atenuação natural) com gasolina comercial, em função do tempo.

Pela figura 6.5 se verifica que, já no primeiro dia de experimento, houve redução na concentração dos compostos TPH em torno de 50%, exceto no processo de bioestimulação. Além disso, observa-se que com o avanço do tempo do experimento, a redução foi menor, principalmente, a partir do quinto dia, até o final do experimento (50 dias). A menor redução da concentração dos compostos TPH, a partir do quinto dia de experimento, podem ter ocorrido devido aos mesmos fatores citados acima para o composto etanol.

O sucesso da biodegradação aeróbia depende do teor de oxigênio do meio, do nível metabólico, da adaptação genética da população microbiana ao meio e também do contaminante empregado (CHANG & DEVINNY, 2000). No trabalho aqui realizado, a taxa de redução dos compostos TPH foi muito elevada (99%), a partir de 19 dias de experimento, conforme mostra a Figura 6.5. Para Rahman *et al.* (2002), que utilizou 0,1 e 1% de uma mistura de materiais (como: solo de dez diferentes áreas contaminadas com gasolina + biossurfactante + consórcio + resíduos), a medida da degradação dos compostos TPH da gasolina em seus experimentos, durante 60 dias, foi de 67 e 78% com 0,1 e 1% de uma mistura de materiais, respectivamente. No presente trabalho, não foi utilizado biossurfactante, conhecido acelerador da biodegradação, e apresentou redução dos compostos TPH com valor 22% a mais, do que as obtidas no trabalho citado (RAHMAN *et al.*, 2002), com tempo de ensaio menor (50 dias). Nos testes de Cunha *et al.* (2004), realizados em blocos cúbicos (30 cm² de área) de solo contaminado com gasolina comercial (25,5 v m⁻¹ ou 10 L para 39,15 kg⁻¹ de solo), contendo 22% de etanol, a redução dos compostos TPH, nos processos de atenuação

natural e bioventilação foram de 74 e 98%, respectivamente, em 60 dias de ensaio. Neste trabalho a redução dos compostos TPH da gasolina comercial com 24% de etanol foi semelhante (99%) à obtida nos testes de CUNHA *et al.* (2004), no processo de bioventilação, mesmo o sistema sendo diferente, fechado e com concentração de contaminante do solo de 5% (m m^{-1}).

O consórcio N1, presente no processo de bioaumentação com bioestimulação deste estudo não apresentou redução significativa dos compostos da gasolina comercial pela adição do inóculo e com adição de nutrientes, como o esperado, em relação aos demais processos sem inóculo e sem nutrientes. Isto provavelmente ocorreu devido a falta de oxigênio e/ou devido a competitividade da microbiota nativa do solo. Conforme Jacques *et al.* (2005), tal comportamento, provavelmente, ocorreu pela competitividade da microbiota nativa do solo e também devido, provavelmente a inibição dos nutrientes à micorbiota nativa e inoculada, na forma de de consórcios.

A formação de consórcios pela simples mistura de micro-organismos isolados do solo, pode não resultar na soma de capacidade degradativa, devido à possibilidade de ocorrer relações antagônicas e sobreposição de nicho ecológico na degradação dos hidrocarbonetos no solo (JACQUES *et al.*, 2005). Outros fatores que podem ter influenciado nos resultados apresentados pelo consórcio N1 são: concentração e formas dos nutrientes, baixo teor de oxigênio e a concentração de etanol (24%), presente na gasolina comercial.

Comparando-se a redução do composto etanol (Figura 6.4) com a dos compostos TPH das (Figura 6.5) no solo, nos diferentes processos estudados, verifica-se que, no primeiro dia de ensaio, houve uma menor redução dos compostos TPH (até 60%) em relação ao composto etanol, que foi de até 70%. A maior redução do composto etanol em relação aos TPH se explica, segundo a literatura (ULRICH, 1999; BELLER *et al.*, 2001; SILVA, 2002; MARIANO, 2006; SOARES, 2006), pela degradação preferencial do etanol e pelo fato do mesmo ser hidrofílico (ULRICH, 1999; BELLER *et al.*, 2001; SILVA, 2002; MARIANO, 2006; SOARES, 2006). Isto provavelmente não ocorreu com os hidrocarbonetos porque estes são hidrofóbicos (CORSEUIL *et al.*, 1998; RICE, 2000; POWERS *et al.*, 2001; ALVAREZ & HUNT, 2002).

Nas medidas mostradas pelos gráficos das figuras 6.4 e 6.5, verifica-se que, no quinto dia de ensaio, não se percebe diferença na redução do etanol em relação ao início do ensaio (1 dia). Os compostos TPH mostraram um aumento da redução neste mesmo período. Isto ocorreu, provavelmente, devido ao efeito de co-solvência que o etanol gera por estar presente na gasolina comercial. Devido a isto pode ter havido o favorecimento da solubilidade dos

hidrocarbonetos no solo tornando-os mais biodisponíveis a microbiota do solo, concordando com dados da literatura (BELLER *et al.*, 2001).

As Tabelas 6.1 a 6.5 apresentam os resultados das concentrações dos compostos BTX e C9+ da gasolina comercial, em relação aos processos de biorremediação do solo, em função do tempo de estudo.

Os compostos benzeno, tolueno e xilenos (BTX) apresentaram o mesmo comportamento mostrado pelos compostos TPH, para o mesmo período de ensaio, de 1 a 5 dias (Tabelas 6.1 a 6.3). Porém, a partir de 19 até 50 dias de ensaio, observa-se que todos os compostos da gasolina comercial (etanol, BTX, C9+ e TPH) apresentaram uma redução semelhante nas suas concentrações. Provavelmente, isto ocorreu devido ao baixo teor de oxigênio presentes no sistema fechado neste período de ensaio, que podem ter gerado condições anaeróbias.

Tabela 6. 1 Concentrações do benzeno no solo pelos processos de biorremediação em função do tempo de ensaio

Processos/ <i>Tempo</i> (dias)	BENZENO		
	Concentração média no solo (% de redução do benzeno em relação ao tempo zero)		
	Atenuação natural	Bioaugmentação com bioestimulação	Bioestimulação
0	411 ± 13 mg.kg ⁻¹	377± 19 mg.kg ⁻¹	384± 13 mg.kg ⁻¹
1	161 ± 2 mg.kg ⁻¹ (60,8%)	174±3 mg.kg ⁻¹ (53,8%)	211±29 mg.kg ⁻¹ (45,0%)
5	42 ± 8 mg.kg ⁻¹ (89,8%)	53±18 mg.kg ⁻¹ (85,9%)	46±14 mg.kg ⁻¹ (88,0%)
19	10 ± 0 mg.kg ⁻¹ (99,4%)	6±2 mg.kg ⁻¹ (98,4%)	7±0 mg.kg ⁻¹ (98,2%)
50	4 ± 1 mg.kg ⁻¹ (99,7%)	5±2 mg.kg ⁻¹ (99,0%)	4±1 mg.kg ⁻¹ (99,0%)

OBS: percentual (%) de redução do composto benzeno no tratamento estudado em cada tempo em relação ao tempo zero.

A **Tabela 6.1** mostra a concentração média de benzeno da gasolina comercial no solo, para um tempo de ensaio de até 50 dias. Analisando-se a concentração de benzeno nos

processos estudados verifica-se uma maior biodegradação no primeiro dia ensaio, nos processos de atenuação natural (benzeno: $161 \pm 2 \text{ mg.kg}^{-1}$) e de bioaugmentação com bioestimulação (benzeno: $174 \pm 3 \text{ mg.kg}^{-1}$), do que no processo de Bioestimulação (benzeno: $211 \pm 29 \text{ mg.kg}^{-1}$). A partir do quinto dia até o final do ensaio (50 dias), não se verificam diferenças significativas nas concentrações do benzeno, entre os processos estudados, pois a mesma situou-se na faixa de redução de 85 a 99%, conforme dados estatísticos. Apesar da significativa redução do benzeno mostrada na Tabela 6.1, as concentrações medidas não atendem a legislação ambiental que é de $0,08 \text{ mg.kg}^{-1}$ para área residencial, e $0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$ para área industrial (CETESB, 2005). Isto indica que o mesmo pode ser um composto recalcitrante (TROVÃO, 2006) e, esse resultado é alarmante nas condições estudadas, pois o benzeno é o mais tóxico dos compostos BTX.

Tabela 6. 2 Concentrações do tolueno no solo pelos processos de biorremediação em função do tempo de ensaio

Processos / Tempo (dias)	TOLUENO		
	Concentração média no solo e % de redução em relação ao tempo zero		
	Atenuação natural	Bioaugmentação com bioestimulação	Bioestimulação
0	$1292 \pm 53 \text{ mg.kg}^{-1}$	$1220 \pm 4 \text{ mg.kg}^{-1}$	$1206 \pm 40 \text{ mg.kg}^{-1}$
1	$452 \pm 7 \text{ mg.kg}^{-1}$ (65,0%)	$482 \pm 11 \text{ mg.kg}^{-1}$ (60,0%)	$541 \pm 75 \text{ mg.kg}^{-1}$ (52,7%)
5	$149 \pm 37 \text{ mg.kg}^{-1}$ (88,5%)	$171 \pm 40 \text{ mg.kg}^{-1}$ (86,0%)	$150 \pm 24 \text{ mg.kg}^{-1}$ (87,6%)
19	$23 \pm 1 \text{ mg.kg}^{-1}$ (98,2%)	$11 \pm 4 \text{ mg.kg}^{-1}$ (99,1%)	$12 \pm 1 \text{ mg.kg}^{-1}$ (99,4%)
50	$6 \pm 2 \text{ mg.kg}^{-1}$ (99,5%)	$8 \pm 1 \text{ mg.kg}^{-1}$ (99,3%)	$7 \pm 1 \text{ mg.kg}^{-1}$ (99,7%)

OBS: percentual (%) de redução do **composto tolueno** em relação ao tempo zero de ensaio.

A **Tabela 6.2** exibe a concentração média de tolueno da gasolina comercial no solo nos processos de atenuação natural, bioaugmentação com bioestimulação e bioestimulação, para um tempo de ensaio de até 50 dias. Avaliando-se a concentração de tolueno, no primeiro dia de ensaio verifica-se uma maior biodegradação do mesmo, nos de processos de atenuação

natural (tolueno: 452 ± 7 mg.kg⁻¹) e de bioaumentação com bioestimulação (tolueno: 482 ± 11 mg.kg⁻¹), em relação ao processo de bioestimulação (tolueno: 541 ± 75 mg.kg⁻¹). A partir do quinto dia até o final do ensaio (50 dias), não se verificam diferenças significativas nas concentrações do tolueno entre os processos estudados, pois a mesma situou-se na faixa de redução de 99,3 a 99,7%. Entretanto, nos períodos de 19 a 50 dias de ensaio, a biodegradação do tolueno da gasolina comercial, no solo, em todos os processos avaliados, atendem a legislação ambiental (ver dados da Tabela 6.2).

Tabela 6. 3 Concentrações dos xilenos no solo pelos processos de biorremediação, em função do tempo de ensaio.

Processos/ Tempo (dias)	XILENOS Concentração média no solo e % de redução em relação ao tempo zero		
	Atenuação natural	Bioaumentação com bioestimulação	Bioestimulação
0	2236 ± 84 mg.kg ⁻¹	1888 ± 13 mg.kg ⁻¹	2283 ± 85 mg.kg ⁻¹
1	670 ± 63 mg.kg ⁻¹ (70,0%)	608 ± 2 mg.kg ⁻¹ (67,8%)	914 ± 194 mg.kg ⁻¹ (60,0%)
5	204 ± 40 mg.kg ⁻¹ (90,9%)	171 ± 25 mg.kg ⁻¹ (90,9%)	219 ± 30 mg.kg ⁻¹ (90,4%)
19	35 ± 2 mg.kg ⁻¹ (98,4%)	19 ± 8 mg.kg ⁻¹ (99,0%)	21 ± 1 mg.kg ⁻¹ (99,1%)
50	11 ± 4 mg.kg ⁻¹ (99,5%)	13 ± 3 (99,3%)	15 ± 1 mg.kg ⁻¹ (99,3%)

OBS: percentual (%) de redução dos compostos xilenos em cada tempo em relação ao tempo zero.

A Tabela 6.3 exibe a concentração média dos compostos xilenos da gasolina comercial no solo nos processos de atenuação natural, bioaumentação com bioestimulação e bioestimulação, para um tempo de ensaio, de até 50 dias. Avaliando-se a concentração dos xilenos, no primeiro dia de ensaio, verifica-se uma maior biodegradação do mesmo nos processos de atenuação natural (xilenos: 670 ± 63 mg.kg⁻¹) e de bioaumentação com bioestimulação (xilenos: 608 ± 2 mg.kg⁻¹), em relação ao processo de bioestimulação (xilenos: 596 ± 255 mg.kg⁻¹). A partir do quinto dia, até o final do ensaio (50 dias), não se verificam diferenças significativas nas concentrações dos xilenos, entre os processos estudados, pois a mesma situou-se na faixa de redução de 99,3 a 99,5%, conforme dados estatísticos.

Entretanto, nos períodos de 19 a 50 dias de ensaio, a biodegradação dos xilenos da gasolina comercial, no solo, em todos os processos avaliados, atendeu a legislação ambiental (ver dados da Tabela 6.3).

A **Tabela 6.4** exibe a concentração média dos compostos C9+ da gasolina comercial, no solo, nos processos de atenuação natural, bioaumentação com bioestimulação e bioestimulação, para um tempo de ensaio, de até 50 dias.

Tabela 6. 4 Concentrações dos compostos C9+, no solo, pelos processos de biorremediação em função do tempo de ensaio

Processos Tempo (dias)	C9+ Concentração média no solo e % de redução em relação ao tempo zero		
	Atenuação natural	Bioaumentação com bioestimulação	Bioestimulação
0	2991±16 mg.kg ⁻¹	2731±51 mg.kg ⁻¹	3175±26 mg.kg ⁻¹
1	1024±139 mg.kg ⁻¹ (65,8%)	857±2 mg.kg ⁻¹ (68,6%)	1764±483 mg.kg ⁻¹ (44,4%)
5	281±43 mg.kg ⁻¹ (90,6%)	232±20 mg.kg ⁻¹ (91,5%)	307±68 mg.kg ⁻¹ (90,3%)
19	32±0 mg.kg ⁻¹ (98,9%)	23±12 mg.kg ⁻¹ (99,2%)	30±2 mg.kg ⁻¹ (99,1%)
50	12±4 mg.kg ⁻¹ (99,6%)	23±3 mg.kg ⁻¹ (99,2%)	20±1 mg.kg ⁻¹ (99,4%)

OBS: percentual médio (%) de redução e de desvio padrão dos compostos C9+ em cada tempo em relação ao tempo zero.

Avaliando-se a concentração medida dos compostos C9+, verifica-se que, no primeiro dia de ensaio, os processos de bioaumentação com bioestimulação (C9+: 857±2 mg.kg⁻¹ de concentração) e de atenuação natural (1024±139 mg.kg⁻¹ de concentração), apresentaram a maior biodegradação desses compostos, no solo estudado, quando comparados com o processo de Bioestimulação (1764±483 mg.kg⁻¹ de concentração). A partir do quinto dia até o final de ensaio (50 dias), não se verificou uma diferença significativa entre os processos. Nos períodos de 19 a 50 dias, a biodegradação dos compostos C9+, da gasolina comercial, no solo, em todos os processos avaliados, apresentou concentração menor que a permitida pela legislação ambiental segundo, ACCIOLY & SIQUEIRA (2000).

A partir do período de 19 a 50 dias de ensaio, todos os processos estudados apresentaram concentrações de compostos C9+ menores que 100 mg kg⁻¹ (Tabela 6.4). Segundo Accioly & Siqueira (2000), o valor de 100 mg kg⁻¹ de hidrocarbonetos totais, atende a legislação ambiental para áreas residenciais. Considerando que os compostos C9+ apresentam alta contribuição para os hidrocarbonetos totais da gasolina comercial, estes podem ser considerados praticamente como hidrocarbonetos totais.

Tabela 6. 5 Concentrações dos compostos BTX no solo pelos processos de biorremediação, por 50 dias de incubação

Tratamentos (com 5% gasolina comercial)	Benzeno		Tolueno		Xilenos	
	Concentração mg.kg ⁻¹	Desvio Padrão	Concentração mg.kg ⁻¹	Desvio Padrão	Concentração mg.kg ⁻¹	Desvio Padrão
Bioestimulação	4	0,75	7	0,94	15	0,79
Bioaugmentação com bioestimulação	5	1,63	8	1,4	13	2,64
Atenuação natural	4	1,01	6	1,65	11	3,53
Legislação ambiental para solos em área residencial*	0,08 mg.kg⁻¹		30 mg.kg⁻¹		30 mg.kg⁻¹	
Legislação ambiental para solos em área industrial*	0,15 mg.kg⁻¹		75 mg.kg⁻¹		70 mg.kg⁻¹	

Obs: * Fonte CETESB (2005)

Pela **Tabela 6.5** verificam-se as concentrações dos compostos BTX da gasolina comercial, no solo, nos diferentes processos estudados, aos 50 dias, que podem ser comparadas aos valores da legislação ambiental em relação às áreas. Nota-se, nesta tabela, que somente o composto benzeno não atendeu aos valores exigidos pela Legislação, para as áreas: residencial e industrial, em todos os processos avaliados nas condições estudadas.

6.3 CONCLUSÕES

O percentual de redução dos hidrocarbonetos totais, em 50 dias, foi de até 99% conforme processos avaliados, atendendo a Legislação Ambiental. O mesmo comportamento foi verificado nos compostos aromático toluenos e xilenos. Já o benzeno permaneceu com valores acima da legislação, em todos os processos estudados. Neste estudo, os tratamentos com adição de nutrientes (bioestimulação, com e sem bioaugmentação e testemunho 2), sofreram inibição destes e não aceleraram a degradação da gasolina como foi observado pela liberação de CO₂, podendo, inclusive, ter inibido a adição do inóculo N1 do processo de bioaugmentação, nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accioly, A. M. A.; Siqueira, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: Novais, R. F.; Alvarez V.; V. H.; Schaefer, C. E. G. R. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.1, p. 299-352, 2006.
- Alvarez, P.J.J.; Hunt, C.S.. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. **Revista Latatina Americana de Microbiologia**, v. 44, n. 2, p. 83-104, 2002.
- Beller, H.R.; Kane, S.R.; Legler T.C. Chapter 4: Effect of ethanol on hydrocarbon-degrading bacteria in the saturated zone: microbial ecology studies. In: Rice, D.W.; Depue, R.T. **Subsurface Fate and Transport of Gasoline Containing Ethanol**; Eds.; University of California: Livermore, CA, 2001.
- Bento, F. M.; Camargo, F. A. O.; Okeke, B. C. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**., v. 96, p. 1049-1055, 2005.
- Bognolo, G., Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloid Surface A**. v. 152, p. 41-52, 1999.
- Braddock, J. F.; Catterall, P. H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Biorremediation Journal**, v. 3, n. 2, 1999.
- Chang, S. H.; Devanny, J. Bioaugmentation for soil bioremediation. In: Wise, D. L.; Trontolo, D. J. (Eds.) **Bioremediation of contaminated soils**. Marcel Dekker, New York, pp. 465-488, 2000.
- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, **CETESB. 2009. Relação de áreas contaminadas**; São Paulo, SP, Brasil, 2009. (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp) (acesso: em setembro de 2010).

_____. **CETESB. 2008.** Relação de áreas contaminadas; São Paulo, SP, Brazil, 2008. (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp) (acesso: em setembro de 2008).

_____. **CETESB. 2006.** Relação de áreas contaminadas; São Paulo, SP, Brasil, 2005. (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp) (acesso: em novembro de 2006).

