



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE CERRO LARGO
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA**

NICOLY WELTER

**POTENCIAL MICROBIANO PARA A DEGRADAÇÃO DE COMBUSTÍVEIS E
INVESTIGAÇÃO DE MÉTODOS PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO
CONTAMINADO COM DIESEL COMERCIAL EM MICROCOSMOS**

CERRO LARGO - RS

2018

NICOLY WELTER

**POTENCIAL MICROBIANO PARA A DEGRADAÇÃO DE COMBUSTÍVEIS E
INVESTIGAÇÃO DE MÉTODOS PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO
CONTAMINADO COM DIESEL COMERCIAL EM MICROCOSMOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador. Dr. Daniel Joner Daroit.

CERRO LARGO – RS

2018

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Welter, Nicolý

POTENCIAL MICROBIANO PARA A DEGRADAÇÃO DE
COMBUSTÍVEIS E INVESTIGAÇÃO DE MÉTODOS PARA A
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM DIESEL COMERCIAL
EM MICROCOSMOS / Nicolý Welter. -- 2018.

54 f.:il.

Orientador: Doutor em Microbiologia Agrícola e do
Ambiente Daniel Joner Daroit.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Engenharia Ambiental e Sanitária, Cerro Largo, RS ,
2018.

1. Atenuação Natural. 2. Bioestimulação. 3.
Bioaugmentação. 4. Biodegradação. 5. Hidrocarbonetos de
petróleo. I. Daroit, Daniel Joner, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA
SUL CAMPUS CERRO LARGO COORDENAÇÃO DO CURSO DE ENGENHARIA
AMBIENTAL E SANITÁRIA – BACHARELADO

Acadêmico(a): Nicolý Welter

Título do Trabalho: Potencial microbiano para a degradação de combustíveis e
investigação de métodos para a biorremediação de solo contaminado com diesel
comercial em microcosmos.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Daniel Joner Daroit (Orientador)

Profª. Dra. Alcione Aparecida de Almeida Alves (Banca Examinadora)

Prof. Dr. Bruno München Wenzel (Banca Examinadora)

Cerro Largo, 07 de Dezembro de 2018.

Dedico a minha mãe Rosemari Maria Utzig Welter, por todo apoio e por me escutar quando necessário. Ao meu pai, Paulo Roberto Welter, por toda a confiança e disposição em ajudar sempre que precisasse. Aos meus irmãos, e principalmente minha irmã, Paola Daiane Welter que me auxiliou sempre que possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Daniel Joner Daroit, por toda a experiência e conhecimento. Agradeço também por sempre confiar nos trabalhos sugeridos por mim e pela Isabela, e dar todo o apoio quando necessitamos, desde o início de nossa pesquisa em 2015.

Agradeço aos profissionais que colaboraram de alguma forma com a realização das minhas análises, como a técnica Caroline Badzinski pela disponibilidade sempre que eu tive alguma dúvida, o técnico Jonas Duggato que sempre se disponibilizou para buscar reagentes e vidrarias no almoxarifado quando precisei e o professor Bruno München Wenzel por disponibilizar seu laboratório para minhas análises de extração.

Agradeço à minha colega e amiga Isabela Karina Della Flora, que esteve comigo durante toda essa jornada de pesquisas e sempre me auxiliou quando isso estava ao seu alcance.

Aos meus outros amigos pelo apoio emocional e incentivos.

À minha família, principalmente meus pais, Paulo Roberto Welter e Rosemari Maria Utzig Welter que sempre me deram muito apoio, força, motivação e consolo quando necessário e minha irmã mais velha Paola Daiane Welter, que sanava minhas dúvidas sempre que possível.

Agradeço à instituição de ensino Universidade federal da Fronteira Sul e todos os seus profissionais por fazerem possível que eu chegasse até aqui.

E finalmente, agradeço à banca por ter aceito o convite e dispor de seu tempo e pelas contribuições ao trabalho.