_____. **CETESB. 2005.** Decisão de Diretoria Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005, **Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005**, em substituição aos Valores Orientadores de 2001, e dá outras providências. Disponível na internet via: [ttp://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf) (acesso: em julho de 2008).

Cordazzo, J. **Modelagem e Simulação Numérica do Derramamento de Gasolina Acrescida de Álcool em Águas Subterrâneas.** Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil, 120p, 2000.

Cunha, P. O.; Vargas, E. A.; Guimaraes JR., J. R. V.; Campos, T. M. P.; Nunes, C. M. F.; Costa, A.; Antunes, F. S.; Silva, M. I. P.; Mano, D. M. Evaluation of bioventing on a gasoline-ethanol contaminated undisturbed residual soil. **Journal of Hazardous Materials**, v.110, p. 63-76. 2004.

Deeb, R.A.; Alvarez-Cohen, L. Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortium and *Rhodococcus*. **Biotechnol Bioengineering**, v. 62, n. 5, p.526-36, 1999.

Empresa Comercial de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análises de Solos**; Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 212 pp, 1999.

Fiechter, A.; Käppeli, O.; Koch, K.A.; Reiser, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal Bacteriology**, v. 173, p. 55-58, 1991.

Guimarães, C. H. D. **Avaliação de Risco Ambiental de Sítios Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo**; Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 315 pp, 2003.

- Hanson, K.G.; Desai, J.D.; Desai, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Technology**, v. 7, n.10, p.745-748, 1993.
- Hunt, C.S.; Ferreira, D.S.; Corseuil, H.X.; Alvarez, P.J.J. Effect of ethanol on aerobic BTEX degradation. In: Alleman, B. C.; Leeson, A.L. **In situ and on-site bioremediation**; Eds.; Batelle Press: Columbus, OH; p. 4, n.1, p. 49-54, 1997.
- Jacques, R. J. S. **Biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no solo**. Porto Alegre: UFRS Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, 188 p., Tese (Doutorado), 2005.
- Jean, J.-S.; Lee, M.-K.; Wang, S.-M.; Chattopadhyay, P.; Maity, J.P. Effects of inorganic nutrient levels on the biodegradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) by *Pseudomonas spp.* in a laboratory porous media sand aquifer model. **Bioresource Technology**, v. 99, n.16, p. 7807-7815, 2008.
- Jindrová, E.; Chocova, M.; Demnerová, K.; Brenner, V. Bacterial aerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene. **Folia Microbiol.**, v. 47, n. 2, p.83-93., 2002.
- Jônio, H.; Bibeau, L.; Heitz, M. Biofiltration of air contaminated by styrene:effect of nitrogen supply, gas flow rate, and inlet concentration. **Environmental Science Technology**, v. 34, p. 1764-1771, 2000.
- Junior, J. S.; Mariano, A. P.; Angelis, D. F. 2009 Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **Afr. Journal Biotechnology**, v. 8, n.12, p. 2774-2778, 2009.
- Karlson, U.; Willumsen, P.A. Screening of bacteria, isolated from PAH- contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation.**, v. 7, p. 415-423, 1997.
- Koch, K.A. et al. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal Bacteriology**, v. 173, n.3, p. 4212-4219, 1991.

- Lawrence, A.; Jonsson S.; Borjesson, G. Ethanol, BTEX and microbial community interactions in E-blend contaminated soil slurry. **Intern. Biodeterioration Biodegradation**, v. 63, p. 654-666, 2009.
- Madigan, J.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. **Book Biology of Microorganisms**; 8th ed, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1997.
- Maier, R. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p.101-121, 2003.
- Mariano, A.P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil, 2006. 162 p.
- Mariano, A.P.; Angelis, D.F.; Bonotto, D.M.; Pirôllo, M.P.S.; Contiero, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. In: **XXII Interamerican Congress of Chemical Engineering**, Buenos Aires, 2006.
- Mielniczuk, C. **A população microbiana e a degradação de resíduos petroquímicos no solo**, Porto Alegre: UFRGS - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 135 p., Dissertação (Mestrado), 1991.
- Oh, K.-T.; Kang, C.-M.; Kubo, M.; Chung, S.-Y. Culture condition of *Pseudomonas aeruginosa* F722 for biosurfactant production. **Biotechnology Bioprocess Engineering**, v. 11, n. 6, p. 471-476, 2006.
- Pinzon, N.M.; Ju, L.-K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 82, n. 5, p. 975-981, 2009.
- Pinzon, N.M.; Ju, L.-K.; Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 10, p.1583-1588, 2009.
- Pirollo, 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 Applied Microbiology**, v. 105, p. 1484-1490, 2008.

- Powers S.E. et al. The transport and fate of ethanol and BTEX in groundwater contaminated by gasohol. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 79-123, 2001.
- Rahman, K. S. M.; Bnat, I. M.; Thahira, J.; Thayumanavan, T.; Lakshmanaperumalsamy, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 25-32, 2002.
- Rice, D. W.; Powers, S. E.; Alvarez, B. J. J. Potential scenarios for ethanol containing gasoline released into surface and subsurface waters. In: Rice, D. W.; Cannon, G., Eds. **Health and Environmental Assessment of the Use of Ethanol of a fuel Oxygenated** – Report to the California Environmental Policy Council in Response to Executive Order D-5-99. *vol. 4, Potential Ground and Surface Water Impacts*; Lawrence Livermore National Laboratory: Livermore, CA UCRL-AR-135949 v.. 4 Ch. 1, 2000.
- Richard, J.Y.; Vogel, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration e Biodegradation**. 44 (2-3), 93-100, 1999.
- Roy, S.; Hens, D.; Biswas, D.; Kumar, R. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. **World Journal Microbiology. Biotechnology**, 18, 575-581, 2002.
- Siegmund, I.; Wagner, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnology Techenology.**, v. 5, n. 4, p. 265-268, 1991.
- Silva, F.L.N.; Santos Jr., J.R.; Neto, J.M.M.; Silva, R.L.G.N.P. Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do Estado Piauí. **Revista Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 56-60, 2009.
- Silva, R. L. B. **Contaminação de Poços Rasos no Bairro Brisamar, Ítaqui, RJ, por Derramamento de Gasolina: Concentração de Btex e Avaliação da Qualidade da Água Consumida Pela População**. Tese (Doutorado), Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2002. 182 p.

- Soares A. A. **Avaliação da Biorremediação de Água Subterrânea Contaminada com Gasolina: Experimentos em Microcosmos e em Campo**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2006.172p.
- Spinelli, L. F. **Biorremediação, toxicidade e lesão celular em derrames de gasolina**. Porto Alegre: UFRS- Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, Tese (Doutorado), 2005. 194 p.
- Spinelli, L. F. **Biorremediação, toxicidade e lesão celular em derrames de gasolina**. Porto Alegre: UFRS- Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, 194 p., Tese (Doutorado), 2005.
- Stotzky, G. Microbial respiration. In: Black, C.A., Ed. **Methods of soil analysis**. American Society of Agronomy: Madison, WI; 1551-1572, 1965.
- Trovão, R. S. **Análise ambiental de solos e águas subterrâneas contaminadas com gasolina: estudo de caso no município de Guarulhos**. Dissertação (mestrado), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, SP, Brasil, 2006.224 p.
- Tuleva, B. J.; Ivanov, G. R.; Christova, N. E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Zeitschrift Naturforsch.**, v. 57, p. 356-360, 2002.
- Ulrich, G. **The fate and transport of ethanol-blended gasoline in the environment: a literature review and transport modeling** (online, PDF): submitted by Governors' Ethanol Coalition, Lincoln, Nebraska. 2009. (<http://www.ethanol-gec.org/publicat.htm>).
- United States Environmental Protection Agency – USEPA – **Method 5021**, Solids Sample, Volatile organic compounds, Automated headspace, 1996.
- United States Environmental Protection Agency – USEPA – **Method 8015B**, Nonhalogenated organics using CG/FID, 1996.

7 ESTUDO 3

Avaliação do comportamento dos compostos dos combustíveis gasolina comercial, gasolina e etanol, em solo, pelos processos de atenuação natural e bioestimulação (1% de glicose): escala piloto e de laboratório

RESUMO

Segundo levantamento das áreas contaminadas do Estado de São Paulo, da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2009), 79% foram devido a contaminações com combustíveis, principalmente causados por vazamentos em tanques de armazenamento subterrâneos (TAS) dos postos de combustíveis (2.279 postos). No ano anterior, em 2008, das áreas contaminadas no Estado de São Paulo, 78% foram provenientes de vazamentos dos TAS de postos de combustíveis (CETESB, 2008), o que mostra a grave situação dos mesmos. Visto que, esses vazamentos provocam contaminação no ambiente, muitas vezes irreversíveis, o que implica que os processos efetivos de descontaminação do solo e de águas subterrânea sejam aplicados, sendo os processos de biorremediação os mais comumente utilizados.

Neste trabalho foram empregados dois processos de biorremediação, no solo, bioestimulação (microbiota nativa com adição de 1% m m⁻¹ de glicose) e atenuação natural (microbiota nativa), em dois sistemas de estudo: fechado (frascos 1,5 L tampados) e aberto (tubos de PVC- 5 cm de diâmetro X 100 cm de comprimento), contaminados com 5% do combustível gasolina comercial, ou gasolina pura ou etanol. Os experimentos feitos nos processos empregados, em sistema fechado, revelaram que as concentrações determinadas de compostos BTX, contidos nas gasolinas comercial e pura, em 150 dias, de ensaio, ficaram abaixo dos valores de interdição ambiental (CETESB, 2005). Além disso, neste sistema, a redução das concentrações dos compostos etanol, C9+ e TPH dos combustíveis estudados, foram de até 99%, em 150 dias de ensaio. Já no sistema aberto, somente os compostos dos combustíveis gasolina comercial e etanol reduziram, acentuadamente, em todas as profundidades estudadas (1, 50 e 100 cm). Para os compostos BTX da gasolina comercial, em ambos os processos e, em todas as profundidades avaliadas, as concentrações determinadas apresentaram valores abaixo dos valores considerados poluentes pela Legislação Ambiental.

Entretanto, nos processos estudados que empregaram gasolina pura, a redução dos compostos BTX não atendeu a legislação ambiental vigente, somente na profundidade de 1 cm.

7.1 MATERIAL E MÉTODOS

7.1.1 Solo

O solo, *in natura*, assim utilizado, foi denominado por não conter nenhum histórico de contaminação. As amostras deste solo foram coletadas em uma área localizada na Companhia Petroquímica do Sul (COPELUL, hoje BRASKEM S.A.). O solo empregado como amostra, foi classificado como argissolo vermelho distrófico (segundo EMBRAPA, 1999). Este foi transportado e estocado (em saco fechados) adequadamente e acondicionados em ambiente com temperatura de 4°C. Antes dos experimentos, o mesmo foi seco a temperatura ambiente em bandejas, seguido de peneiramento em peneira de 6 mm (SABATÉ *et al.*, 2004) e quarteamento. As análises dos solos foram efetuadas de acordo com Tedesco *et al.* (1995), no Laboratório de Análises de Solo da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo 3).

7.1.2 Combustíveis

Os combustíveis utilizados nos experimentos foram gasolina comercial com 24% de etanol, gasolina pura e etanol sendo os mesmos fornecidos pela Cia. Petroquímica do Sul (COPELUL, hoje BRASKEM). Estes foram transportados e estocados em frascos de vidro, cor âmbar, hermeticamente fechados, e acondicionados em ambiente com temperatura de 4°C. A caracterização química dos combustíveis foi feita pela BRASKEM S.A. por cromatografia a gás, em um cromatógrafo gasoso Agilent - modelo 6890, equipado com detector de massas (Agilent modelo 5973). (Anexo 2)

7.1.3 Experimentos

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Nestes foram empregados dois processos de biorremediação, atenuação natural (microbiota nativa), e bioestimulação (microbiota ativa e 1% de glicose) (MIELNICZUK, 1991 e YADAV & REDDY, 1993), em sistema aberto (tubos de PVC de 5 cm de diâmetro X 100 cm de comprimento) e fechado (frascos de vidro com 1,5 L, com tampas). As amostras de solo foram contaminadas com 5% de combustível (gasolina pura, ou gasolina comercial ou etanol), conforme literatura (PRENAFETA-BOLDÚ *et al.*, 2004; LABUD *et al.*, 2007), pela superfície.

A umidade do solo foi corrigida para 12% (SPINELLI *et al.*, 2002; SHEWFELT *et al.*, 2005), sendo a adição de 1% de glicose precedida à correção da umidade.

7.1.4 Tratamentos das amostras

Os tratamentos utilizados tanto para o sistema fechado como para o aberto, nos dois processos empregados foram os seguintes: 1- testemunho 1 (solo); 2- testemunho 2 (solo com 1% de glicose); 3- atenuação natural (solo com 5% gasolina comercial); 4- bioestimulação (solo com 1% de glicose e 5% gasolina comercial); 5- atenuação natural (solo com 5% gasolina pura); 6- bioestimulação (solo com 1% de glicose e 5% gasolina pura); 7- atenuação natural (solo com 5% etanol); 8- bioestimulação (solo com 1% de glicose e 5% etanol). No sistema fechado, foi utilizado mais um tratamento denominado branco. Este tratamento foi feito em frasco de vidro (item 7.1.5), sem amostra, que continha somente um béquer de 50 mL com 20 mL de NaOH 0,4 mol L⁻¹, para absorver e quantificar o CO₂ do ambiente. O valor de CO₂ do ambiente determinado foi subtraído do valor medido de CO₂ nos demais tratamentos.

7.1.5 Amostragem em sistema fechado

No sistema fechado (Figura 7.1; Spinelli et al, 2002; Bento et al., 2005) utilizou-se frascos de vidro de 1,5 L com 200 g de solo, *in natura*, com e sem contaminação de 5% de combustível. As coletas das amostras de solo dos tratamentos (item 7.1.4) empregados foram feitas somente nas profundidades de 1 cm. Os períodos de amostragem desse experimento foram de: 0, 1, 2, 3, 7, 15, 30, 70, 90 e 150 dias. Nas amostras coletadas, em cada período, foram realizadas as análises cromatográficas, respirométricas e de teores de umidade. Nos períodos de 0 e 150 dias, foram realizadas análises biológicas (heterotróficos e degradadores) e determinação do pH do solo.

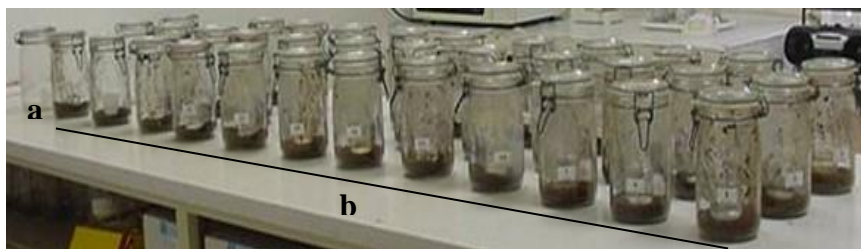


Figura 7. 2 Sistema fechado, com frascos de vidro com 1,5 L, com amostra de solo.

a= branco e b= tratamentos

7.1.6 Amostragem no sistema aberto

O sistema aberto (Figura 7.2), foi conduzido com tubos de PVC (SPINELLI, 2005) com 5 cm diâmetro por 100 cm de comprimento contendo 2,15 kg de solo, *in natura*, contaminado ou não com combustível, conforme tratamentos descritos no item 7.1.4. Este experimento foi iniciado em fevereiro (verão no Brasil), com temperaturas variando de 35 a 40°C e, a partir dos 70 dias de experimento, as temperaturas variaram de 30 a 35°C, até o final do experimento (150 dias). A altura estabelecida para as coletas das amostras de solo nos tratamentos empregados (item 7.1.4) foi de 1 e 50 cm, a partir da superfície. Estas coletas foram realizadas, nos períodos de 0, 7, 15, 30, 70, 90 e 150 dias. Também foram feitas

coletas de amostras nos 100 cm de profundidade somente para o período, zero e 150 dias. Isto foi feito para verificar a biodegradação dos compostos dos combustíveis, no solo, em todas as profundidades do tubo.

O potencial de degradação dos compostos das gasolinas, nos solos, foi verificado por análise cromatográfica a gás (métodos USEPA, 8015-B e 5021). A determinação dos teores de umidade (Tedesco *et al.*, 1995), foram avaliados somente no testemunho 1 (solo *in natura*) em todos os períodos de amostragem (0, 1, 2, 3, 7, 15, 30, 70, 90 e 150 dias). As análises biológicas da população de micro-organismos presentes nos solos dos tratamentos foram realizadas pelo número mais provável (NMP) de degradadores e heterotróficos totais (BRADDOCK & CATTERALL, 1999; BENTO *et al.*, 2005) e, a determinação do pH do solo (TEDESCO *et al.*, 1995) dos tratamentos, foram realizadas nos períodos de amostragem, de zero e 150 dias.



Figura 7.3 Sistema aberto, com tubos de PVC.

7.1.7 Análise cromatográfica

As concentrações dos compostos etanol, BTX, C9+ e TPH dos combustíveis utilizados (gasolina comercial, etanol, gasolina pura), no solo estudado, nos dois processos (bioestimulação e atenuação natural) e, nos sistemas (fechado e aberto), foram medidas por meio da técnica de cromatografia a gás, segundo procedimento descrito no item **5.1.12**, do estudo 1 e detalhada no Anexo 1.

7.1.8 Análise respirométrica

A análise respirométrica foi realizada para medir a concentração de CO₂ liberado durante o período de ensaio das amostras de solo dos tratamentos, em sistema fechado, segundo o descrito no item 5.1.5, do estudo 1.

7.1.9 Análises Biológicas

A estimativa do número de micro-organismos heterotróficos e de degradadores foi realizada com a técnica do Número Mais Provável (NMP) de micro-organismos (Bento *et al.*, 2005). Segundo Braddock & Catterall (1999), o método do NMP pode ser utilizado para quantificar micro-organismos heterotróficos e degradadores de hidrocarbonetos, no solo. Este método também pode indicar a dinâmica populacional dos micro-organismos que atuam na degradação de contaminantes orgânicos, em solos, e o impacto que os contaminantes podem gerar a população nativa do solo.

Os meios utilizados nas análises biológicas de degradadores e heterotróficos foram o meio Bushnell Hass - BH (BUSHNELL HASS, 1941), com indicador redox TTC (cloreto de trifenil-tetrazólio; ATLAS & BARTHA, 1998; BENTO *et al.*, 2005) e o meio nutritivo (ou caldo nutritivo; PALA *et al.*, 2002; BENTO *et al.*, 2005), respectivamente.

O meio BH consiste de (g L⁻¹): 0,2 de MgSO₄, 0,02 de CaCl₂, 1,0 g de KH₂PO₄, 1,0 de K₂HPO₄, 1,0 de NH₄NO₃ e 0,05 de FeCl₃. A concentração da solução do indicador redox cloreto de trifenil-tetrazólio (TTC), foi de 0,025g de TTC em 100 mL de água destilada. O meio de cultura usado, na análise de degradadores, foi preparado por meio da mistura de duas soluções uma com meio BH e outra com TTC, na proporção de 4:1, ou seja, 400 mL da solução de meio BH e 100 mL da solução do indicador TTC, esterilizados em autoclave.

7.1.9.1 Estimativa do NMP de heterotróficos totais

Para a determinação da estimativa do número mais provável (NMP) de micro-organismos heterotróficos totais, do solo, no sistema fechado e aberto, o meio utilizado foi o caldo nutritivo (PALA *et al.*, 2002; BENTO *et al.*, 2005) e o procedimento da análise segue descrito no item **6.1.1.2 item A** do estudo 2.

7.1.9.2 Estimativa do NMP de degradadores

A estimativa do NMP de degradadores de combustível, no solo, foi realizada conforme técnica do NMP proposta por Bradock & Catterall (1999), no sistema fechado e aberto. Nesta técnica utiliza-se meio mineral Bushnell Hass (BH) com indicador redox TTC.

Esta análise utilizou um grama de amostra de solo de cada tratamento que foi adicionado em 9 mL de água estéril, num tubo de ensaio. Em seguida foram retirados 100 µL da amostra e adicionou-se a 900 µL de água estéril, existente nos poços da placa de diluição. Depois de realizada as diluições sucessivas das amostras, 10 µL de inóculo de cada diluição, foi adicionada a 200 µL do meio mineral incolor (BH/TTC), existente na placa de estireno com 96 poços, e mais 10 µL de combustível foi adicionado no final, conforme cada tratamento. Foram utilizadas cinco repetições para cada diluição. A placa foi coberta com papel alumínio, para evitar a foto-oxidação (do combustível e do indicador) e colocada em estufa a 30°C, por 14 dias. Após, 14 dias visualizou-se o término da análise pela mudança de cor do meio mineral BH/TTC, de incolor para coloração rósea (menor degradação de hidrocarbonetos) ou coloração roxa (maior degradação de hidrocarbonetos). E esses resultados foram estimados pela Tabela do NMP (BRADDOCK & CATTERALL, 1999), para se obter os valores do NMP de micro-organismos degradadores existentes em cada amostra, sendo os valores obtidos expressos em $\log \text{ ml}^{-1}$ NMP de degradadores totais por grama de solo.

7.1.10 Análises de teor de umidade e de determinação do pH

A análise do teor de umidade foi realizada somente no testemunho 1 em todos os períodos de amostragem, enquanto que a determinação do valor de pH foi realizada em todas as amostras dos tratamentos, mas somente nos períodos de zero e 150 dias, segundo procedimento descrito no item **6.1.1.3**, do estudo 2.

7.1.11 Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicatas. Os resultados das análises respirométricas e cromatográficas foram analisados estatisticamente pelas comparações das médias e variância pelo teste de Tukey, com diferenças significativas ($p < 0.05$).

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos, por meio das análises feitas neste estudo, mostram a biodegradação dos combustíveis, pela atividade microbiana, do solo, em relação aos tratamentos e sistemas (fechado e aberto) estudados, em 150 dias. Nos sistemas, fechado e aberto foram realizadas as análises cromatográficas, biológicas (heterotróficos e degradadores), dos teores de umidade e determinação do pH. A análise respirométrica só foi realizada em sistema fechado.

7.2.1 Análises por cromatografia a gás no sistema fechado

Os resultados das concentrações medidas por cromatografia a gás, dos compostos BTX e C9+ dos combustíveis (gasolina comercial e gasolina pura), no solo, nos processos de

bioestimulação (1% glicose) e atenuação natural em função do tempo, podem ser observados na Tabela 7.1. A Tabela 7.2 mostra os valores de interdição dos compostos BTX, em solo, segundo a Legislação Ambiental, de acordo com área residencial, industrial e agrícola avaliada (CETESB, 2005).

Tabela 7. 1 Concentrações, em mg kg^{-1} , dos compostos BTX e C9+ , em solos contaminados com gasolina comercial ou pura, a 1 cm de profundidade, em sistema fechado, nos processos de atenuação natural e bioestimulação em função do tempo.

Processo de biorremediação										
Concentração dos compostos da gasolina comercial (mg kg^{-1})										
composto	Atenuação Natural (dias)					Bioestimulação (1% glicose) (dias)				
	0*	15	30	70	150	0*	15	30	70	150
Benzeno	762± 25	116± 39	19± 9	2± 6	0± 0	658± 276	121± 49	16± 12	4± 1	0± 0
Tolueno	1262± 59	271± 20	42± 24	4± 2	0± 0	1170± 257	279± 12	26± 16	5± 2	1± 0
Xilenos	1005± 43	202± 8	69± 45	10± 2	2± 1	978± 128	197± 67	36± 17	10± 4	4± 1
C9+	1861± 78	263± 12	153± 100	36± 13	23± 6	1746± 91	235± 27	90± 26	31± 9	41± 15
gasolina pura (mg kg^{-1})										
	Atenuação Natural (dias)					Bioestimulação (1% glicose) (dias)				
	0*	15	30	70	150	0*	15	30	70	150
Benzeno	685± 114	205± 14	70± 27	13± 5	0± 0	596± 105	231± 13	110± 6	10± 1	0± 0
Tolueno	1726± 56	530± 1	23± 5	2± 2	0± 0	1320± 30	540± 3	30± 1	4± 2	0± 0
Xilenos	3130± 902	801± 2	459± 2	117± 34	6± 1	2393± 608	798± 77	558± 6	104± 6	11± 3
C9+	1737± 92	475± 0	256± 0	136± 43	46± 9	1525± 387	476± 124	284± 25	74± 20	47± 3

Obs: * coleta 1 hora após a montagem dos experimentos.

Na Tabela 7.1, observa-se que, no tempo zero (coleta após uma hora de montagem dos experimentos), os compostos benzeno e C9+ das gasolinas pura e comercial, nos dois processos estudados, apresentaram concentrações semelhantes. Neste mesmo período (zero) as concentrações dos compostos xilenos e tolueno da gasolina pura, em ambos os processo estudados, apresentaram maiores concentrações do que os compostos da gasolina comercial, concordando com CORSEUIL *et al.* (1998). Segundo Corseuil *et al.* (1998), os compostos da gasolina pura tendem a ter maiores concentrações de compostos BTX, do que os compostos BTX da gasolina comercial. Isto se deve a presença do etanol na composição da gasolina

comercial. Porém, neste experimento, no tempo zero, o benzeno apresentou concentração semelhante nos dois tipos de gasolina. Isto ocorreu, provavelmente, porque o benzeno empregado nos combustíveis brasileiros tem a concentração limitada de no máximo 1% (GUIMARÃES, 2003; SILVA *et al.*, 2009).

Segundo os dados da tabela, verifica-se que, em 30 dias, as concentrações dos compostos BTX e C9+ da gasolina comercial, no solo, diminuíram mais do que na gasolina pura, nos dois processos estudados. Isto informa que, a presença do etanol pode ter favorecido a maior degradação (ou volatilização ou percolação) destes compostos, principalmente do benzeno e C9+ que, no tempo zero. Além disso, esses compostos apresentaram concentrações praticamente iguais na gasolina comercial e pura nos processos estudados. Também neste período de 30 dias, as concentrações dos compostos C9+ ($90 \pm 26 \text{ mg.kg}^{-1}$) da gasolina comercial, no processo de bioestimulação, apresentaram-se menores do que no processo de atenuação natural ($C9+: 153 \pm 100 \text{ mg kg}^{-1}$). No período de 70 dias, as concentrações dos compostos C9+ ($74 \pm 20 \text{ mg kg}^{-1}$) da gasolina pura no processo de bioestimulação (1% glicose), foram menores do que no de atenuação natural ($C9+: 136 \pm 43 \text{ mg kg}^{-1}$). Tal comportamento sugere que a glicose, contida no processo de bioestimulação, pode ter favorecido a maior degradação destes compostos C9+ da gasolina comercial e da gasolina pura, nos períodos de 30 e 70 dias.

A partir dos 70 dias até os 150, a biodegradação do benzeno e do tolueno em ambas as gasolinas usadas, nos dois processos avaliados, situa-se na mesma ordem de grandeza; provavelmente devido à falta de oxigênio que pode ter ocorrido no sistema fechado por longo tempo (80dias). Os valores ficaram abaixo dos de interdição ambiental para área residencial, conforme Tabela 7.2.

Tabela 7. 2 Valores de intervenção dos compostos benzeno, tolueno e xilenos em solo

Compostos	SOLOS (mg kg^{-1} peso seco)		
	Intervenção em área		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Benzeno	0,6	0,08	0,15
Tolueno	30	30	75
Xilenos	25	30	70

Fonte: CETESB (2005)

A Tabela 7.2 apresenta os valores de interdição dos compostos BTX, em solo, conforme CETESB (2005). A Fundação de Proteção do Ambiente (FEPAM), órgão de ambiente do Estado do Rio Grande do Sul, vem utilizando estes valores para realizar interdição ambiental de áreas contaminadas com esses compostos.

O percentual de redução dos compostos etanol, BTX, C9+ e TPH, existente em cada combustível (gasolina comercial, gasolina pura e etanol), presente no solo, foram obtidos no respectivo período de amostragem em relação ao tempo zero, nos processos de atenuação natural e bioestimulação (com 1% de glicose). Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 7.3.

Pela Tabela 7.3 observa-se que, para o tempo de 30 dias, as concentrações dos compostos BTX, C9+ e TPH da gasolina comercial, no solo, reduziram mais do que na gasolina pura, nos processos estudados. Isto informa que a presença do etanol pode ter favorecido a maior redução (por degradação ou volatilização ou percolação) destes compostos, em 30 dias. Ao mesmo tempo sugere que a fonte extra de carbono, glicose, no processo de bioestimulação, mesmo competindo com etanol disponível neste combustível gasolina comercial (24% de etanol), provavelmente, tenha contribuído para a maior degradação em parte dos compostos C9+ e TPH da gasolina comercial no processo de bioestimulação, aos 30 dias.

Entretanto, comparando os dois processos utilizados com um único combustível, aos 150 dias no sistema fechado, não se verifica diferença significativa entre estes processos.

O composto etanol, presente no combustível gasolina comercial e etanol (com 99,9% de pureza), teve redução semelhante com o tempo, e atingiu valores bem próximos nos dois combustíveis e processos estudados. Isto pode indicar que o etanol pode ter sido degradado (CORDAZZO, 2000), ou volatilizado, mesmo na presença de hidrocarbonetos da gasolina, e que a glicose não influenciou na degradação do composto etanol em ambos os combustíveis e processos nas condições estudadas; exceto no combustível etanol, aos 15 dias no processo de bioestimulação.

Pode-se verificar que mesmo na presença dos hidrocarbonetos da gasolina comercial o etanol não inibiu e nem desfavoreceu a degradação dos BTX, e de outros compostos da gasolina comercial nas condições estudadas, até 150 dias. Os BTX e o etanol apresentaram elevadas reduções no solo com gasolina comercial, nos períodos estudados. Estes fatos discordaram da literatura que informa que o etanol é, preferencialmente degradado

(CORDAZZO, 2000; BELLER *et al.*, 2001; SILVA, 2002; MARIANO, 2006; SOARES, 2006).

Tabela 7. 3 Percentual (%) de redução dos compostos (etanol, BTX, C9+, TPH) presentes em cada combustível (gasolina comercial, gasolina pura, etanol), contido no solo, nos processos de atenuação natural e bioestimulação. Os percentuais de redução calculados em relação ao tempo zero, de cada tratamento.

<i>Percentual (%) de redução dos compostos da gasolina comercial</i>												
Tempo (dias)	Atenuação Natural (%)						Bioestimulação (1% glicose) (%)					
	Etanol	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9+	TPH	Etanol	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9+	TPH
0-15 d	86	85	79	80	86	87	90	82	76	80	87	86
0-30 d	94	98	97	93	92	97	95	98	98	96	95	98
0-70d	100	100	100	99	98	99	100	100	100	99	98	99
0-150 d	100	100	100	100	99	99	100	100	100	100	98	99
<i>Percentual (%) de redução dos compostos da gasolina pura</i>												
Tempo (dias)	Atenuação Natural (%)					Bioestimulação (1% glicose) (%)						
	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9+	TPH	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9+	TPH		
0-15 d	70	69	74	73	78	61	59	67	69	72		
0-30 d	90	86	85	85	91	82	77	77	81	86		
0-70d	98	99	96	92	97	98	97	96	95	97		
0-150 d	100	100	100	99	99	100	100	100	97	99		
<i>Percentual (%) de redução do etanol</i>												
Tempo (dias)	Atenuação Natural (%)						Bioestimulação (1% glicose) (%)					
	Composto Etanol						Composto Etanol					
0-15 d	87						87					
0-30 d	93						94					
0-70d	97						97					
0-150 d	100						100					

Neste estudo o etanol pode ter favorecido a maior degradação dos BTX da gasolina comercial, até 30 dias, pois os resultados destes compostos BTX apresentaram-se com elevadas reduções. Este favorecimento da degradação dos BTX, na presença do etanol,

provavelmente ocorreu devido ao efeito co-solvência (PENNER, 2000; HUNT & ALVAREZ, 2002; SOARES, 2006). Segundo estes autores, o etanol pode aumentar a população microbiana capaz de degradar os compostos BTX e desta forma auxiliar na degradação destes compostos, o que provavelmente ocorreu, até 30 dias. Também, observa-se que, de 70 a 150 dias, pequena redução houve entre os compostos do mesmo combustível nos dois processos estudado, provavelmente, devido aos baixos teores de oxigênio do sistema fechado, durante longo período. Aos 150 dias, os compostos avaliados nos tratamentos foram reduzidos quase totalmente.

Nos experimentos de Marchal *et al.* (2003), a biodegradação de 3,5 % de gasolina pura no solo apresentou redução dos compostos TPH de 96,5%, aos 28 dias. Neste experimento utilizou-se maior concentração de gasolina em relação ao experimento de MARCHAL *et al.* (2003). Tanto que neste foi utilizado 5% de gasolina pura em solo (50.000 mg kg⁻¹ de solo) nos processos de atenuação natural e bioestimulação e, aos 30 dias, observou-se redução dos compostos TPH da gasolina pura de 91 e 86%, respectivamente. Isto indica que mesmo com maior concentração de gasolina pura, no solo, este experimento apresentou valores de redução bem próximos dos obtidos nos experimentos de MARCHAL *et al.* (2003), principalmente no processo de atenuação natural. Segundo Shewfelt *et al.* (2005), nos testes de solos contaminados com gasolina com TPH de 1800 mg kg⁻¹ tratados com processos de bioventilação com bioestimulação (com nitrogênio na forma de amônio, sal NH₄Cl, na relação C:N de 10:1), com 18 % de umidade no solo, a redução média do TPH foi de 88%, em 30 dias. Neste experimento a redução dos compostos TPH (91%) da gasolina pura no processo de atenuação natural foi maior, em 30 dias, e mesmo com maior concentração de gasolina no solo, sem adição de oxigênio e nutrientes. Provavelmente isto ocorreu devido a diferenças na microbiota do solo.

7.2.2 Análise respirometria (liberação de CO₂) no sistema fechado

Os resultados das análises respirometria informam as concentrações de CO₂ acumulados liberados pelos micro-organismos das amostras de solo dos tratamentos, em função do tempo, em sistema fechado (Figura 7.3).

Na Figura 7.3 observa-se que o testemunho 2 apresenta maior liberação de CO₂ em relação aos demais tratamentos do sistema fechado, em todos os tempos de amostragem, com diferenças significativas segundo dados estatísticos. A diferença do testemunho 2 foi bem superior a partir do tempo de três dias. Nos períodos de 7 e 150 dias, os valores foram de 1.535 mg kg⁻¹ e 4.464 mg kg⁻¹, respectivamente, enquanto que para o testemunho 1, os valores foram de 320 mg kg⁻¹ para 7 dias e 1.363 mg kg⁻¹ para 150 dias.

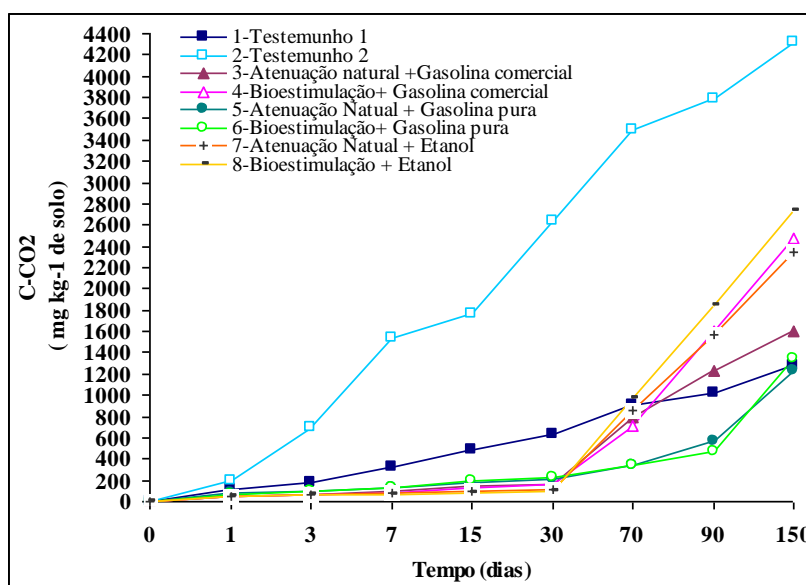


Figura 7.4 Concentrações de C-CO₂ produzidos pelos micro-organismos dos solos em diferentes tratamentos em função do tempo.

Neste experimento os micro-organismos provavelmente degradaram mais a glicose, que é uma fonte mais assimilável de carbono em relação às demais fontes utilizadas, o que justifica que o testemunho 2 tenha liberado mais CO₂ do que os demais tratamentos com e sem combustível. Conforme a literatura os micro-organismos degradam rapidamente as fontes de carbono mais assimiláveis (RODELLA *et al.*, 1983; PRATA *et al.*, 2001, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), como a glicose. Além disso, observa-se que todos os tratamentos com combustível apresentaram menor liberação de CO₂ que o testemunhos 2, devido, provavelmente, a microbiota nativa do solo ter sofrido maior impacto com a presença destes combustíveis.

A microbiota do solo começa a reagir e a se adaptar com a presença de certos combustíveis, como etanol e gasolina comercial, depois de 30 dias. Esta começou a liberar

mais CO₂, provavelmente devido à maior adaptação da microbiota do solo aos combustíveis gasolina comercial e etanol. E, provavelmente devido a existência do composto etanol nestes combustíveis, que é facilmente degradado por ser hidrofílico. Outra justificativa para o aumento do CO₂ pode ser devido à mineralização da biomassa morta.

Nos períodos de 70 e 150 dias nota-se maior atividade microbiana por parte dos tratamentos com o combustível etanol e gasolina comercial. Isto ocorreu provavelmente por ser o etanol hidrofílico e facilmente degradado. No caso da gasolina comercial (SILVA, 2002; SOARES, 2006), a presença de elevadas concentrações de etanol tendem a aumentar a solubilidade dos hidrocarbonetos existentes no meio, pelo efeito da co-solvência (CORDAZZO, 2000; HUNT & ALVAREZ, 2002; SILVA, 2002; MARIANO, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2004; SOARES, 2006, MORAES, 2008), e assim torná-los mais biodisponíveis a microbiota do meio. Também, segundo a literatura, devido o etanol apresentar enzimas degradativas mais facilmente do que os hidrocarbonetos (RICE, 2000) e apresentar-se na maioria das rotas metabólicas estando presente naturalmente no meio (ALVAREZ *et al.*, 2002), é mais facilmente degradado. Os solos com etanol na presença ou não de glicose, no período de 70 a 150 dias, apresentaram produção de CO₂ maior do que o testemunho 1. Nos períodos de 90 a 150 dias, o solo com gasolina comercial pelos processos de atenuação natural e bioestimulação, geraram maior liberação de CO₂, em relação ao testemunho 1.

Observa-se também, que houve maior liberação de CO₂, nos processos de bioestimulação (1% de glicose) com gasolina comercial, em relação ao processo de atenuação natural, do período de 30 a 150 dias. Isto se deu provavelmente devido a presença de 1% de glicose que é uma fonte de carbono prontamente biodegradável e pode favorecer a biodegradação de contaminantes no meio (KIM *et al.*, 2002; BOULD *et al.*, 2003; SABATÉ *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007). Entretanto, neste experimento a glicose parece não ter favorecido a maior degradação e nem afetado a degradação dos hidrocarbonetos dos combustíveis. A glicose pode ter sido degradada preferencialmente em relação aos hidrocarbonetos, visto que os compostos BTX não apresentaram redução significativa na presença desta fonte de carbono, no sistema fechado. Já a liberação de CO₂ dos tratamentos com etanol parece não ter sido afetada pela presença da glicose.