RESUMO

O petróleo é composto principalmente por uma complexa combinação de hidrocarbonetos. O petróleo e seus derivados suprem atualmente 40% da demanda total de energia para as necessidades humanas. E além desses, também vem sendo produzido o biodiesel, um combustível de origem vegetal. Essa grande demanda vem fazendo com que a contaminação do solo por combustíveis seja cada vez mais recorrente, seja por meio de grandes derramamentos, ou simples vazamentos que geralmente ocorrem a partir de tanques subterrâneos de armazenamento nos postos de combustível. A biorremediação representa um conjunto de estratégias onde microrganismos são utilizados para decompor contaminantes, incluindo aqueles provindos da indústria de combustíveis. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de doze bactérias isoladas em estudo prévio para a degradação de gasolina, óleo diesel e biodiesel, bem como investigar métodos para a biorremediação [atenuação natural (AN), bioestimulação (BE) e bioaugmentação (BA)] de solo contaminado com diesel comercial em microcosmos incubados por 60 dias. As doze linhagens apresentaram melhor potencial para a degradação de biodiesel, quando investigadas em meio líquido mineral contendo indicador redox e o combustível como única fonte de carbonos, durante 10 dias de incubação. A produção de surfactantes pelos isolados bacterianos foi, em geral, melhor nos inóculos incubados com óleo diesel, seguido pelo biodiesel, e então com gasolina, indicando um maior potencial degradador de biodiesel e diesel. Os quatro isolados bacterianos que apresentaram os melhores resultados nestes testes foram selecionados para constituir um consórcio microbiano utilizado nos microcosmos de BA. Nos experimentos de biorremediação de óleo diesel comercial em microcosmos de solo, a quantidade acumulada de dióxido de carbono liberado ao final da incubação (60 dias) foi 2,1 vezes superior maior na BE do que na AN, e 1,9 vezes superior do que na BA. A contagem de microrganismos heterotróficos totais não variou de forma expressiva durante o experimento; porém, no geral, se manteve superior na BE e BA quando comparados à AN. Ao final do experimento a maior quantidade de MHT foi observada na BA. Em relação à degradação do diesel, observou-se que taxa de redução da massa residual do diesel extraído dos solos foi maior nos primeiros 30 dias de incubação para a maioria dos tratamentos. Ao final dos 60 dias de incubação, a BE resultou em maior degradação do combustível (55,43%) quando comparada à BA (47,28%) e AN (33,02%). Os resultados da avaliação do potencial degradador e produção de biosurfactantes indicaram que todas as linhagens bacterianas testadas possuem capacidade de degradar os combustíveis comerciais gasolina 'C', óleo diesel e biodiesel. Devido à sua natureza mais biodegradável, os melhores resultados foram obtidos, em geral, nos testes feitos com biodiesel. Nos experimentos de biorremediação, os resultados indicaram que a melhor remediação estivesse ocorrendo nos tratamentos bioestimulados, sugerindo que os organismos autóctones do solo têm capacidade de degradar óleo diesel.

Palavras-chave: Bactéria. Biodegradação. Biosurfactante. Atenuação natural. Bioestimulação. Bioaugmentação.