Nos solos contaminados com gasolina pura em ambos os processos avaliados, nos períodos de 3 a 150 dias, observam-se atividade microbiana significativamente menor do que o testemunho 1; exceto no processo de bioestimulação que houve liberação de CO₂ de 1,9%, a mais do que o testemunho 1, aos 150 dias. Em geral foi baixa a produção de CO₂ nos

tratamentos com gasolina pura, provavelmente devido ao maior impacto deste combustível á microbiota nativa, nas condições estudadas.

Os resultados da biodegradação dos combustíveis nos solos pelos processos de atenuação natural e bioestimulação (com 1% de glicose) avaliados pela liberação de CO₂ (ou percentual de mineralização em relação ao testemunho 1) e pela redução do combustível de cada tratamento em 150 dias, em sistema fechado, podem ser observados na Tabela 7.4.

A Tabela 7.4 informa que segundo os dados da análise respirométrica, no final do experimento de 150 dias, os percentuais de mineralização dos tratamentos com gasolina comercial no processo de atenuação natural, e com gasolina pura em relação ao testemunho 1 foram baixos. Estes baixos percentuais podem ter ocorrido devido à elevada concentração adicionada aos solos (5%) de tais combustíveis, e porque a gasolina tem mais de 230 hidrocarbonetos em sua composição (MARCHAL, 2003). Estes hidrocarbonetos são hidrofóbicos, e, por isto podem ter menor taxa de biodegradação (RICE, 2000; ALVAREZ & HUNT, 2002), sendo mais tóxicos e gerando maior impacto a microbiota nativa.

Tabela 7. 4 Avaliação da biodegradação do combustível 5% m/m (50.000 mg kg⁻¹) no solo, nos dois processos estudados, em relação: a concentração de CO₂ liberado, ao percentual de mineralização (em relação ao testemunho 1) e a redução dos compostos TPH ou do composto etanol, de cada combustível no respectivo processo, em 150 dias.

5 % de combustível	Processo	Concentração 5% de Combustível no solo	Biodegradação do combustível no solo		
			Liberação de CO ₂		Redução (%) Total (TPH ou etanol)
			C-CO ₂ (mg kg ⁻¹)	Mineralização %	
Etanol	Atenuação Natural	50.000 (mg kg ⁻¹ solo)	2.313	41,1	100
Gasolina Comercial			1.403	2,9	99,8
Gasolina Pura			1.198	- 12,1	99,6
Etanol	Bioestimulação (1% de Glicose)	50.000 (mg kg ⁻¹ solo)	2.755	50,5	100
Gasolina Comercial			2.696	49,4	99,1
Gasolina Pura			1.394	1,9	98,5

OBS: C-CO₂ testemunho 1 (solo) 1.363 mg kg⁻¹ e testemunho 2 (solo + 1% de glicose) 4.464 mg kg⁻¹.

Este impacto a microbiota nativa do solo, também ocorreu nos testes de Labud *et al.* (2007) com biodegradação de 5 ou 10 % de combustível (gasolina pura, diesel, petróleo) em 2

tipos de solo (arenoso e argiloso), onde a liberação de CO₂ destas amostras foi menor que o testemunho (solo) em todos os testes. Além disso, no solo arenoso o efeito inibitório foi maior (em torno de 70%) do que no solo argiloso (50%) avaliado pela liberação de CO₂, em 180 dias. Estes autores observaram que, aos 180 dias, houve um decréscimo na atividade microbiana do solo arenoso com os combustíveis na seguinte ordem: petróleo 10% > petróleo 5% > diesel 10% > gasolina 10% = gasolina 5%. Em função da maior ou menor concentração de certos compostos, o resíduo degrada mais ou menos rapidamente. Tanto que nos testes de avaliação da biodegradabilidade de matérias orgânicas, no solo, pela liberação de CO₂ foi verificado que os substratos primários (como a glicose) foram decompostos rapidamente. Já para as macromoléculas mais complexas, como os hidrocarbonetos das gasolinas deste experimento, o mesmo não foi observado (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Pela Tabela 7.4 verifica-se que para o combustível etanol, o percentual de mineralização do etanol no processo de atenuação natural foi de 41,1%, logo inferior ao de bioestimulação com este combustível (50,5%). E, o % de liberação de CO₂ nos dois processos para o combustível etanol não teve mesma variação, apresentando somente uma pequena diferença, apesar de a glicose ser uma fonte prontamente degradável. Pelos dados obtidos, pode-se inferir que, o que mais degradou foi o etanol, em ambos os processos estudados, visto que também é facilmente assimilável. Isto foi confirmado pela redução (100%) do etanol tanto no processo de atenuação natural como o de bioestimulação (100%) com o combustível etanol, concordando com os dados da literatura (CETESB, 1990; ATLAS & BARTHA, 1998).

No processo de bioestimulação, com gasolina comercial, este combustível parece ter sido mais mineralizado (49,4%), pois apresentou maior valor de mineralização do que no de atenuação natural (2,9%). Pode-se verificar que tal fato não desfavoreceu a redução dos compostos TPH da gasolina comercial nas condições estudadas, bioestimulação e atenuação natural, cujos % de redução foram de 99,8 e 99,1%, respectivamente. Isto pode ter ocorrido porque a glicose que é fonte facilmente assimilada foi provavelmente mais degradada do que os compostos da gasolina comercial (com 24 % de etanol), no processo de bioestimulação. Entretanto, o mesmo comportamento não ocorreu com a gasolina pura, no processo de bioestimulação em relação a mineralização, no sistema fechado e nas condições estudadas.

No testemunho 2, a glicose foi bem mineralizada, em torno de 69,5%, aos 150 dias em relação ao testemunho 1. Pela elevada mineralização pode se constatar que somente este tratamento concorda com a literatura, que informa que 65% do carbono, no solo, é utilizado para a produção de energia pela liberação de CO₂ e 35% do carbono pode ser utilizado nas rotas metabólicas para a produção de biomassa (SYLVIA et al., 1999), indicando que a

glicose pode ter sido totalmente degradada no testemunho 2, nas condições estudadas. O sucesso da biodegradação é dependente do nível metabólico e da adaptação genética da população microbiana do ambiente (CHANG & DEVINNY, 2000) e ao poluente. O sucesso da biodegradação ocorreu mais acentuadamente no testemunho 2 e nos tratamentos com o combustível etanol devido as fontes de carbono presentes nestes, serem prontamente biodegradáveis, como a glicose e o etanol, no solo. Além disso, estas fontes fazem parte das rotas metabólicas e não apresentam grande toxicidade. Entretanto, as fontes de carbono como gasolina comercial e pura, no solo, com e sem glicose não apresentaram tal sucesso, pelos dados informados na tabela acima. Estas fontes de gasolinas não apresentaram grande sucesso na mineralização, provavelmente por ter mais compostos hidrofóbicos (CORSEUIL *et al.*, 1998; RICE, 2000; ALVAREZ & HUNT, 2002) em sua composição. Os compostos das gasolinas estudadas foram degradados (ou volatilizaram), mas com baixas liberações de CO₂. Isto pode ter ocorrido devido aos compostos das gasolinas apresentarem-se mais tóxicos e inibitórios a microbiota do solo, em relação ao combustível etanol, nas condições estudadas. Além disso, os compostos orgânicos dos hidrocarbonetos de petróleo como os BTX, tendem a ficar sorvidos na matriz do solo, diminuindo sua disponibilidade aos micro-organismos, limitando assim sua degradação (RIZZO, 2001).

7.2.3 Análise biológica de heterotróficos no sistema fechado

Na Tabela 7.5 podem ser visualizados os resultados da faixa de número mais provável (NMP) de micro-organismos heterotróficos totais existentes nas amostras de solo dos tratamentos, nos períodos de coleta, de 0 e 150 dias.

Pelos dados da **Tabela 7.5** verifica-se que não houve um aumento significativo do NMP de heterotróficos entre os tratamentos estudados, nos períodos de zero e 150 dias.

Tabela 7. 5 Estimativa do NMP (número mais provável) de micro-organismos heterotróficos totais nas amostras de solo dos tratamentos, em sistema fechado, na profundidade de 1 cm, nos períodos de 0 e 150 dias.

Estimativa do NMP de micro-organismos heterotróficos, das amostras de solo de cada tratamento (processo ou testemunho), em sistema fechado, nos períodos de 0 e 150 dias.								
Solo	T	Processos: Atenuação natural e Bioestimulação com combustível: (log. g ⁻¹ de solo)			T	Testemunhos (solo sem combustível) (log. g ⁻¹ de solo)		
		Gasolina comercial	Gasolina pura	Etanol				
1-Solo	0	AN	6,47	5,24	5,46	0	1	5,97
	150		6,15	6,62	6,39	150		6,82
2-Solo + 1% glicose	0	BIE	6,21	6,18	5,15	0	2	6,75
	150		6,49	6,41	6,26	150		5,67

T= Tempo em dias, AN = Atenuação natural, BIE = Bioestimulação.

7.2.4 Análise biológica de degradadores

Na Tabela 7.6 pode-se visualizar os resultados da estimativa de número mais provável (NMP) de micro-organismos degradadores nas amostras de solo dos tratamentos, no período de 0 e 150 dias, respectivamente.

Na Tabela 7.6 observa-se que houve variações nos valores do NMP de degradadores entre os tratamentos, no período de tempo de zero e 150 dias. Estas variações ocorreram principalmente, no solo dos dois testemunhos 1 e 2 com gasolina pura e etanol, no tempo zero. As variações observadas podem indicar mudança na biodiversidade da microbiota, com a predominância de organismos hidrocarbonoclasticos (BENTO *et al.*, 2005). Segundo Mariano (2006), a biomassa microbiana total ativa pode diferir na composição de espécies e em regimes metabólicos.

Tabela 7.6 Estimativa do NMP (número mais provável) de micro-organismos degradadores existentes nas amostras de solo (com e sem combustíveis) dos tratamentos, na profundidade de 1 cm, no período de 0 e 150 dias.

Estimativa do NMP de micro-organismos degradadores das amostras de cada tratamento (processo ou testemunho), em sistema fechado, nos períodos de 0 e 150 dias.										
Solo	T	Processos: Atenuação natural e Bioestimulação com combustível (log. g⁻¹ de solo) Na análise adicionar igual combustível.			T		Testemunhos (solo sem combustível) (log. g⁻¹ de solo) Na análise adicionar combustível.			
		Gasolina comercial	Gasolina pura	Etanol			Gasolina comercial	Gasolina pura	Etanol	
1-Solo	0	AN	4,23	4,19	4,01	0	1	3,70	2,20	2,40
	150		3,53	4,23	3,85	150		4,30	4,46	3,01
2-Solo + 1% glicose	0	BIE	4,16	4,35	3,46	0	2	3,56	2,30	2,20
	150		3,40	3,70	3,72	150		3,90	4,11	4,30

T= Tempo em dias, AN = Atenuação natural, BIE = Bioestimulação.

7.2.5 Análises dos teores de umidade e do pH no sistema fechado

Pela Figura 7.4 e Tabela 7.7 pode-se visualizar os valores dos teores de umidade e do pH nas amostras de solo dos tratamentos, nos períodos avaliados.

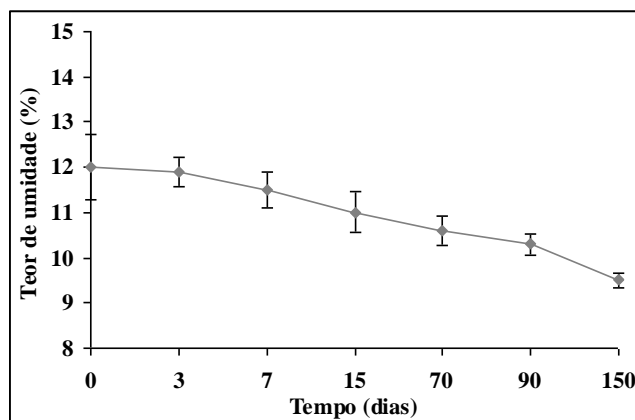


Figura 7.5 Teores de umidade do solo (testemunho 1) em função do tempo.

Pela Figura 7.4 observa-se que no sistema fechado o teor de umidade do solo inicial foi de 12%, decrescendo ao longo do tempo (9,5% aos 150 dias), devido à temperatura média de 25 à 30°, no ambiente do laboratório, onde foi realizado o experimento. Segundo Shewfelt *et al.* (2005), teores de umidade entre 9% ou menos podem não favorecer a degradação e de 18 a 12%, tendem a favorecer a degradação. Além disso, o teor de água no solo influencia quali e quantitativamente a atividade dos micro-organismos, por determinar a atividade das populações microbianas e o tipo de metabolismo (aeróbio, micro aeróbio ou anaeróbio) dominante num determinado local (ALEXANDER, 1999). Estudos demonstram que a biodegradação de hidrocarbonetos, na ausência de oxigênio, utiliza outros aceptores finais de elétrons (como íons: NO^{3-} , SO_4^{2-}), mas em níveis substancialmente mais baixos, em relação a biodegradação em condições aeróbias (CHEN & TAYLOR, 1997; BHUPATHIRAJU *et al.*, 2002; BOTTON & PARSON, 2007; SIDDIQUE *et al.*, 2007). Os solos com baixos teores de umidade reduzem o crescimento e a sobrevivência dos micro-organismos e, consequentemente a degradação do poluente no solo (SHEWFELT *et al.*, 2005).

Os valores de pH das amostras de solo contaminados com os combustíveis em relação aos processos de biorremediação, em função do tempo podem ser observadas na Tabela 7.7.

Na Tabela 7.7 nota-se que não houve um aumento significativo nos valores de pH dos tratamentos em sistema fechado, no período de tempo de 0 e 150 dias. O valor do pH dos solos (testemunhos), nestes experimentos, não foram corrigidos para neutralidade, sendo os mesmos mantidos. Pode-se verificar pela Tabela 7.7 que o pH das amostras dos testemunhos em relação aos solos contaminados com cada combustível nos processos estudados, não apresentaram variação significativa, fato que pode ser atribuído ao efeito tamponante que o

solo pode apresentar (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O pH afeta significativamente as taxas de biodegradação, pois determina o tipo de micro-organismo, que participará na degradação dos compostos orgânicos, mas devido ao efeito tamponante isto pode não ter ocorrido.

Tabela 7. 7 Valor médio de pH da amostra de solo de cada tratamento em sistema fechado, nos períodos de zero e 150 dias.

Tempo (dias)	Valores médios de pH da amostra de cada tratamento em sistema fechado, no período 0 e 150 dias						
	Solo	Processos com combustível				Testemunhos	
		Processos	Gasolina comercial	Gasolina pura	Etanol	Solo	
0	1-Solo	Atenuação Natural	5,0	5,0	5,0	1	5,1
150			5,3	5,3	5,1		5,2
0	2- Solo + 1% glicose	Bioestimulação	4,9	4,9	4,9	2	4,8
150			4,3	4,6	4,2		5,1

7.2.6 Análises químicas por cromatografia no sistema aberto

As concentrações dos compostos BTX e C9+, no solo, com 5% de gasolina comercial ou gasolina pura em processos de atenuação natural e bioestimulação (1% de glicose), foram verificadas na profundidade de 1 cm (Tabela 7.8) e 50 cm (Tabela 7.9) em função do tempo e nas três profundidades (1, 50 e 100 cm), nos período de zero e 150 dias na Tabela 7.10.

Tabela 7. 8 Concentrações do composto BTX e C9+ em solo com gasolina comercial (ou pura) na profundidade de 1 cm, nos processos de atenuação natural e bioestimulação em função do tempo.

Concentração dos Compostos da Gasolina Comercial no Solo (mg.kg⁻¹)												
Compostos	Tratamentos /Dias											
	Atenuação Natural						Bioestimulação (Glicose 1%)					
	0*	7	15	70	90	150	0*	7	15	70	90	150
1. Benzeno	345 ± 38	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	504 ± 46	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
2. Tolueno	556 ± 37	6 ± 3	9 ± 3	4 ± 1	2 ± 1	1 ± 0	681 ± 9	4 ± 1	5 ± 2	5 ± 1	2 ± 0	1 ± 0
3. Xilenos Totais	440 ± 41	11 ± 6	15 ± 5	11 ± 3	7 ± 2	5 ± 2	449 ± 7	8 ± 2	8 ± 1	12 ± 3	4 ± 0	4 ± 1
4. C9+	1128 ± 273	47 ± 19	63 ± 18	85 ± 16	59 ± 14	41 ± 11	1056 ± 96	39 ± 11	37 ± 4	86 ± 35	28 ± 6	37 ± 13

Concentração dos Compostos da Gasolina Pura no Solo (mg.kg⁻¹)												
Compostos	Tratamentos /Dias											
	0% Glicose - Atenuação Natural						1% Glicose - Bioestimulação					
	0*	7	15	70	90	150	0*	7	15	70	90	150
1. Benzeno	121 ± 8	68 ± 44	2 ± 1	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	102 ± 18	72 ± 53	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
2. Tolueno	210 ± 17	96 ± 27	8 ± 3	4 ± 1	2 ± 0	1 ± 0	199 ± 56	101 ± 52	4 ± 2	2 ± 2	2 ± 1	1 ± 0
3. Xilenos Totais	291 ± 28	77 ± 29	15 ± 4	11 ± 2	7 ± 1	3 ± 1	277 ± 55	70 ± 32	8 ± 4	6 ± 3	5 ± 2	4 ± 1
4. C9+	1104 ± 100	255 ± 152	105 ± 52	78 ± 20	54 ± 10	32 ± 13	1126 ± 59	215 ± 136	54 ± 36	51 ± 30	41 ± 12	26 ± 8

Obs: * coleta 1 hora após a montagem dos experimentos.

Tabela 7. 9 Concentrações do composto BTX e C9+ em solo com gasolina comercial (ou pura) na profundidade de 50 cm, nos processos de atenuação natural e bioestimulação em função do tempo.

Concentração dos compostos da Gasolina Comercial no Solo (mg.kg⁻¹)												
Compostos	Tratamentos /Dias											
	Atenuação Natural						Bioestimulação (Glicose 1%)					
	0*	7	15	70	90	150	0*	7	15	70	90	150
1. Benzeno	0 ± 0	24 ± 26	17 ± 21	2 ± 0	0,37 ± 0	0 ± 0	233 ± 233	55 ± 48	36 ± 24	12 ± 6	4 ± 4	0 ± 0
2. Tolueno	0 ± 0	39 ± 39	28 ± 31	21 ± 14	11 ± 9	1 ± 1	255 ± 270	85 ± 63	70 ± 39	34 ± 14	22 ± 20	3 ± 2
3. Xilenos Totais	0 ± 0	39 ± 32	36 ± 34	48 ± 20	32 ± 25	15 ± 3	199 ± 188	78 ± 53	70 ± 30	60 ± 22	36 ± 24	18 ± 6
4. C9+	0 ± 0	116 ± 95	149 ± 129	257 ± 58	185 ± 103	177 ± 65	606 ± 537	279 ± 219	247 ± 127	284 ± 87	209 ± 104	135 ± 34

Concentração dos Compostos da Gasolina Pura no Solo (mg.kg⁻¹)												
Compostos	Tratamentos /Dias											
	Atenuação Natural						Bioestimulação (Glicose 1%)					
	0*	7	15	70	90	150	0*	7	15	70	90	150
1. Benzeno	307 ± 209	68 ± 44	76 ± 25	37 ± 22	40 ± 33	7 ± 7	305 ± 192	71 ± 53,08	62 ± 29	22 ± 33	20 ± 34	8 ± 13
2. Tolueno	343 ± 224	96 ± 28	109 ± 27	143 ± 68	168 ± 117	65 ± 53	380 ± 186	101 ± 70	103 ± 34	99 ± 103	70 ± 114	56 ± 63
3. Xilenos Totais	247 ± 160	77 ± 30	91 ± 10	177 ± 53	201 ± 116	151 ± 92	300 ± 93	70 ± 32	79 ± 18	114 ± 89	76 ± 109	118 ± 93
4. C9+	800 ± 530	256 ± 154	354 ± 70	883 ± 157	869 ± 477	946 ± 583	1075 ± 134	214 ± 136	272 ± 88	472 ± 350	309 ± 361	640 ± 402

Obs: * coleta 1 hora após a montagem dos experimentos.

Tabela 7. 10 Concentrações do composto BTX e C9+ em solo com gasolina comercial (ou pura) nas profundidades de 1, 50 e 100 cm e em todas as profundidades do tubo (1 a 100 cm), nos processos de atenuação natural e bioestimulação, nos tempos zero e 150 dias.

Concentração dos compostos da Gasolina Comercial no Solo em mg.kg ⁻¹ ou (%)										
Tratamentos / Compostos										
Atenuação Natural										
Bioestimulação (Glicose 1%)										
Profundidade	Dias	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9+	Dias	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9+
1 cm	0*	345 ± 38	556 ± 37	440 ± 41	1128 ± 73	0*	504 ± 46	681 ± 9	449 ± 7	1056 ± 96
50 cm		0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0		233 ± 233	255 ± 270	199 ± 188	606 ± 537
100 cm		nd	nd	nd	nd		nd	nd	nd	nd
Total (1 a 100cm)		345 (0%)	556 (0%)	440 (0%)	1128 (0%)		737 (0%)	936 (0%)	658 (0%)	1662 (0%)
1 cm	150	0 ± 0	1 ± 0 (0,2%)	5 ± 2 (1,1%)	41 ± 11 (3,6%)	150	0 ± 0	1 ± 0 (0,1%)	4 ± 1 (0,6%)	37 ± 13 (2,3%)
50 cm		0 ± 0	1 ± 1 (0,2%)	15 ± 3 (3,4%)	177 ± 5 (15,7%)		0 ± 0	3 ± 2 (0,3%)	18 ± 6 (2,7%)	135 ± 34 (8,1%)
100 cm		0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0 (0,2%)	13 ± 3 (1,2%)		0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0 (0,1%)	10 ± 2 (0,6%)
Total ou % renascente (Redução em %) de 1 a 100cm		0 (100,0%)	2 ou 0,4% (99,6%)	20 ou 4,7% (95,5%)	231 ou 20,5% (79,5%)		0 (100,0%)	4 ou 0,4% (99,6%)	23 ou 3,5% (99,5%)	182 ou 10,05% (89,05%)

Concentração dos compostos da Gasolina Pura no Solo em mg.kg ⁻¹ ou (%)										
Tratamentos / Compostos										
Atenuação Natural										
Bioestimulação (Glicose 1%)										
Profundidade	Dias	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9+	Dias	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9+
1 cm	0*	121 ± 8	210 ± 17 (0%)	291 ± 28 (0%)	1104 ± 100 (0%)	0*	102 ± 18	199 ± 56	277 ± 55	1126 ± 59
50 cm		307 ± 209	343 ± 224	247 ± 160	800 ± 530		305 ± 192	380 ± 186	300 ± 93	1075 ± 134
100 cm		nd	nd	nd	nd		nd	nd	nd	nd
Total (1 a 100cm)		428 (0%)	553 (0%)	446 (0%)	1904 (0%)		407 (0%)	579 (0%)	577 (0%)	2201 (0%)
1 cm	150	0 ± 0	1 ± 0 (0,2%)	3 ± 1 (0,7%)	32 ± 13 (1,68%)	150	0 ± 0	1 ± 0 (0,2%)	4 ± 1 (0,69%)	26 ± 8 (1,2%)
50 cm		7 ± 7 (1,6%)	65 ± 53 (11,8%)	151 ± 92 (33,9%)	946 ± 583 (49,7%)		8 ± 13 (2,0%)	56 ± 63 (9,8%)	118 ± 93 (20,5%)	640 ± 402 (29,1%)
100 cm		26 ± 26 (6,1%)	141 ± 126 (25,5%)	144 ± 129 (32,3%)	571 ± 537 (30,0%)		25 ± 42 (6,1%)	93 ± 160 (16,1%)	81 ± 138 (14,0%)	324 ± 525 (14,7%)
Total ou % renascente (Redução em %) de 1 a 100cm		33 ou 7,7% (92,3%)	207 ou 37,5% (62,5%)	298 ou 66,8% (33,2%)	1549 ou 81,4% (18,6%)		33 ou 8,1% (91,9%)	145 ou 26,1% (73,9%)	202 ou 35,0% (65,0%)	990 ou 45,0% (55,0%)

Obs: *coleta 1 hora após a montagem dos experimentos. nd significa não detectado.

Pelos resultados apresentados nas Tabelas acima, se verifica que os compostos avaliados apresentaram diferenças de comportamento, no solo, em relação o tipo de gasolina utilizada, tanto que os compostos BTX da gasolina comercial, no solo, obtiveram menores concentrações ao longo do tempo em ambos os processos e nas três profundidades estudadas, em relação à gasolina pura. Entretanto, considerando que a única diferença entre as gasolinas estudadas é a presença de etanol na gasolina comercial, pode-se induzir que o etanol devido ao efeito co-solvência (CORDAZZO, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2004; SOARES, 2006), tenha promovido a biodisponibilidade dos mesmos a microbiota. Tal comportamento pode ser verificado, uma vez que os compostos BTX da gasolina comercial apresentaram nos dois processos, concentrações abaixo dos valores orientadores de interdição ambiental (CETESB, 2005) em todas as profundidades (1, 50 e 100 cm), nas condições estudadas. Entretanto, a gasolina pura, no solo, nos dois processos estudados, em 150 dias, apresentou concentrações dos BTX menores que os valores de interdição ambiental somente em 1 cm de profundidade. Nas demais profundidades (50 e 100 cm), não se observaram tal comportamento, nos compostos BTX da gasolina pura, nos dois processos estudados.

Os processos de bioestimulação com glicose parecem ter favorecido a maior redução de alguns compostos da gasolina comercial, como a dos C9+ em 50 cm de profundidade e da gasolina pura como do tolueno, dos xilenos e dos C9 + nas duas profundidades (50 e 100 cm), em relação ao processo de atenuação natural, aos 150 dias, como se pode observar nas Tabelas 7.8 a 7.10 e Figuras 7.5 a 7.10. Isto sugere que a presença de 1% de glicose que é uma fonte de carbono prontamente biodegradável, pode ter favorecido a biodegradação de contaminantes no meio (KIM *et al.*, 2002; BOULD *et al.*, 2003; SABATÉ *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007), como no solo com gasolina comercial e principalmente, no solo, com gasolina pura, aos 150 dias. Conforme a literatura os micro-organismos biodegradam rapidamente as fontes de carbono mais assimiláveis (RODELLA *et al.*, 1983; PRATA *et al.*, 2001, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), como a glicose e 35% do carbono, pode ser utilizado nas rotas metabólicas para a produção de biomassa (SYLVIA *et al.*, 1999).

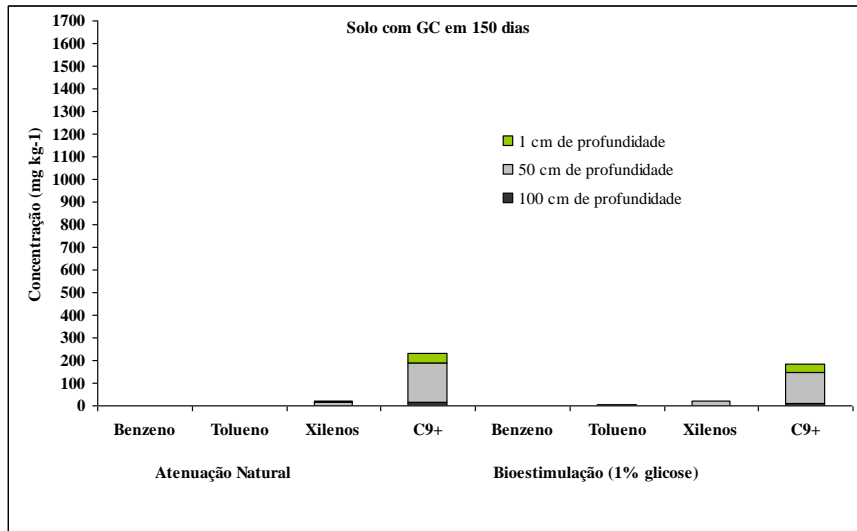


Figura 7.6 Concentrações dos compostos (benzeno, tolueno, xilenos e C9+) da gasolina comercial (GC) avaliada, em solo, pelos processos de atenuação natural e bioestimulação (1% de glicose), em diferentes profundidades, em 150 dias.

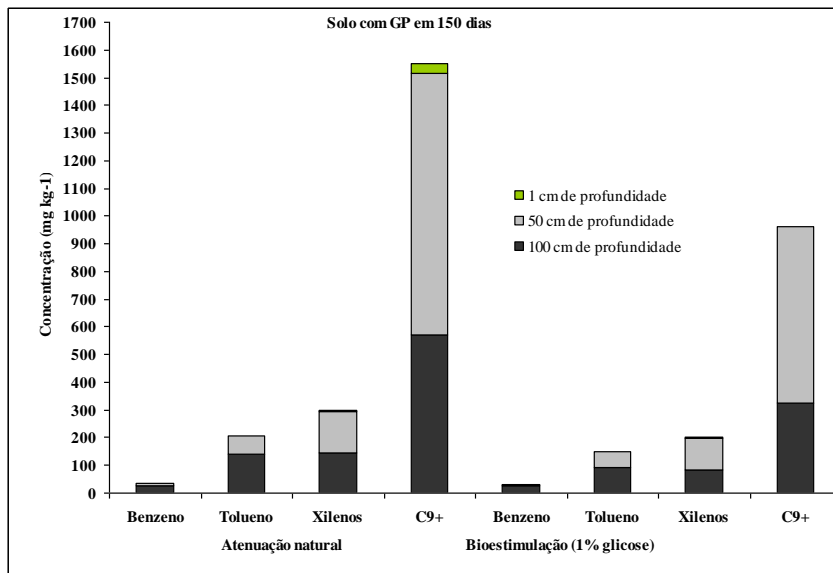


Figura 7.7 Concentrações dos compostos (benzeno, tolueno, xilenos e C9+) da gasolina pura (GP) avaliada, em solo, pelos processos de atenuação natural e bioestimulação (1% de glicose), em diferentes profundidades, em 150 dias.

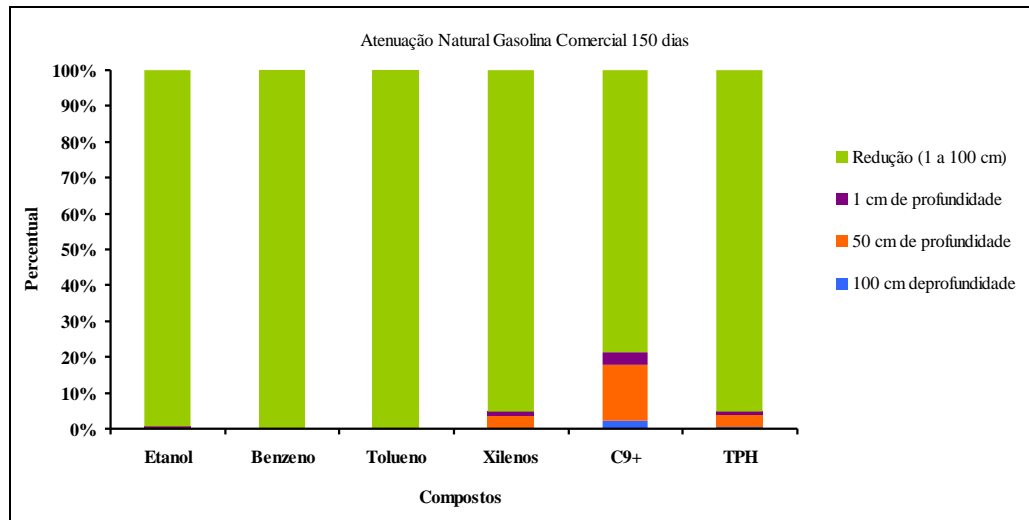


Figura 7.8 Percentual (na profundidade 1, 50 e 100 cm, ou de redução de 1 a 100 cm) de cada composto (etanol, benzeno, tolueno, xilenos, C9+ e TPH) da gasolina comercial avaliada, em solo, pelo processo de atenuação natural, em 150 dias.

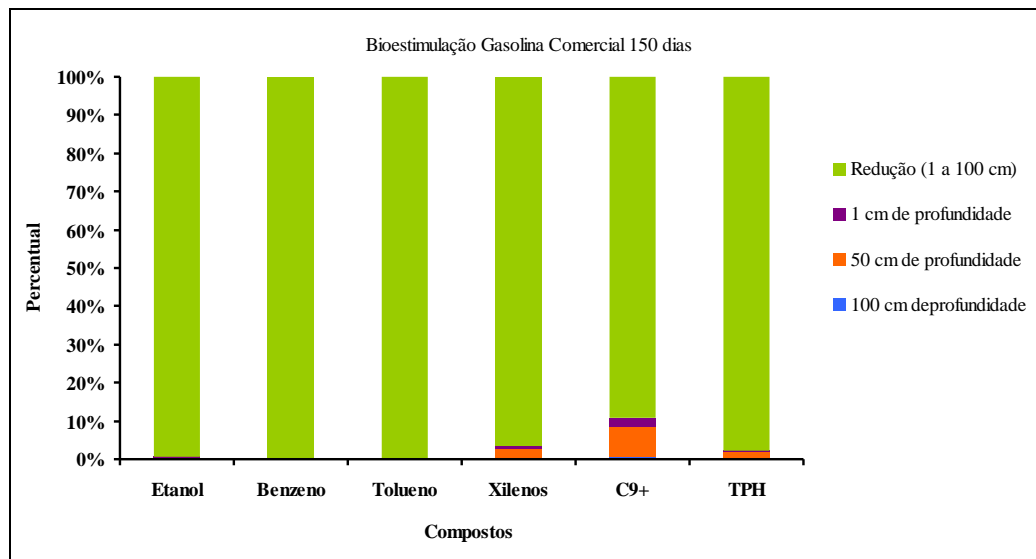


Figura 7.9 Percentual (na profundidade 1, 50 e 100 cm, ou de redução de 1 a 100 cm) de cada composto (etanol, benzeno, tolueno, xilenos, C9+ e TPH) da gasolina comercial, avaliada, em solo, pelo processo de bioestimulação (1% glicose), em 150 dias.

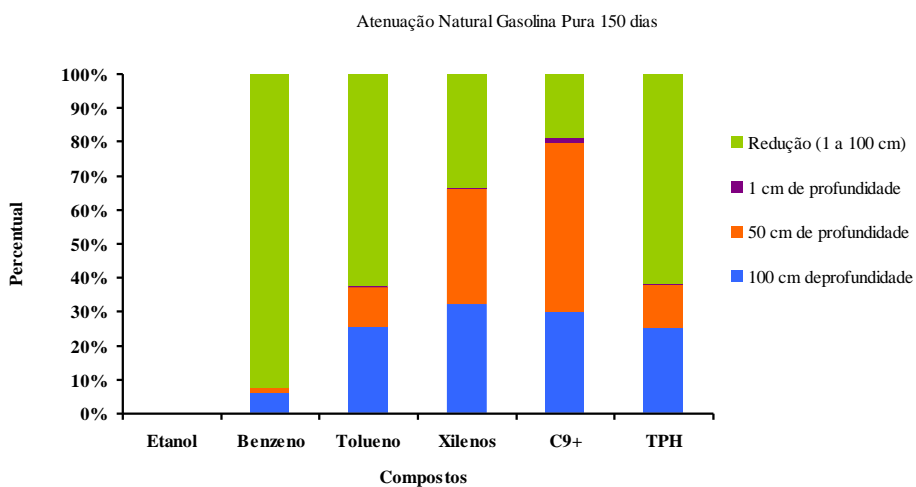


Figura 7. 10 Percentual (na profundidade 1, 50 e 100 cm, ou de redução de 1 a 100 cm) de cada composto (benzeno, tolueno, xilenos, C9+ e TPH) da gasolina pura, avaliada, em solo pelo processo de atenuação natural, em 150 dias.

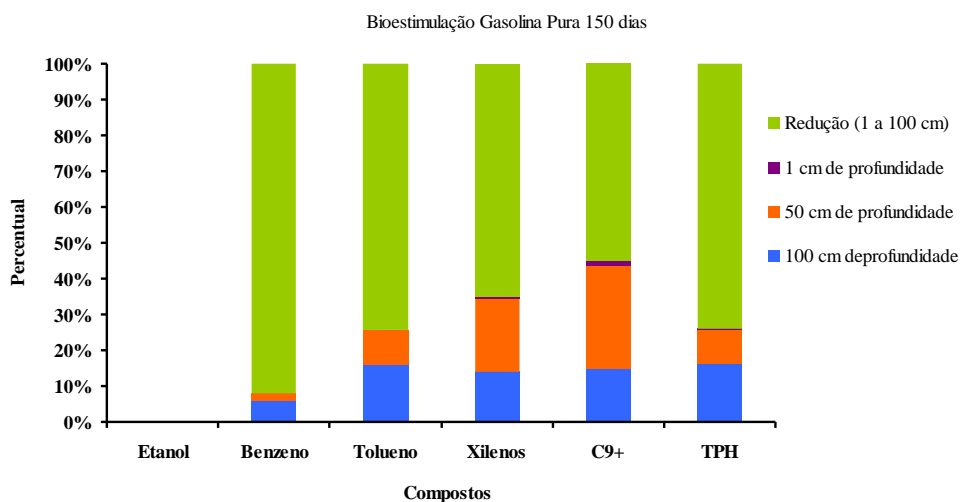


Figura 7. 11 Percentual (na profundidade 1, 50 e 100 cm, ou de redução de 1 a 100 cm) de cada composto (benzeno, tolueno, xilenos, C9+ e TPH) da gasolina pura, avaliada, em solo, pelo processo de bioestimulação (1% glicose), em 150 dias.

O percentual presente, no solo, de cada composto avaliado (etanol, benzeno, tolueno, xilenos, C9+, TPH) nos combustíveis gasolina comercial, gasolina pura e etanol, nas profundidades de 1 e 50 cm e o percentual de redução destes (no tempo avaliado em relação ao tempo zero, pode ser observado nas Figuras 7.11 até 7.14)

Pelas Figuras 7.11 e 7.14 verifica-se elevado percentual de redução do etanol, no solo, com gasolina comercial em relação aos dois processos avaliados, de até 98%, em 7 dias, na profundidade de 1 a 50 cm no tubo de PVC. Provavelmente, o elevado percentual de redução, seja devido à volatilização ou degradação, pois este experimento foi realizado no verão (início de fevereiro de 2006), até 70 dias e no outono de 70 a 150 dias, com temperaturas de 35 a 40 °C e 25 a 30°C, respectivamente. Segundo a literatura, quando a temperatura eleva-se em 10° C, na faixa de temperatura de 5 a 35°C, a velocidade de decomposição dobra (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A taxa de degradação dos BTX pode triplicar em função de um aumento de temperatura em 10°C (CORSEUIL & WEBER, 1994). A temperatura determinará, em parte, o ritmo e a quantidade total do crescimento do organismo. As variações térmicas também podem influenciar nos processos metabólicos e a morfologia celular.

Quanto à volatilização, segundo a literatura, a presença de etanol favorece volatilização dos hidrocarbonetos voláteis (SILVA, 2004) e elevadas temperaturas também geram maior volatilização ou degradação (CORSEUIL & WEBER, 1994; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), destes compostos BTX, principalmente com etanol.