ABSTRACT

Petroleum is primarily composed by a complex combination of hydrocarbons. Petroleum and its derivatives currently supply 40% of the total energy demanded by humans. And in addition to these, biodiesel is also being produced, a fuel of vegetable origin. Such enormous demand has caused soil contamination by fuels to become increasingly recurrent, either by means of large spills or simple leaks that usually occur from underground storage tanks at the fuel stations. Bioremediation represents a set of strategies where microorganisms are used to degrade contaminants, including those from the fuel industry. The aims of this work were to evaluate the potential of 12 bacterial strains, isolated in a previous study, for the degradation of gasoline, diesel and biodiesel, as well as to investigate methods for bioremediation [natural attenuation (AN), biostimulation (BE) and bioaugmentation (BA)] of soil contaminated with commercial diesel oil in microcosms incubated for 60 days. The 12 strains showed better potential for biodiesel degradation, when investigated in mineral liquid medium containing redox indicator and the fuel as the only carbon source, during 10 days of incubation. The production of surfactants by the bacterial isolates was generally higher in inoculums incubated with diesel oil, followed by biodiesel, and then with gasoline, indicating a greater degradation potential of biodiesel and diesel. The four bacterial strains that showed the best results in these tests were selected to constitute a microbial consortium used in BA microcosms. In the bioremediation experiments on soil microcosms contaminated with commercial diesel oil, the accumulated amount of carbon dioxide released at the end of incubation (60 days) was 2.1 times higher in BE than AN, and 1.9 times higher than BA. The counts of total heterotrophic microorganisms did not vary significantly during the experiment; however, in general, it remained higher in BE and BA when compared to AN. At the end of the experiment, higher counts of MHT was observed in BA. As for diesel degradation, it was observed that the reduction rate of the residual mass of the diesel extracted from the soils was higher in the first 30 days of incubation for most treatments. At the end of the 60 days of incubation, BE resulted in greater fuel degradation (55.43%) when compared to BA (47.28%) and AN (33.02%). The results of the evaluation of the degradation potential and biosurfactant production indicated that all the bacterial strains tested have the capacity to degrade the commercial fuels 'C' gasoline, diesel oil and biodiesel. Due to its more biodegradable nature, the best results were generally obtained in the biodiesel tests. In the bioremediation experiments, the results indicated that the best remediation was taking place in the biostimulated treatments, suggesting that the autochthonous organisms of the soil have the capacity to degrade diesel oil.

Keywords: Bacteria. Biodegradation. Biosurfactant. Natural attenuation. Biostimulation. Bioaugmentation.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 2.1 PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS | 11 |
| 2.1.1 Gasolina | 12 |
| 2.1.2 Óleo Diesel | 13 |
| 2.1.3 A importância dos combustíveis líquidos derivados do petróleo | 14 |
| 2.2 BIODIESEL | 14 |
| 2.3 POLUIÇÃO DO SOLO | 15 |
| 2.3.1 Contaminação do solo com combustíveis | 16 |
| 2.4 ORGANISMOS DO SOLO | 17 |
| 2.4.1 Microbiota do solo | 18 |
| 2.5 TECNOLOGIAS DE REMEDIAÇÃO | 20 |
| 2.5.1 Biorremediação | 22 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO | 27 |
| 3.2 ISOLADOS BACTERIANOS | 27 |
| 3.3 PREPARO DOS COMBUSTÍVEIS | 27 |
| 3.4 HABILIDADE DEGRADADORA DE COMBUSTÍVEIS E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES..... | 28 |
| 3.4.1 Preparo do inóculo | 28 |
| 3.4.2 Avaliação de habilidade degradadora de combustíveis | 28 |
| 3.4.3 Avaliação de produção de biosurfactantes | 29 |
| 3.4.4 Seleção dos melhores degradadores e constituição do consórcio bacteriano | 30 |
| 3.5 EXPERIMENTOS DE BIORREMEDIAÇÃO | 30 |
| 3.5.1 Amostra de solo | 30 |
| 3.5.2 Preparo do contaminante | 31 |
| 3.5.3 Montagem e incubação dos microcosmos | 32 |
| 3.5.4 Atividade respiratória | 33 |
| 3.5.5 Determinação de microrganismos heterotróficos totais | 33 |
| 3.5.6 Extração do combustível a partir do solo e determinação gravimétrica | 34 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 4.1 AVALIAÇÃO DA HABILIDADE DEGRADADORA E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES..... | 35 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.1.1 | Avaliação de habilidade degradadora em cultivos submersos | 35 |
| 4.1.2 | Avaliação de produção de biossurfactantes | 37 |
| 4.1.3 | Seleção dos melhores degradadores..... | 40 |
| 4.2 | EXPERIMENTOS DE BIORREMEDIAÇÃO | 40 |
| 4.2.1 | Atividade respiratória..... | 41 |
| 4.2.2 | Microrganismos Heterotróficos Totais..... | 43 |
| 4.2.3 | Determinação gravimétrica | 45 |
| 5. | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 47 |
| | REFERÊNCIAS | 48 |

1. INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados vêm sendo amplamente utilizados para suprir a necessidade energética da população, se tornando a principal fonte de energia no cenário mundial (Agência Nacional de Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis - ANP, 2015). Segundo dados da ANP (2018), cerca de 127 mil metros cúbicos de derivados de petróleo por dia foram produzidos no país no ano de 2017, valor esse ainda menor que o consumo diário médio, que chegou a atingir 146 mil m³.