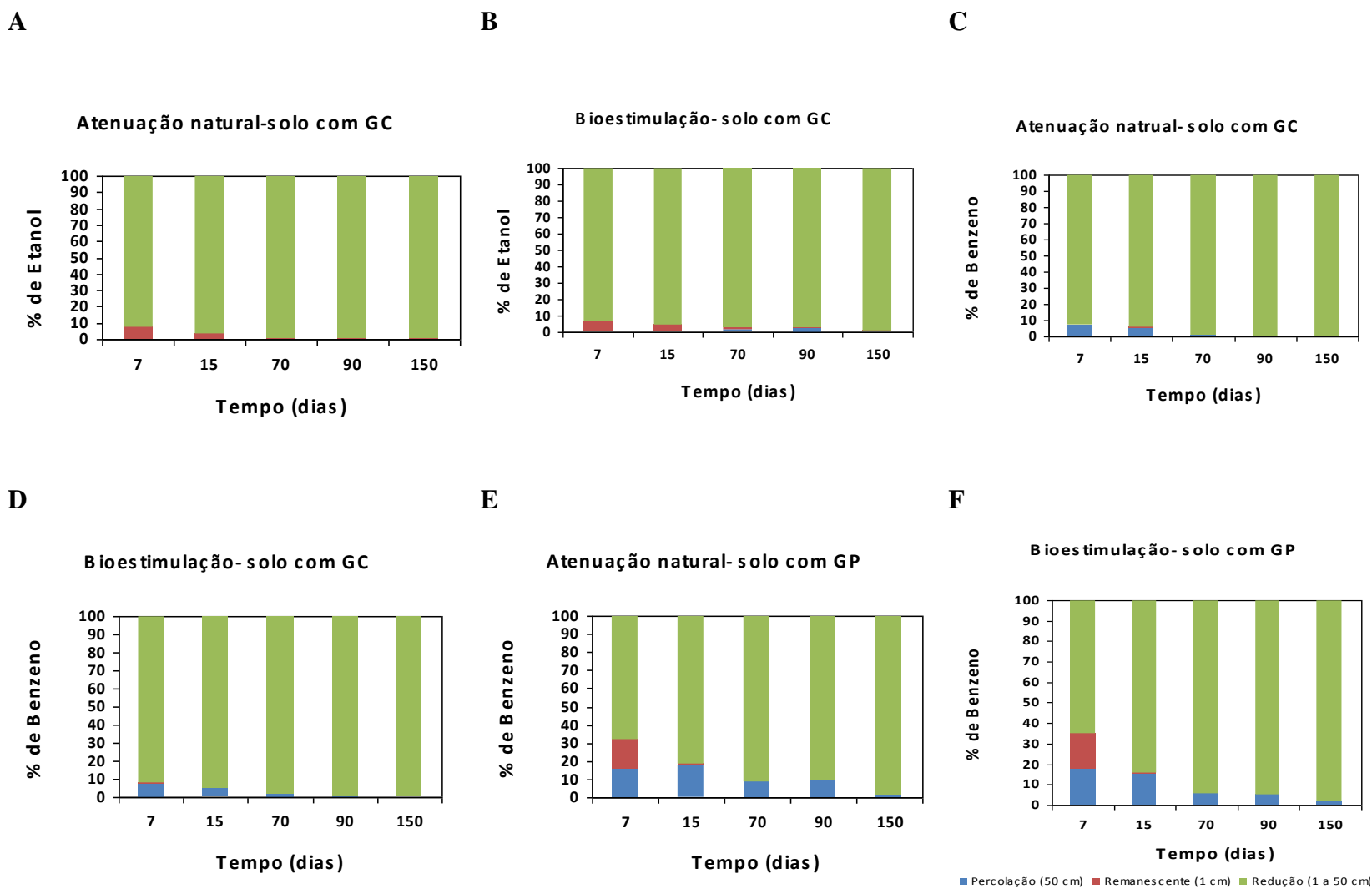


Figura 7.12 Percentual (presente em 1 cm e em 50 cm, ou reduzido de 1 a 50 cm) de cada composto (etanol, benzeno) do combustível (gasolina pura e gasolina comercial) usado no solo em dado processo (atenuação natural e bioestimulação), avaliado em função do tempo, como de: A) etanol da gasolina comercial (GC) em atenuação natural; B) etanol da gasolina comercial (GC) em bioestimulação; C) benzeno da gasolina comercial (GC) em atenuação natural; D) benzeno da gasolina comercial (GC) em bioestimulação; E) benzeno da gasolina pura (GP) em atenuação natural; F) benzeno da gasolina pura (GP) em bioestimulação.

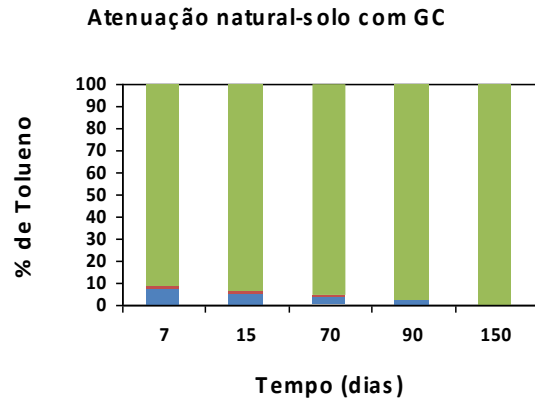
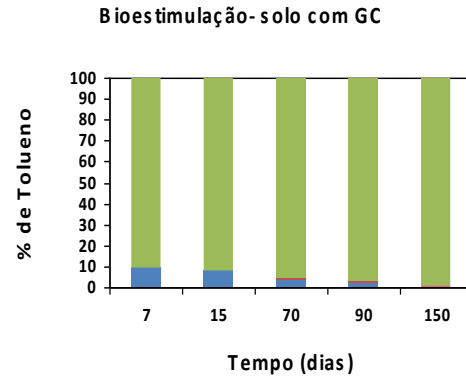
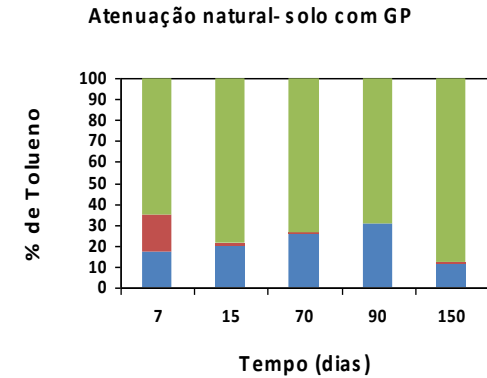
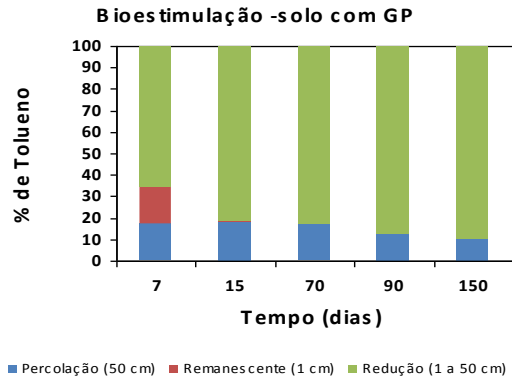
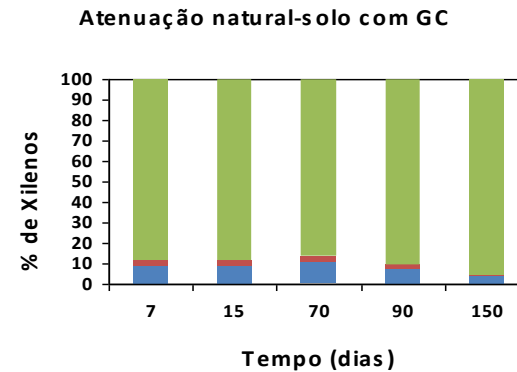
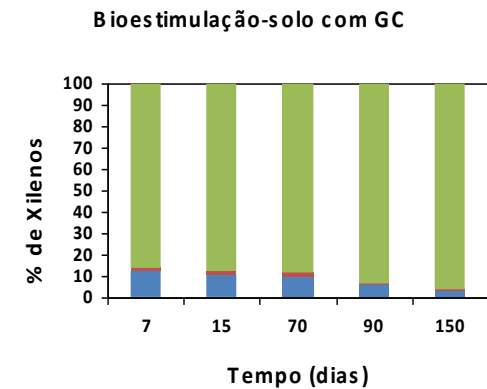
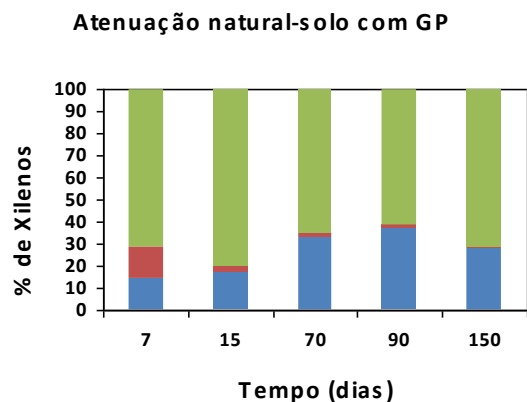
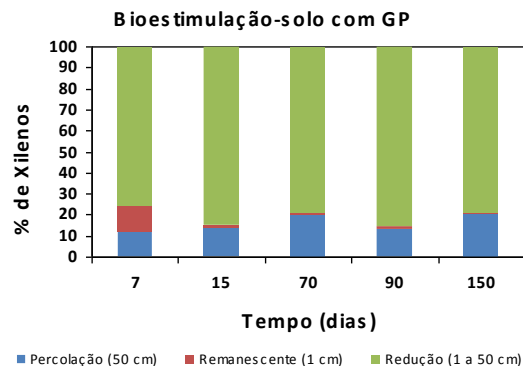
G**H****I****J****L****M**

Figura 7.13 Percentual (presente em 1 cm e em 50 cm, ou reduzido de 1 a 50 cm) de cada composto (tolueno, xilenos) do combustível (gasolina pura e gasolina comercial) usado no solo em dado processo (atenuação natural e bioestimulação), avaliado em função do tempo, como de: G) tolueno da gasolina comercial (GC) em atenuação natural; H) tolueno da gasolina comercial (GC) em bioestimulação; I) tolueno da gasolina pura (GP) em atenuação natural; J) tolueno da gasolina pura (GP) em bioestimulação; L) xilenos da gasolina comercial (GC) em atenuação natural; M) xilenos da gasolina comercial (GC) em bioestimulação.

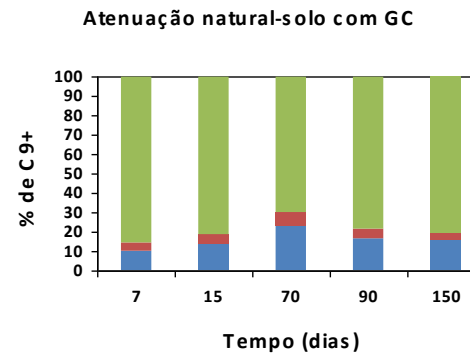
N



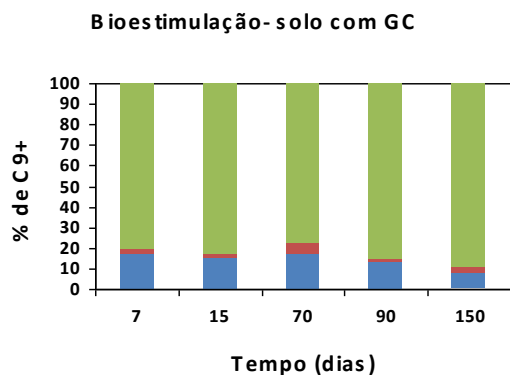
O



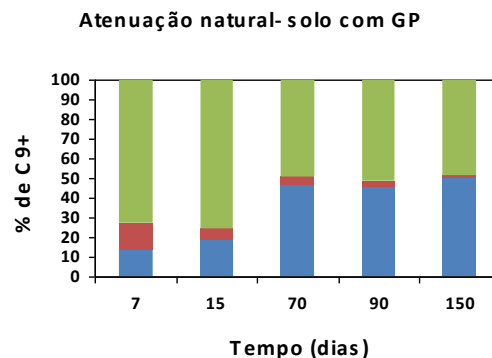
P



Q



R



S

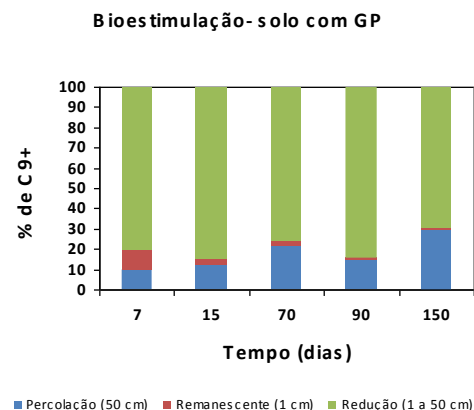
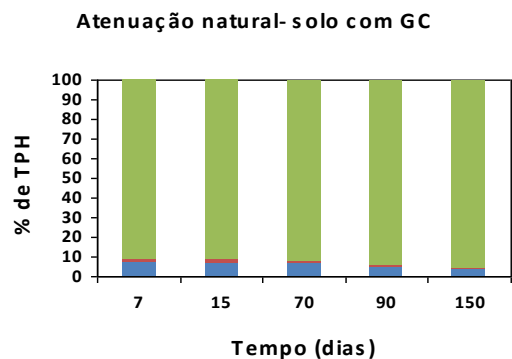
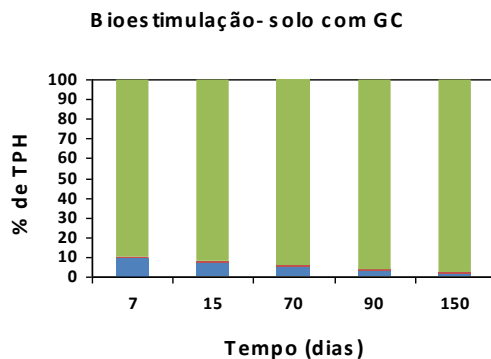


Figura 7.14 Percentual (presente em 1 cm e em 50 cm, ou reduzido de 1 a 50 cm) de cada composto (xilenos, C9+) do combustível (gasolina pura e gasolina comercial) usado no solo em dado processo (atenuação natural e bioestimulação), avaliado em função do tempo, como de: N) xilenos da gasolina pura (GP) em atenuação natural; O) xilenos da gasolina pura (GP) em bioestimulação; P) C9+ da gasolina comercial (GC) em atenuação natural; Q) C9+ da gasolina comercial (GC) em bioestimulação; R) C9+ da gasolina pura (GP) em atenuação natural; S) C9+ da gasolina pura (GP) em bioestimulação.

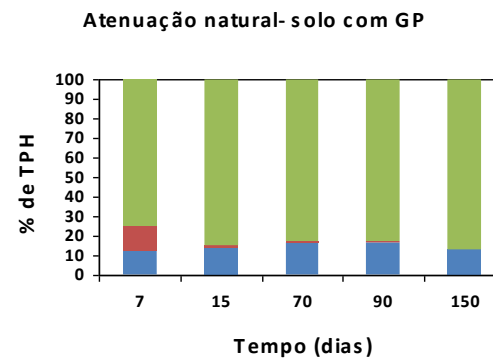
T



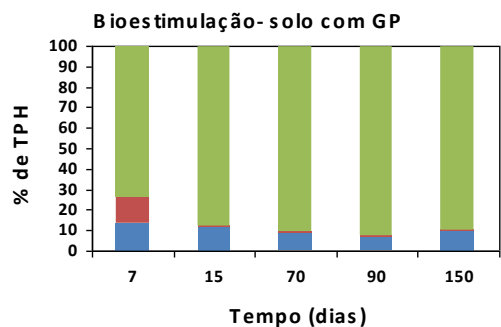
U



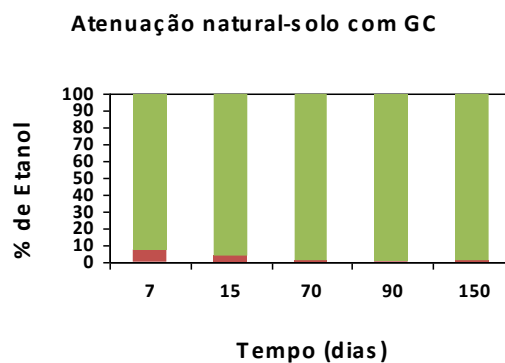
V



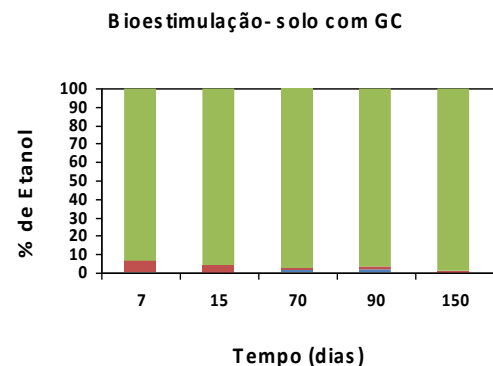
W



X



Z



■ Percolação (50 cm) ■ Remanescente (1 cm) ■ Redução (1 a 50 cm)

Figura 7.14 Percentuais (presente em 1 cm e em 50 cm, ou reduzido de 1 a 50 cm) dos composto (hidrocarbonetos totais do petróleo, TPH) do combustível (gasolina pura e gasolina comercial) usado no solo em dado processo (atenuação natural e bioestimulação), avaliados em função do tempo, como de: T) TPH da gasolina comercial (GC) em atenuação natural; U) TPH da gasolina comercial (GC) em bioestimulação; V) TPH da gasolina pura (GP) em atenuação natural; W) TPH da gasolina pura (GP) em bioestimulação; X) etanol do combustível etanol (E) em atenuação natural; Z) etanol do combustível etanol (E) em bioestimulação.

A presença de etanol em 24%, na gasolina comercial pode ter favorecido a maior degradação (ou volatilização) dos compostos BTX e C9+, em solo, com gasolina comercial nas condições estudadas. A degradação destes compostos pode ter sido auxiliada pelo etanol, pelo efeito de co-solvência (CORDAZZO, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2004; SOARES, 2006). Como os hidrocarbonetos monoaromáticos BTX da gasolina têm solubilidade limitada em água; contudo, são solúveis em etanol (álcool primário). A presença de 10% de etanol na gasolina aumenta a solubilidade do benzeno, tolueno, orto-xileno em água de 20%, 40% e 50%, respectivamente (PENNER, 2000). Logo o etanol na gasolina tende a solubilizar mais estes compostos, e pode tornar os mesmos mais biodisponíveis a microbiota do solo, e acelerado a redução deste.

Quanto à volatilização, segundo a literatura, a presença de etanol em 20 a 26% na gasolina favorece em 10% a volatilização dos hidrocarbonetos voláteis (SILVA, 2004). Em elevadas temperaturas, principalmente na estação do ano, verão, pode ter havido maior volatilização ou degradação (COUSEUIL & WEBER, 1994; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006) destes compostos BTX com etanol e também do próprio etanol.

A glicose, na ausência do etanol, no solo, com gasolina pura, pelo processo de bioestimulação, parece ter auxiliado a maior redução do composto tolueno, xilenos, C9+ e TPH nas duas profundidades (50 e 100 cm), em relação ao processo de atenuação natural Figuras 7.9 e 7.10. Tal fato concorda com a literatura, que informa que a glicose que é uma fonte de carbono prontamente biodegradável e pode favorecer a biodegradação de contaminantes no meio (KIM *et al.*, 2002; BOULD *et al.*, 2003; SABATÉ *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007). Isto também ocorreu com gasolina comercial, principalmente em relação aos compostos C9+, no processo de bioestimulação em 50 e 100 cm de profundidade, aos 150 dias, Figuras 7.7 e 7.8;

A mobilidade dos compostos BTX de 1 cm de profundidade para 50 e 100 cm, foi maior no solo com gasolina pura do que no solo com gasolina comercial (com 24% etanol), nos dois processos avaliados neste experimento, com sistema aberto, nas condições estudadas, no tempo zero (coleta 1 hora após a montagem dos experimentos). Isto discorda, em parte da literatura que informa que o etanol favorece a mobilidade dos BTX (PENNER, 2000; SOARES, 2006), principalmente em água. A presença de etanol na gasolina aumenta a solubilidade dos hidrocarbonetos aromáticos em água e com elevadas concentrações de etanol nesta, tende a gerar maior mobilidade dos hidrocarbonetos principalmente dos BTX, aumentando o deslocamento da pluma de contaminação da gasolina na água (SOARES, 2006).