Apenas no ano de 2017, foram comercializados no país aproximadamente 54,8 milhões de m³ de óleo diesel e 44,2 milhões de m³ de gasolina 'C', através dos aproximadamente 42 mil postos de combustíveis ativos em território nacional. E além dos hidrocarbonetos de petróleo, foram produzidos aproximadamente 4,3 milhões de m³ de biodiesel, combustível de origem vegetal, nas indústrias brasileiras (ANP, 2018).

Nestes postos há a presença de tanques subterrâneos de armazenamento e tubulações que, estando inadequadamente instalados, danificados ou corroídos, podem vir a causar vazamento de combustíveis, fator esse que se encontra entre as principais fontes de contaminação em centros urbanos (TIBURTIUS et al., 2004; JACQUES et al., 2007), resultando em fontes persistentes de poluição (FORTE et al., 2007; GUEDES et al., 2011). Sendo assim, compostos do petróleo e seus derivados estão cada vez mais sendo detectados como contaminantes em solos, sedimentos e águas subterrâneas (JACQUES et al., 2007; WEELINK et al., 2010).

Devido a isso, se torna necessário o desenvolvimento de técnicas remediadoras que visem a recuperação dessas áreas degradadas, podendo estas serem tanto físicas, químicas ou biológicas. Dentro do último grupo, encontra-se a biorremediação microbiana, que segundo Gaylarde, Bellinaso e Manfio (2005), consiste em um processo no qual microrganismos remediam um ambiente contaminado, por meio da redução da concentração do poluente. No caso de contaminantes orgânicos, o objetivo principal é sua completa biodegradação.

A biorremediação pode ser classificada em técnicas *in situ* ou *ex situ* (BOOPATHY, 2000): As técnicas *in situ* caracterizam-se pela possibilidade de tratamento do solo contaminado no local onde o mesmo se encontra, sem a necessidade de removê-lo. Os principais exemplos desse tipo de remediação são a atenuação natural, a bioestimulação e a bioaugmentação. Nas técnicas *ex situ*, o solo deve ser retirado do local para que a remediação possa ser implantada. Nesta categoria, tem-se como exemplos os biofiltros e os biorreatores.

A biorremediação vem sendo largamente recomendada para tratamento de águas superficiais e subterrâneas, solos e resíduos e efluentes industriais de aterros ou áreas de contenção, pelo fato desse processo biológico ser uma forma mais eficaz e ecologicamente viável de tratar moléculas orgânicas de difícil degradação, além de metais tóxicos (GAYLARDE et al., 2005).

Dentro desse cenário, o presente trabalho objetivou comparar o potencial de degradação de diferentes tipos de combustíveis por doze bactérias isoladas em estudo prévio (DELLA FLORA; WELTER; DAROIT, 2017), sendo dois deles hidrocarbonetos de petróleo, óleo diesel e gasolina, e o biodiesel, combustível renovável e produzido por fontes vegetais. Cabe destacar que o óleo diesel e a gasolina comerciais apresentam a adição de biodiesel (10%) e etanol (25%), respectivamente. Os isolados bacterianos que apresentaram os melhores resultados de degradação foram selecionados para os estudos subsequentes.

De forma complementar, óleo diesel comercial foi utilizado para contaminar, em microcosmos, solo sem registros de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. Nestes microcosmos foram avaliados o comportamento da microbiota do solo e a porcentagem de degradação do diesel em três diferentes tratamentos de biorremediação, quais sejam, atenuação natural, bioestimulação, e também bioaugmentação, este último com a adição de um consórcio bacteriano constituído pelos isolados bacterianos selecionados como degradadores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS

O petróleo é uma substância fóssil caracterizada por ter alto valor energético e ser oleosa e inflamável. Sua densidade é geralmente inferior à da água e possui odor característico e coloração variável. Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2018), o petróleo é formado devido ao acúmulo de material orgânico sob condições especiais de pressão e isolamento em camadas do subsolo de bacias sedimentares, o qual sofre transformações por milhares de anos. Basicamente, o petróleo pode ser extraído em terra (*onshore*) e abaixo do assoalho do mar (*offshore*).

Na maioria das vezes, o petróleo não se encontra acessível à superfície e sim aprisionado em rochas porosas, fazendo com que para a extração do mesmo seja necessário o uso de equipamentos que perfurem as camadas rochosas e exerçam a pressão necessária para que o óleo venha até a superfície que devido ao processo, pode se encontrar misturado com sedimentos e gás. Caso a rocha reservatório não seja bem permeável, pode ser necessário fraturá-la para então recuperar o óleo, sendo assim, ocasionalmente a extração do óleo pode não ser comercialmente vantajosa ou tecnicamente viável (ANP, 2018; DEMIRBAS, 2010).

O petróleo é composto principalmente por uma complexa combinação de hidrocarbonetos (carbono e hidrogênio), mas pode apresentar em sua composição também quantidades pequenas de nitrogênio, oxigênio, compostos de enxofre e íons metálicos, variando de amostra para amostra. Comumente, utiliza-se a composição apresentada abaixo como padrão para o petróleo (ANP, 2018; WU et al., 2016):

- Carbono: elemento predominante no petróleo (82%);
- Hidrogênio: forma moléculas com o carbono (12%);
- Nitrogênio: encontrado na forma de aminas (4%);
- Oxigênio: presente em pouca quantidade (1%);
- Sais: raramente encontrados (0,5%);
- Metais (ferro, cobre, etc.): considerados como resíduos (0,5%).

Ao se submeter o petróleo bruto a processos de separação, obtêm-se os derivados utilizados pelos consumidores e pela indústria em geral. Na etapa inicial do refino, o petróleo bruto é aquecido, fazendo com que as diferentes cadeias de hidrocarbonetos se separem conforme suas faixas de temperaturas de ebulição. A partir do petróleo bruto pode ser obtidos,

dentre outros, o gás liquefeito de petróleo (GLP), a nafta, a gasolina, o querosene, e o óleo diesel (DEMIRBAS, 2010).

2.1.1 Gasolina

A gasolina é um produto derivado do petróleo obtido por meio de refinamento, e é composta por uma mistura de mais de 500 hidrocarbonetos com 5 a 12 carbonos, além de aditivos e agentes de mistura. A composição pode variar bastante, dependendo de vários fatores, como o óleo bruto utilizado, os processos de refino disponíveis, o saldo global da demanda de produtos e as especificações dos mesmos. Mas, majoritariamente, esse combustível consiste de hidrocarbonetos alifáticos, reforçado com iso-octano ou hidrocarbonetos aromáticos como tolueno e benzeno, para aumentar a sua octanagem. Os quatro principais grupos de constituintes da gasolina são as olefinas, os aromáticos, as parafinas e os naftenos. Ainda, essa mistura de hidrocarbonetos pode conter alguns contaminantes, como enxofre, nitrogênio, oxigênio e certos metais (DEMIRBAS, 2010).

A composição típica de hidrocarbonetos na gasolina (% volume) é a seguinte: 4-8% alcanos, 2-5% alcenos, 25-40% iso-alcenos, 3-7% ciclo-alcenos e 20-50% aromáticos (0,5-2,5% benzeno). A Tabela 1 apresenta um apanhado geral dos compostos típicos da gasolina.

Tabela 1 – Composição típica da gasolina

| Nome geral | Exemplos | Composição (% em peso) |
|--------------------------|--------------|------------------------|
| Alifático: cadeia linear | Heptano | 15-25 |
| Alifático: ramificado | Iso-octano | 15-25 |
| Alifático: cíclico | Ciclopentano | 20-30 |
| Aromático | Etil-benzeno | 20-30 |

FONTE: Demirbas (2010).