Como este experimento foi realizado, em solo, com 12% de umidade inicial, não se observou acentuada mobilidade dos compostos BTX e C9+, da gasolina comercial, pelo processo de atenuação natural devido a provável volatilização ou sorção (no solo) destes compostos. Entretanto, estes compostos da gasolina comercial no processo de bioestimulação (1% de glicose) apresentaram uma maior mobilidade de 1 cm para 50 cm de profundidade, provavelmente devido a presença da glicose, visto que no processo de atenuação esta mobilidade foi bem menor, tanto que só se percebeu a percolação ou mobilidade destes compostos, a partir de 7 dias.

Comparando os percentuais de redução nas duas profundidades (1 a 50 cm) dos composto ou o percentual presente de cada composto (etanol, BTX, C9+ e TPH) **da gasolina comercial** a uma determinada profundidade (1 e 50 cm), no solo, no sistema aberto (tubo de PVC) notou-se elevados percentuais de redução destes compostos nos dois processos avaliados, aos 7 dias (de até 90%) e aos 90 dias (de até 98%), exceto para os compostos xilenos e C9+. Aos 150 dias, os xilenos atingem redução de 98% e os C9+ reduzem numa faixa de 80 a 90%. Neste período os compostos C9+ da GC apresentaram maior percentual de redução no processo de bioestimulação.

Pelos percentuais de redução dos compostos BTX, C9+ e TPH da gasolina pura, no solo, se pode verificar:

- grandes percentuais de redução deste composto, em ambos processos estudados aos 7 dias de até 72% ;

- mobilidade bem acentuada destes compostos para 50 cm, no tempo zero de até 74,94%, no processo de bioestimulação e de até 71,73 % no processo de atenuação natural, e também se observa que houve deslocamento para 100 cm de profundidade, aos 150 dias; exceto o composto benzeno, que não apresentou mobilidade para 100 cm de profundidade. Além disso, o composto benzeno apresentou a maior mobilidade no tempo zero e pequenos percentuais de mobilidade, nos períodos de 7 a 90 dias, para 50 cm de profundidade. Os compostos tolueno, xilenos e C9+ no solo com gasolina pura apresentaram maiores percentuais de mobilidade no processo de bioestimulação do que no de atenuação natural. Os compostos C9+ apresentaram maior deslocamento de 1 cm para a profundidade de 50 cm, no processo de atenuação natural, em função do tempo. Tanto que, os percentuais mais elevados dos compostos C9+ foram observados na profundidade de 50 cm, nos períodos de 70, 90 e 150 dias, de até 50%.

No sistema aberto verifica-se elevada redução dos compostos BTX, C9+ e TPH da gasolina comercial em relação à gasolina pura, em ambos processos estudados e em todos os

tempos de amostragem. Tanto que, aos 7 dias, na profundidade de 1 cm, nota-se redução de todos os compostos avaliados da gasolina comercial, entorno de 90% e da gasolina pura de até 72%, com diferença de no máximo 18% a mais na redução dos compostos da gasolina comercial. Nos experimentos de Cunha *et al.* (2004), em blocos cúbicos de solo (30 cm²) contaminados no centro com gasolina comercial (22% de etanol) houve redução dos TPH, em 60 dias, nos processos de atenuação natural (74%) e bioventilação (98%). No presente trabalho, aos 60 dias, (Figuras 7.6) nota-se elevada redução (de 1 a 50 cm de profundidade) dos compostos TPH da gasolina comercial no processo de atenuação natural (98,0%) e bioestimulação (99,5%), entre nas profundidades de 1 a 50 cm, portanto neste trabalho, verifica-se maior redução do TPH no processo de atenuação no que o informado na literatura acima.

7.2.7 Análise biológica de heterotróficos no sistema aberto

Na Tabela 7.11 pode-se visualizar os resultados da estimativa do número mais provável (NMP) de micro-organismos heterotróficos totais existentes nas amostras de solo dos tratamentos em relação aos processos, na profundidade de 1 e de 50 cm, para os períodos de coleta de 0 e 150 dias.

Pelos dados da Tabela 7.11 observa-se que não houve um aumento significativo do NMP de heterotróficos entre os tratamentos e as profundidades estudadas, exceto no processo de bioestimulação com gasolina pura (4,9 log g⁻¹) em relação ao testemunho 2 (6,1 log g⁻¹; solo com glicose) em 1 cm de profundidade, aos 150 dias, nota-se diferença de 1,2 log entre estes dois tratamentos.

Tabela 7. 11 Estimativa de micro-organismos heterotróficos totais existentes nas amostras de solo dos tratamentos, em sistema aberto, na profundidade de 1 e 50 cm, nos períodos de 0 e 150 dias.

Dados		Estimativa do NMP de micro-organismos heterotróficos totais dos tratamentos (processos e testemunho) em sistema aberto, nos períodos de 0 e 150 dias.					
		Tratamento (log g ⁻¹ de solo)				Testemunho (log g ⁻¹ de solo)	
Solo	Profundidade em tempo (dias)	Processo	Gasolina comercial	Gasolina pura	Etanol	Solo	
1- Solo	1 cm- (0)	Atenuação	6,21	5,42	6,30	1	5,61
	50 cm- (0)	Natural	6,15	5,63	6,13		5,60
2- solo com 1% de glicose	1 cm- (0)	Bioestimulação (1% de glicose)	6,12	5,52	6,32	2	6,22
	50 cm- (0)		6,13	5,84	6,70		6,23
1- Solo	1 cm- (150)	Atenuação	7,00	5,92	6,21	1	6,04
	50 cm - (150)	Natural	5,92	5,93	6,32		5,70
2- solo com 1% de glicose	1 cm - (150)	Bioestimulação (1% de glicose)	6,43	4,91	6,53	2	6,12
	50 cm - (150)		6,01	6,30	5,90		6,13

7.2.8 Análise biológica de degradadores no sistema aberto

Na Tabela 7.12 pode-se visualizar os resultados do número mais provável (NMP) de micro-organismos degradadores, no solo dos tratamentos, em função dos processos e das profundidades de 1 e 50 cm, no período de 0 e 150 dias.

Segundo a Tabela 7.12 observam-se algumas variações nos valores do NMP de degradadores entre os tratamentos e as profundidades estudadas, no período de tempo de 0 e 150 dias, principalmente nos tratamentos de testemunhos com gasolina pura, no tempo zero. As variações observadas podem indicar mudança na biodiversidade da microbiota, com a predominância de organismos hidrocarbonoclasticos (BENTO *et al.*, 2005). Segundo Mariano (2006), a biomassa microbiana total ativa pode diferir na composição de espécies e em regimes metabólicos.

Tabela 7. 12 Estimativa do NMP (número mais provável) de micro-organismos degradadores existentes nas amostras de solo (com e sem combustíveis) dos tratamentos, em sistema aberto, nas profundidades de 1 e 50 cm, nos períodos de 0 e 150 dias.

		Estimativa do NMP micro-organismos degradadores dos tratamentos em sistema aberto, no período de 0 e 150 dias.							
		Tratamento (log g ⁻¹ de solo)				Testemunhos (solo) (log g ⁻¹ de solo)			
Solo	Profundidade em tempo (dias)	Processo	Gasolina comercial	Gasolina pura	Etanol		Gasolina comercial	Gasolin a pura	Etanol
1- Solo	1 cm - (0)	AN	2,53	2,98	2,86	1	2,53	1,4	2,71
	50cm - (0)		2,93	2,98	2,86		2,53	1,0	2,71
2- solo + 1% glicose	1 cm - (0)	BIE	3,01	2,60	2,67	2	3,16	1,5	2,88
	50 cm - (0)		3,48	2,60	2,67		3,16	1,7	2,88
1- Solo	1cm - (150)	AN	3,76	3,76	2,00	1	3,78	4,62	4,93
	50cm -(150)		3,78	3,52	2,10		3,75	4,17	4,93
2- solo + 1% glicose	1 cm - (150)	BIE	3,64	3,51	4,02	2	4,16	4,41	4,66
	50 cm - (150)		2,32	4,29	3,40		4,30	4,67	4,96

OBS: AN= atenuação natural , BIE= bioestimulação.

7.2.9 Análises dos teores de umidade e pH no sistema aberto

Os teores de umidade do testemunho 1 (solo, sem glicose), obtidos nas profundidades 1 e 50 cm, em relação ao tempo no sistema aberto, podem ser observados na Figura 7. 15.

As análises de teor de umidade do solo mostraram significativa perda de água em 150 dias, cujos valores foram de 5,1% (1 cm), 9,1% (50 cm) e 3,5 % (100 cm), considerando 12% para o tempo zero, em todas as profundidades estudadas. Segundo Shewfelt *et al.* (2005), os teores de umidade próximos de 18 a 12 % geralmente favorece a maior degradação. O decréscimo do teor de umidade pode ter comprometido a atividade microbiana e favorecido a maior volatilização dos compostos mais voláteis dos combustíveis. E, também as altas temperaturas ocorridas, durante os experimentos (35 a 40 °C, até 70 dias e de 25 a 30°C de 70 a 150 dias), provavelmente favoreceram a maior volatilização.

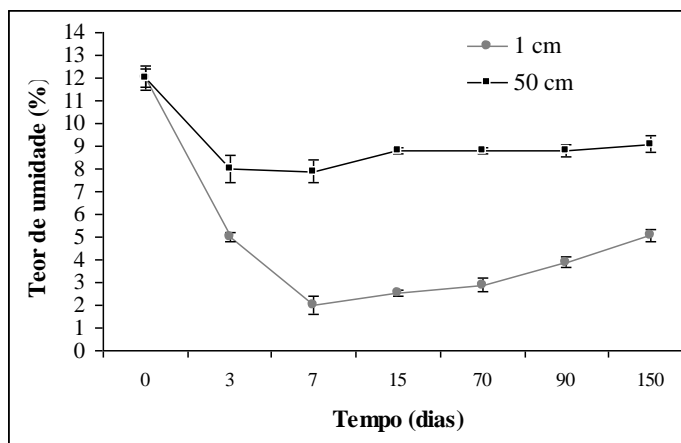


Figura 7.15 Teores de umidade do solo (testemunho 1) em função do tempo, nas profundidades de 1 e 50cm, em sistema aberto.

Os valores de pH das amostras de solo dos tratamentos (processos e testemunhos), no sistema aberto, em tempo zero (coleta após 1 hora de montagem dos experimentos) e em 150 dias, nas três profundidades (1, 50 e 100 cm), podem ser visualizados na Tabela 7.13.

Tabela 7.13 Valor médio de pH da amostra de solo de cada tratamento em função das profundidades de 1, 50 e 100 cm e no tempo zero, em sistema aberto.

		Valor médio do pH da amostra de cada tratamento em sistema aberto, em tempo zero.					
		Tratamento				Testemunho	
Solo	Profundidade	Processo	Gasolina comercial	Gasolina pura	Álcool	Solo	
1- Solo	1 cm	ATENUAÇÃO NATURAL	5,2	5,2	5,2	1	5,5
	50 cm		5,4	5,4	4,4		5,0
	100 cm		5,3	5,4	5,0		5,1
2- solo com 1% glicose	1 cm	BIOESTIMULAÇÃO	4,4	4,5	4,6	2	5,7
	50 cm		4,7	4,9	4,7		5,7
	100 cm		5,7	5,7	5,5		5,4

Na tabela 7.13e 7.14, nota-se que não houve um aumento significativo nos valores de pH entre os tratamentos e as profundidades estudadas, para os períodos de zero e 150 dias.

Isto pode ter ocorrido devido ao efeito tamponante que o solo pode apresentar (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Por outro lado, verifica-se que o pH do solo apresentou-se numa faixa de 4,4 a 5,7 nos tratamentos com combustível. Segundo Mielniczuk, (1991) quando o pH for inferior a 5,0, a taxa de degradação pode ser afetada. Além disso, o pH determina o tipo de micro-organismo que participará na degradação dos compostos orgânicos e pode reduzir a solubilização e a lixiviação de metais pesados. Para Moreira & Siqueira (2006), os fungos são mais adaptados a valores de pH menores que 5, enquanto que bactérias, incluindo actinomicetos e cianobactérias, se adaptam aos valores de pH entre 6 e 8.

7.3 CONCLUSÕES

O sistema fechado foi utilizado para se verificar o potencial da atividade microbiana do solo, em degradar os combustíveis utilizados nos dois processos, atenuação natural e bioestimulação, através de várias análises. Pelas análises respirométricas nota-se que os combustíveis podem ter gerado maior impacto a microbiota do solo, até 20 dias. A partir de 70 dias o combustível etanol e a gasolina comercial no processo de bioestimulação produziram maior liberação de CO₂ do que o testemunho 1 e apresentaram maiores percentuais de mineralização em relação ao testemunho 1, aos 150 dias. A gasolina pura, nos dois processos, não apresentou maior liberação de CO₂ do que o testemunho 1 até o final do experimento, podendo indicar maior impacto deste a microbiota nativa do solo nas condições estudadas. Com as análises biológicas (NMP de heterotróficos e degradadores) e de pH não se verificou diferença significativa nos tratamentos e sistemas estudados, nos períodos de zero e 150 dias.

Pelas análises químicas realizadas por cromatografia pode-se verificar que os compostos existentes no combustível gasolina comercial e etanol reduziram mais rapidamente do que os compostos da gasolina pura nos dois processos estudados com o tempo. Em 150 dias os compostos BTX da gasolina comercial e da gasolina pura no solo nos dois processos estudados, em 1 cm de profundidade, apresentaram concentrações menores que os valores de interdição ambiental, nos dois sistemas (fechado e aberto).

No sistema aberto, pelas análises químicas de cromatografia verificou-se que, todos os combustíveis com o composto etanol, como o álcool com 99,9% de etanol e a gasolina comercial com 24% de etanol, apresentaram maior redução na maioria de seus compostos, já aos 7 dias e menor mobilidade de seus composto no solo do que o observado com os compostos da gasolina pura. Isto ocorreu provavelmente devido a maior volatilização dos compostos da gasolina comercial com a presença e auxílio do composto etanol e devido às elevadas temperaturas, geradas no início do experimento, principalmente na estação do ano, verão. Além disso, no sistema aberto, observou-se maior redução dos compostos BTX da gasolina comercial do que da gasolina pura no solo, em todas as profundidades estudadas em ambos processos empregados. Também se verificou que os compostos BTX da gasolina comercial apresentaram concentrações menores que os valores de interdição ambiental em todas as profundidades (1, 50 e 100 cm), avaliadas nos processos estudados. Isto não ocorreu com os compostos BTX da gasolina pura, exceto na profundidade de 1 cm. Este fato leva a pensar que o etanol presente na gasolina comercial favorece a maior redução destes compostos. Logo por este experimento pode-se pensar que o etanol presente em 24% na gasolina comercial parece ter favorecido a maior redução (pela degradação ou volatilização) dos compostos da gasolina comercial no período do ano estudado, (verão de 2006) nos dois processos avaliados, no sistema aberto, nas condições estudadas.

No sistema aberto a glicose no processo de bioestimulação em relação ao de atenuação natural, em 150 dias, pode ter favorecido a maior redução dos compostos C9+ de cada gasolina (pura e comercial) utilizada, principalmente nas profundidades de 50 e 100 cm. Neste período este processo de bioestimulação com gasolina pura, sem etanol, pode ter acelerado mais a redução de outros compostos, além do C9+, como do tolueno, xilenos e TPH em relação ao processo de atenuação natural, principalmente nas profundidades de 50 e 100 cm. Logo estes dados tendem a informar que 1% de glicose, no solo, com gasolina pura, provavelmente acelerou as reduções da maioria dos compostos da gasolina pura, nas profundidades de 50 e 100 cm avaliadas, nas condições estudadas, em 150 dias.

O teor de umidade do solo diminui com o tempo e apresentou diferentes percentuais em cada profundidade do sistema aberto, com o tempo, e também aos 150 dias. Este fator pode ter influenciado na degradação e volatilização dos compostos dos combustíveis, no solo, nas condições estudadas.

8 CONCLUSÃO GERAL DOS ESTUDOS

Estudo 1 – o solo da área 1 do *landfarming* (com histórico de contaminação de 21 anos com borra oleosa e que sofreu adição de gasolina comercial (com 24% de etanol, em sistema fechado), após 30 dias de incubação, foi o que apresentou maior degradação quantitativa dos compostos (etanol, BTX, C9+ e TPH) da gasolina comercial. Desse solo da área 1 foram obtidos 17 isolados bacterianos e dos mesmos selecionados 7 isolados de maior potencial de degradação dos compostos da gasolina comercial. Esses 7 isolados foram utilizados com concentração média de células de 10^4 UFC mL⁻¹ e degradaram em parte os compostos da gasolina comercial, enquanto que os consórcios (denominados N1, N2 e N3) com concentração média de células de 10^8 UFC mL⁻¹ reduziram, em 3 dias, os compostos da gasolina comercial (95 a 98% TPH), em meio líquido no sistema fechado. Isto ressalta a importância de considerar a concentração das células do inóculo e o papel do co-metabolismo dos consórcios no tratamento de poluentes nas condições estudadas. No estudo 1 os consórcios obtidos foram mais eficientes na degradação da gasolina comercial em meio líquido nas condições estudadas.

Estudo 2 – pelos resultados obtidos nestes testes realizados e nas condições utilizadas nos dois sistemas fechados A e B, o melhor processo de biorremediação do solo com gasolina comercial foi o de atenuação natural em relação aos processos de bioestimulação e bioestimulação com bioaugmentação.

Estudo 3 – pelas análises respirométricas, **sistema fechado**, verificou-se que os combustíveis podem ter gerado maior impacto a microbiota do solo até 20 dias, concordando com os resultados obtidos no estudo 2, que utilizou gasolina comercial (com testes de biorremediação de até 50 dias). A partir de 70 dias o combustível etanol e a gasolina comercial no processo de bioestimulação produziram maior liberação de CO₂ do que o testemunho 1 e apresentaram maior percentuais de mineralização em relação ao testemunho 1 aos 150 dias. A gasolina pura nos dois processos não apresentou maior liberação de CO₂ do que o testemunho 1 até o final do experimento, podendo indicar maior impacto deste a microbiota nativa do solo nas condições estudadas.

Pelas análises cromatográficas pode-se verificar que, os compostos existentes no combustível gasolina comercial e etanol reduziram mais rapidamente do que os compostos da gasolina pura, nos dois processos estudados com o tempo. Em 150 dias, os compostos BTX

da gasolina comercial e da gasolina pura no solo nos dois processos estudados, em 1 cm de profundidade, apresentaram concentrações menores que os valores de interdição ambiental em 150 dias **nos dois sistemas (fechado e aberto)**.

No sistema aberto, pelas análises cromatográficas verificou-se que os combustíveis, etanol com 99,9% de pureza e a gasolina comercial com 24% de etanol, já nos primeiros 7 dias, apresentaram maior redução na maioria de seus compostos e menor mobilidade de seus composto no solo do que o observado com os compostos da gasolina pura. Isto ocorreu, provavelmente, devido a maior volatilização dos compostos da gasolina comercial auxiliada pela presença do composto etanol e de elevadas temperaturas, geradas no início do experimento, principalmente na estação do ano verão. No sistema aberto, observou-se maior redução dos compostos BTX com concentrações menores que os valores de interdição ambiental em todas as profundidades (1, 50 e 100 cm), avaliadas no solo com na gasolina comercial do que no com gasolina pura, em ambos processos empregados. Isto não ocorreu com os compostos BTX da gasolina pura, exceto na profundidade de 1 cm, indicando que o etanol presente na gasolina comercial favorece a maior redução destes compostos.

No sistema aberto à glicose no processo de bioestimulação em relação ao de atenuação natural, em 150 dias, pode ter favorecido a maior redução dos compostos C9+, do tolueno, xilenos e TPH, principalmente da gasolina pura nas profundidades de 50 e 100 cm. Logo, estes dados tendem a informar que 1% de glicose no solo com gasolina pura induziu um aumento nas reduções da maioria dos compostos da gasolina pura, nas profundidades de 50 e 100 cm avaliadas, nas condições estudadas, em 150 dias.

Nos estudos 2 e 3, pelas análises biológicas (de heterotróficos e/ou degradadores) e de pH não foi verificado diferença significativa nos tratamentos e sistemas estudados, nos períodos de zero e 150 dias. Entretanto, nestes estudos se verificou que o teor de umidade do solo diminui com o tempo e apresentou diferentes percentuais em cada sistema estudado, nas três profundidades avaliadas do sistema aberto. O teor de umidade pode ter influenciado na degradação e volatilização dos compostos dos combustíveis no solo nas condições estudadas.

Conforme os estudos 2 e 3 realizados nas condições utilizadas o melhor processo de biorremediação foi o de atenuação natural com gasolina comercial, nos sistemas abertos e fechados.

No estudo 3, sistema aberto, o melhor processo observado para o combustível etanol foi o de atenuação natural e para a gasolina pura foi o de bioestimulação com 1% de glicose.

9 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS

- estudar os processos de atenuação natural e bioaugmentação de solo contaminado com gasolina comercial, com contínuas correções do pH e umidade, e frequentes trocas de oxigênio;
- avaliar a biodegradação e/ou a volatilização da gasolina comercial no solo, através dos processos de Bioaugmentação e atenuação natural em função do controle (solo estéril);
- identificar os sete isolados bacterianos selecionados no estudo 1;
- estudar os processos de atenuação natural e bioestimulação de solo contaminado com gasolina pura ou outros combustíveis, com contínuas correções do pH e umidade, e frequentes trocas de oxigênio;
- avaliar os sete isolados sozinhos ou na forma de consórcios com maiores concentrações de inóculo, em meio líquido em relação à degradação da gasolina comercial;
- utilizar outra metodologia, de isolamento de micro-organismos do solo *landfarming* conforme a metodologia 2 de Jacques (2005);
- avaliar os sete isolados na forma de consórcios bacterianos (com concentrações de inóculo de 10^8 UFC) em meio líquido com diferentes combustíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accioly, A. M. A.; Siqueira, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: Novais, R. F.; Alvarez V.; V. H.; Schaefer, C. E. G. R. Tópicos em ciência do solo. Viçosa: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v.1, 299-352, 2006
- Alexander, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2nd ed. New York: Academic Press, 999,453p.
- Alvarez, P.J.J.; Hunt, C.S.. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, 2002, 44(2), 83-104.
- Atlas, R.M.; Bartha, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4th ed. Menlo Park : Benjamin/Cummings, 1998. 694p.
- Beller, H.R.; Kane, S.R.; Legler T.C. Chapter 4: Effect of ethanol on hydrocarbon-degrading bacteria in the saturated zone: microbial ecology studies. In: **Subsurface Fate and Transport of Gasoline Containing Ethanol**; Rice, D.W.; Depue, R.T., Eds.; University of California: Livermore, CA, 2001.
- Bento, F. M.; Camargo, F. A. O.; Okeke, B. C. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v.96, p.1049-1055, 2005.
- Braddock, J. F.; Catterall, P. H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. *Biorem. J.* , 3(2), Bushnell, L. D.; Hass, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Jounal Bacteriology**, v.41, p. 653-673, 1999.
- Chang, S. H.; Devinny, J. Bioaumentation for soil bioremediation. In: Wise, D. L.; Trontolo, D. J. (Eds.) *Bioremediation of contaminated soils*. Marcel Dekker, New York, p. 465-488, 2000.
- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, **CETESB 2010, Relação de áreas contaminadas**; São Paulo, SP, Brazil, 2009.

(http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp) (acesso: em setembro de 2010).

_____. **CETESB**, *Relação de áreas contaminadas*; São Paulo, SP, Brazil, 2008. (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp) (acesso: em setembro de 2010).

_____. **CETESB**, *Relação de áreas contaminadas*; São Paulo, SP, Brazil, 2005. (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp) (acesso: em novembro de 2006).

(http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp) (acesso: em setembro de 2008).

_____. **CETESB**. Decisão de Diretoria N° 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005, Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001, e dá outras providências. (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf) (acesso: em julho de 2008).

Cordazzo, J. *Modelagem e Simulação Numérica do Derramamento de Gasolina Acrescida de Álcool em Águas Subterrâneas*. Dissertação, Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina, 2000, 120p.

Corseuil, H. X.; Hunt, C. S.; Santos, R. C. F.; Alvarez, P. J. The influence of gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. **Water Research**, Orland, v. 32, n. 7, p. 2065-2072, 1998

Corseuil, H. X.; Weber, W. J. Jr. Potential biomass limitations on rates of degradation on monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. **Water Research**, v.28, p.1415-1423, 1994.

Cunha, P. O.; Vargas, E. A.; Guimaraes JR., J. R. V.; Campos, T. M. P.; Nunes, C. M. F.; Costa, A.; Antunes, F. S.; Silva, M. I. P.; Mano, D. M. Evaluation of bioventing on a gasoline-ethanol contaminated undisturbed residual soil. **Journal of Hazardous Materials**, v.110, p. 63-76. 2004.

- Empresa Comercial de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análises de Solos**; Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1999, 212 p.
- Guimarães, C.H.D. **Avaliação de Risco Ambiental de Sítios Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo**; Dissertação, Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Brazil, 2003, 315 p.
- Jacques, R. J. S. **Biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no solo**. Tese (Doutorado), Porto Alegre (RS): UFRS Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, 2005, 188 p.
- Kim, D.; Kim, Y. S.; Kim, S. K.; Kim, S. W.; Zyistra, G. J.; Kim, Y. M.; Kim, E. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.7, p.3270-3278, 2002.
- Labud, V.; Garcia, C.; Hernandez, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. **Chemosphere**, vol. 15, 59-60 pp, 2007.
- Lawrence, A.; Jonsson S.; Borjesson, G. Ethanol, BTEX and microbial community interactions in E-blend contaminated soil slurry. **Int.l Biodeterioration & Biodegradation.**, v.63, p. 654-666, 2009.
- Lee, S. J., Choi, N. C., Kim, D. J. Effect of glucose on toluene biodegradation during transport through quartz sand column. **Geophysical Research Abstracts**, Lindau, v.9, p. 2514, 2007.
- Marchal, R.; Penet, S.; Solano-Serena, F.; Vandecasteele, J.P. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. **Oil & Gas Science and Technology**, v 58, n. 4, p: 441-448, 2003.
- Mariano, A.P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminadas com óleo diesel**. Rio Claro (SP): Universidade Estadual Paulista, 2006, 162 p.
- Mielniczuk, C. **A população microbiana e a degradação de resíduos petroquímicos no solo**, Dissertação (Mestrado), Porto Alegre (RS): UFRGS - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 1991, 135 p.

- Oliveira, F. S., Teixeira, L. S. G., Araujo, M. C. U., Korn, M. Screening analysis to detect adulterations in Brazilian gasoline samples using distillation curves. **Fuel** 83: 917-923, 2004.
- Penner, G. C. **Estudos Laboratoriais da Contaminação do Solo por Gasolina com o uso de Detetor de Fotoionização**. 107p. Dissertação de Mestrado. São Carlos (SP): Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2000.
- Prata, F.; Lavorenti, A.; Regitano, J. B.; Tornisielo, V. L. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 36(7), p. 975-981, 2001.
- Prenafeta-Boldú, F. X.; Ballersted, H.; Gerristse, J.; Grotenhuis, J. T. C. Bioremediation of BTEX hydrocarbons: effect of soil inoculation with the toluene grownin fugs *cadophialophora sp. Strain T1*. **Biodegradation**, v. 15, p. 59-60, 2004.
- Rice, D. W.; Powers, S. E.; Alvarez, B. J. J. Potential scenarios for ethanol containing gasoline released into surface and subsurface waters. In **Health and Environmental Assessment of the Use of Ethanol of a fuel Oxygenated – Report to the California Environmental Policy Council in Response to Executive Order D-5-99. Vol. 4, Potential Ground and Surface Water Impacts**; Rice, D. W.; Cannon, G., Eds.; Lawrence Livermore National Laboratory: Livermore, CA UCRL-AR-135949 v. 4 Ch. 1, 2000.
- Rodella, A. A.; Zambello Júnior, E.; Orlando Filho, J. Effects of vinasse added to soil on pH and exchangeable aluminum content. In: **Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists**. Havana, Universidad de La Habana, p. 189-214, 1983.
- Sabaté, J., Vinas, M., Solanas, A. M. Labotatory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, n. 1, p. 19-25, jul. 2004.
- Shewfelt, K.; Lee, H.; Zyhuer, R. Optimization of nitrogen for bioventing of gasoline contaminated soil. **Jounal Environmental Enginneering**, v. 4, 29-42 pp, 2005.
- Silva, C. C. G. **Otimização de uma unidade de air stripping para remover BTEX de águas residuárias**. Dissertação de Mestrado. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Química, 2004.

- Silva, F.L.N.; Santos Jr., J.R.; Neto, J.M.M.; Silva, R.L.G.N.P. Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do Estado Piauí. **Revista Química Nova**, v.3, n.1, p. 56-60, 2009.
- Soares A. A. **Avaliação da Biorremediação de Água Subterrânea Contaminada com Gasolina: Experimentos em Microcosmos e em Campo**. Dissertação, Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006, 172p.
- Spinelli, SCHNAID. F.; SELBACH, P. A., OLIVEIRA, J. R.; SELBACH, B. Ensaio de laboratório aplicados à biodegradação de diesel e gasolina em solo. **Anais do III Simpósio de Prática de Engenharia Geotécnica da Região sul, GEOSUL'2002**, Joinville, SC, p. 123-127, 2002.
- Stotzky, G. Microbial respiration. In: **In Methods of soil analysis**; Black, C.A., Ed., American Society of Agronomy: Madison, WI, p. 1551-1572, 1965.
- Sylvia D. M. et al. **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 550 p.
- Tedesco, M. J.; Volkweiss, S. J.; Bohen, H. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS- Departamento de Solos, 1995.
- United States Environmental Protection Agency – **USEPA** – Method 8015B, Nonhalogenated organics using CG/FID, 1996.
- United States Environmental Protection Agency – **USEPA** – Method 5021, Solids Sample, Volatile organic compounds, Automated headspace, 1996.
- Yadav, J. S.; Redy, C. A. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 59, 756-762pp, 1993.

ANEXOS

ANEXO 1

A1- Padronização Externa

Para a padronização externa foram feitas as seguintes soluções:

1) solução estoque A

Adição de aproximadamente 2 g, pesadas em balança analítica com precisão de décimos de miligrama, de cada uma das soluções de benzeno (99,96 % de pureza); tolueno (99,68 % de pureza); xilenos meta, para e orto (1:1:1 v v-1) (99,23 % de pureza); solução de C9+ descrita na Tabela 1 (98,03 % de pureza), em um frasco de headspace de 20 mL. Após a adição das soluções, o frasco foi imediatamente lacrado com septo de silicone/teflon (teflon para a parte interna do frasco) e selo de alumínio e a mistura homogeneizada por agitação manual por 30 segundos. As massas de cada solução foram devidamente anotadas para posterior cálculo das concentrações. A solução mãe foi mantida em geladeira, 4 °C, no máximo por 90 dias.

O cálculo da concentração de cada componente da solução mãe A em % massa, encontra-se descrito abaixo.

$$C_i (\% \text{ massa}) = \frac{M_i \times \text{Pureza} (\%)}{M_T}$$

Onde:

C_i = Concentração do componente i na mistura da solução mãe em % massa

M_i = Massa do componente i, em gramas

Pureza (%) = percentual de pureza do componente i

M_T = Somatório das massas de todos os componentes da mistura mãe (benzeno, tolueno, xilenos e C9+), em gramas.

Tabela 1 Descrição dos % dos componentes que compõe a solução C9+

componentes	% massa
etil benzeno	0,014
Xilenos	0,276
isopropil benzeno	4,391
n propil benzeno	15,354
1,3 & 1,4 metil etil benzeno	53,889
1,3,5 trimetil benzeno	3,268
1,2 metil etil benzeno	9,612
1,2,4 trimetil benzeno	4,161
iso butil benzeno	0,157
sec butil benzeno	0,061
1,2,3 trimetil benzeno	0,185
1,3 metil isopropil benzeno	0,140
1,4 metil isopropil benzeno	0,074
Indano	5,064
1,2 metil isopropil benzeno	0,037
1,3 dietil benzeno	0,093
1,3 metil npropil benzeno	0,052
1,4 dietil benzeno	0,066
1,4 metil npropil benzeno	0,020
C10H16 biciclo endo	0,102
metil indano	0,010
C10H16 biciclo exo	1,628
C11 arom (1,4 metil tC4 benzeno)	0,015
naftaleno	<0,001
C9+ aromáticos	96,624

2) solução estoque B

A preparação da solução mãe B foi realizada em um frasco de headspace de 20 ml, pesando em balança analítica (com precisão de décimos de miligrama), 15 mL de metanol e 200 uL da solução mãe A, anotando as respectivas massas. Imediatamente o frasco foi lacrado com septo de silicone e tampa de alumínio e a solução homogeneizada por agitação manual por 30 segundos. A solução foi mantido em geladeira, 4 °C, no máximo por 14 dias.

O cálculo da concentração de cada componente da solução mãe B em mg kg⁻¹, encontra-se descrito abaixo.

$$C_i \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{C_i \text{ na solução A} \times \text{massa da solução A adicionada em mg} \times 1000}{\text{Massa total da solução B em gramas} \times 100}$$

Onde:

C_i na solução A = Concentração do componente i na solução mãe A, em % massa;

1000 = conversão da massa em g para kg ou para expressar a concentração em mg kg^{-1} ;

100 = conversão da expressão de % **em massa** para g;

3) soluções padrões de trabalho (C)

As soluções padrão C foram confeccionadas para a verificação da faixa de linearidade e curvas de calibração.

As curvas de calibração foram determinadas a partir da preparação dos padrões com cinco diferentes concentrações, preparadas como segue:

3a- volumes de 200, 400, 600, 800, 1000 μL da solução mãe B, foram pesados em balões volumétricos de 100 mL e diluídos com água deionizada, até a marca do volume do balão, seguidos de homogeneização. As massas correspondentes foram devidamente anotadas para cálculos das concentrações.

Curva de calibração para amostras de solo

As amostras para a calibração externa das amostras de solo foram feitas, em frasco de headspace de 20 mL, com adição de 10 mL da solução 3a de concentração desejada e 2 g de solo *in natura*. Imediatamente o frasco foi vedado com septo de silicone e lacre de alumínio, seguido de agitação manual por 30 segundos.

Curva de calibração para amostras do meio mineral (M1)

A padronização para o meio mineral foi realizada através da pesagem, em balança analítica, dos volumes de 200, 400, 600, 800, 1000 μL da solução mãe B, em balões volumétricos de 100 mL, com posterior diluição com o meio mineral M1, até a marca do volume do balão, seguidos de homogeneização. As massas correspondentes foram devidamente anotadas para cálculos das concentrações.

Dez mL da concentração desejada foram adicionados em frasco de headspace de 20 mL, imediatamente lacrados com septos de silicone e tampas de alumínio, seguidos de homogeneização por 30 segundos, para posterior análise em cromatografia gasosa.

CÁLCULO E EXPRESSÃO DO RESULTADO

O cálculo da concentração de cada componente foi obtido através das seguintes expressões:

a- cálculo do fator de resposta:

$$A_{ip} = F_i \times C_{ip} \quad \text{ou} \quad C_i = A_i / F_i \quad \text{ou} \quad F_i = A_i / C_i$$

Onde: C_{ip} = Concentração do componente i na amostra padrão

A_{ip} = Área do componente i da amostra padrão

F_i = Fator de resposta do componente i

b- cálculo da concentração do componente i **na amostra de solo**.

$$C_{ia} \text{ (mg kg}^{-1} \text{ de solo)} = \frac{C_{ip} \times 10 \text{ mLp} \times A_{ia}}{A_{ip} \times m \text{ da amostra (g)}}$$

onde:

C_{ia} = Concentração do composto i na amostra de solo, expressa em mg do componente i / kg de solo.

C_{ip} = Concentração do composto i na solução padrão de trabalho em mg/L;

10 = volume de solução padrão, mL.

A_m = área do composto i na amostra;

A_{ia} = área do composto i da solução padrão de trabalho C;

m da amostra = massa de amostra analisada em g.

c- cálculo da concentração do componente i na amostra de meio mineral **M1**.

$$C_i \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{C_{ip} \times A_{im}}{A_{ip}}$$

onde:

C_{ip} = Concentração do composto i na solução padrão de trabalho C em mg/L;

A_{im} = área do composto i na amostra;

A_{ip} = área do composto i da solução padrão de trabalho C.

ANEXO 2

A2- Análises dos combustíveis

A caracterização dos combustíveis gasolina pura, gasolina comercial e álcool, foi realizada no laboratório da COPESUL S/A, e está apresentada nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Caracterização da gasolina pura e gasolina comercial.

Compostos	% em vol dos compostos presentes nas gasolinas	
	Gasolina Pura	Gasolina Comercial
Álcool-etanol	0	24,6
Total de aromáticos	30,0	21,9
Total de olefínicos	14,3	3,60
Total de saturados	55,7	49,5
Total	100	100
Benzeno	1,1	0,76
Densidade (mg mL ⁻¹)	0,761	0,757

Tabela 2 - Caracterização do combustível etanol

Acidez com ácido acético (mg L ⁻¹)	10,46
Aspecto visual	límpido sem material em suspensão
Condutividade a 20°C (µS m ⁻¹)	0,921
Cor	alaranjada
Densidade (mg mL ⁻¹)	0,7908
Pureza	99,5 %

ANEXO 3

A3- Caracterização do solo *in natura*

Segundo Embrapa (1999) o solo proveniente da cidade de Triunfo, RS, é classificado como Argissolo Vermelho distrófico. Sua caracterização encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização do solo de Triunfo, RS.

Parâmetro	Unidade	Valor
Argila	g kg ⁻¹	290,0
pH	H ₂ O	4,9
Índice SMP		5,7
Fósforo	mg dm ⁻³	2,9
Potássio	mg dm ⁻³	246,0
Matéria Orgânica	g kg ⁻¹	34,0
Alumínio trocável	cmol _c dm ⁻³	0,8
Cálcio trocável	cmol _c dm ⁻³	3,5
Magnésio trocável	cmol _c dm ⁻³	1,7
Al + H	cmol _c dm ⁻³	6,2
Capacidade de Troca de Cátions	cmol _c dm ⁻³	12,0
Saturação de bases	% SAT da CTC	48,0
Saturação de alumínio	% SAT da CTC	6,6
Enxofre	mg dm ⁻³	6,1
Zinco	mg dm ⁻³	3,8
Cobre	mg dm ⁻³	1,2
Boro	mg dm ⁻³	0,6
Manganês	mg dm ⁻³	35
Nitrogênio (TKN)	%	0,12

Índice SMP- avalia a mudança de pH de uma solução tamponada, conforme o método proposto por Shoemaker *et al.* (1961), este é correlacionado com a quantidade de calcário necessária para atingir valores de pH compatível com as diversas culturas.