As principais características da gasolina são densidade, pressão de vapor, alcance de destilação, número octano e composição química. A densidade da gasolina pode variar de 0,71-0,77 kg L⁻¹ e sua volatilidade é maior que a do óleo diesel e do querosene, devido aos seus constituintes de base e aditivos adicionados à mesma.

Aditivos e agentes de mistura são adicionados à mistura de hidrocarbonetos para aumentar a desempenho e a estabilidade da gasolina, podendo incluir antidetonantes,

antioxidantes, desativadores de metal, removedores de chumbo, agentes antiferrugem, agentes anti-gelo, lubrificantes, detergentes e corantes (ANP, 2018).

No Brasil, são comercializadas duas diferentes categorias de gasolina. A gasolina tipo ‘A’, que não possui adição de etanol e é vendida pelos produtores e importadores de gasolina, e a gasolina tipo ‘C’, que é vendida aos postos revendedores e, por consequência, ao consumidor final, e possui como aditivo em sua composição 25% de etanol anidro combustível (ANP, 2018).

2.1.2 Óleo Diesel

Segundo Demirbas (2010), o óleo diesel, juntamente com a gasolina, é um dos combustíveis mais utilizados para veículos automotores na atualidade. Esse é derivado do petróleo, obtido por meio da destilação do óleo cru extraído da base rochosa e é composto por hidrocarbonetos com cadeias que variam de 9 a 27 átomos de carbono, assim como uma menor quantidade de enxofre, nitrogênio, oxigênio e compostos metálicos.

Os hidrocarbonetos presentes no óleo diesel variam entre alcanos, naftenos, olefinas e aromáticos. Ainda, outras substâncias são adicionadas a esse combustível, visando uma melhoria em suas características como baixa concentração de enxofre e compostos aromáticos, boa qualidade de ignição, propriedades corretas para climas frios, baixa concentração de poluentes, bem como a densidade, viscosidade e ponto de ebulição corretos (DEMIRBAS, 2010).

Existem diferentes graus do combustível diesel, que dependem do uso para o qual esses serão destinados. Assim como a gasolina, o óleo diesel não é uma substância simples e sim uma mistura de vários componentes derivados do petróleo, cada um com diferentes propriedades químicas e físicas. As características mais importantes do diesel são o número cetano, a volatilidade e a viscosidade (DEMIRBAS, 2010).

Atualmente, no mercado nacional, são comercializados dois tipos de óleo diesel para uso rodoviário, S10 e S500, os quais diferem entre si pela quantidade de enxofre presente em sua composição (10 ppm e 500 ppm respectivamente) (ANP, 2018). Ainda, conforme a Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016, e a Resolução Nº 23 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE, de 09 de novembro de 2017) tornou-se obrigatória, a partir de 1º de março de 2018, a adição de 10% de biodiesel (óleo vegetal transesterificado) na composição do óleo diesel vendido no Brasil.

2.1.3 A importância dos combustíveis líquidos derivados do petróleo

O petróleo e seus derivados ocupam atualmente o primeiro lugar no ranking de fontes energéticas mais utilizadas no cenário mundial, suprimindo cerca de 40% da demanda total de energia (ANP, 2015). Assim, o petróleo possui importante papel nas políticas internas e nas relações internacionais, devido ao seu alto valor energético e também por ser uma fonte não renovável, influenciando o setor econômico tanto para os países que possuem reservas como para os que não possuem (ANP, 2018).

Segundo dados apresentados no anuário estatístico da ANP (2018), o Brasil é o sétimo maior consumidor de petróleo com 3,1% do total mundial, ficando atrás apenas de grandes potências como Estados Unidos e China. Ainda, em 2017 foram comercializados no país aproximadamente 54,8 milhões de m³ de óleo diesel e 44,2 milhões de m³ de gasolina 'C', caracterizando um aumento de 10 e 20 milhões de m³, na última década, para o óleo diesel e a gasolina, respectivamente.

2.2 BIODIESEL

Biodiesel é o nome dado ao óleo vegetal transesterificado, que pode vir a ser utilizado como combustível em motores de ciclo diesel. Possui uma natureza renovável e menos poluente, fazendo com que surja um grande interesse no uso de óleos vegetais para a produção de biodiesel, em oposição ao diesel convencional, que é um combustível fóssil que pode ser esgotado (DEMIRBAS, 2008).

Conforme apresentado por Demirbas (2008), os óleos vegetais são convertidos em ésteres etílicos ou metílicos através de um processo de transesterificação na presença de um catalisador, tendo como objetivo a diminuição da viscosidade do óleo assim como a transformação da estrutura molecular grande e ramificada dos bio-óleos em moléculas menores, de cadeia linear, como é necessário para motores comuns de combustão a diesel. As características importantes dos ésteres de biodiesel são suas propriedades físicas e de combustível, como densidade, viscosidade, valor de iodo, valor de ácido, ponto de turvação, ponto puro, calor bruto de combustão e volatilidade.

O biodiesel tem desvantagem em relação ao diesel por produzir potência e torque ligeiramente menores, fazendo com que se consuma mais combustível, porém é uma opção melhor em termos de teor de enxofre, ponto de fulgor, conteúdo aromático e biodegradabilidade. Economicamente, o biodiesel é duas vezes mais caro que o diesel de

petróleo, devido, principalmente, ao alto preço da matéria-prima. Porém, o custo de biodiesel pode variar conforme diversos fatores, como área geográfica, variabilidade na produção agrícola de estação para estação, preço do petróleo bruto, entre outros (DEMIRBAS, 2008).

A principal razão pelo preço elevado do biodiesel seria o fato de que a maior parte do mesmo é atualmente produzida através óleo de soja, produto que possui papel no setor alimentício, tornando difícil que a produção desse combustível seja feita com baixo custo. No entanto, o biodiesel pode ser produzido a partir de outras matérias-primas, incluindo sebo bovino, banha de porco, resíduos de restaurantes e gordura amarela, ou seja, gorduras e óleos baratos e de grande disponibilidade, o que auxiliaria no decaimento econômico do mesmo. Contudo, o problema com o uso desses óleos e gorduras de baixo custo vem em seu processamento, visto que eles geralmente contêm grandes quantidades de ácidos graxos livres que não podem ser convertidos em biodiesel usando um catalisador alcalino (DEMIRBAS, 2008).

O biodiesel é um combustível líquido alternativo ambientalmente amigável que, eficientemente valorizado para fins energéticos, poderia beneficiar não apenas o meio ambiente, mas também a população local, potencialmente gerando empregos e provendo uma opção energética para os veículos das comunidades rurais (DEMIRBAS, 2008).

No Brasil, a produção desse combustível renovável vem aumentando anualmente, Como exemplo, a produção no ano de 2017 foi 12,9% superior à do ano de 2016, atingindo 4,3 milhões de m³. Na visão estadual, o Rio Grande do Sul ainda é o maior produtor de biodiesel, sendo responsável pela produção de 26,5% do total nacional. Porém, a produção de biodiesel no Brasil ainda apresenta lacunas, visto que, em 2017, o país possuía uma capacidade nominal de produção de 7,6 milhões de m³, ao passo que a produção real foi apenas 56,2% da capacidade total (ANP, 2018).

2.3 POLUIÇÃO DO SOLO

Um poluente é definido por qualquer substância nociva ao meio ambiente que seja transportada intencional ou acidentalmente para o solo. A categorização dos poluentes, segundo suas propriedades físicas e químicas pode auxiliar na seleção de métodos mais adequados de tratamento e remediação para o solo contaminado. Obviamente, fatores como a escala de poluição e restrições financeiras podem interferir e/ou modificar as estratégias de remediação (MIRSAL, 2008).

Resultados de amostragem e investigação química fornecem informações para determinar as dimensões espaciais da contaminação, podendo-se então classificá-las como poluição localizada e poluição difusa. Os casos de poluição localizada são resultantes de acidentes com derramamentos, onde se conhece o material derramado e os riscos são minimizados caso medidas rápidas sejam adequadamente tomadas. Considera-se também casos de poluição localizados vazamentos de tanques, aterros sanitários ou instalações industriais antigas, ou seja, casos em que fonte de poluição é conhecida e a concentração do poluente diminui conforme o aumento da distância da fonte (MIRSAL, 2008).

Já em caso de poluição difusa, as dimensões de transporte e difusão dependem da saturação do solo e de seu caráter hidráulico e litológico, visto que os poluentes que entram no solo tentarão se espalhar nas direções horizontal e vertical. Quando os mesmos chegam ao lençol freático, a dimensão da poluição passará a depender do caráter litológico do aquífero. Sendo assim, contaminantes que vêm se infiltrando e acumulando no solo por longos períodos, tendem a formar poluições de elevada escala que podem se estender por enormes dimensões espaciais, as quais não são localizadas ou caracterizadas por padrões de fonte e fluxo, fazendo com que a caracterização, mapeamento e remediação necessitem de planejamento mais detalhado e maior número de instalações técnicas do que casos localizados (MIRSAL, 2008).

2.3.1 Contaminação do solo com combustíveis

A contaminação de solo por combustíveis vem sendo cada vez mais recorrente no cenário mundial, seja essa por meio de grandes derramamentos, ou simples vazamentos. Esses vazamentos geralmente ocorrem a partir de tanques subterrâneos de armazenamento e tubulações presentes nos postos de combustível devido a falhas estruturais, instalações inadequadas e, principalmente, à corrosão e rachaduras em tanques e tubulações (TIBURTIUS et al., 2004). Tendo em vista a enorme quantidade desse tipo de estabelecimento que estão em funcionamento (cerca de 42 mil apenas em território brasileiro, segundo a ANP), os vazamentos se encontram entre as principais fontes de contaminação em centros urbanos (JACQUES et al., 2007), resultando em fontes persistentes de poluição (FORTE et al., 2007; GUEDES et al., 2011). Sendo assim, é comum a detecção de compostos do petróleo como contaminantes em solos, sedimentos e águas subterrâneas (JACQUES et al., 2007; WEELINK et al., 2010).

No cenário brasileiro, estudo da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2014) apontou que 72% de todos os casos de contaminação ocorridos naquele estado desde 2002 (5.942) foram provenientes de atividades de postos de combustíveis. Situação essa, semelhante à ocorrida no Estado de Minas Gerais (MG), onde 73% das áreas contaminadas foram relacionadas a esse tipo de fonte (Fundação Estadual do Meio Ambiente - MG, 2015). No Rio Grande do Sul (RS), o órgão ambiental gaúcho (Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler – FEPAM) se atém mais a acidentes de grandes proporções (GOUVEIA e NARDOCCI, 2007). Porém, segundo estudos feitos por Soares (2015), cerca de 16% dos postos de combustíveis no RS (com exceção dos localizados em Porto Alegre), sofrem ou já sofreram algum acidente de contaminação ambiental.

Ainda, vazamentos e derramamentos acidentais podem ocorrer durante a exploração, produção, refino e transporte de petróleo e seus derivados. No Brasil, a distribuição de petróleo, derivados de petróleo e álcool etílico é feita por meio de 52 terminais, trinta aquaviários e vinte e dois terrestres, treze refinarias, seis centros coletores de álcool, e vários dutos. O combustível é transportado dos terminais para o resto do país por meio de caminhões-tanque, os quais são diariamente abastecidos com gasolina e óleo diesel, podendo também acarretar em pequenos vazamentos tanto no processo de abastecimento (VIEIRA et al., 2007), quanto no de transporte, já que, muitas vezes, há uma grande distância entre o local de extração, as refinarias e os centros de distribuição (PEREIRA e FERREIRA, 2014).

A redução das concentrações de hidrocarbonetos em meio contaminado por vazamentos acidentais de combustíveis líquidos é um grande desafio, já que métodos químicos e mecânicos têm eficácia limitada e podem ser caros, devido à complexa composição dos mesmos. Sendo assim, diversas investigações exploram a utilização de microrganismos para decompor produtos provindos da indústria petrolífera, com resultados promissores (ANDREOLLI et al., 2014; CHACHINA, VORONKOVA e BAKLANOVA, 2016; GHOREISHI et al., 2017).

2.4 ORGANISMOS DO SOLO

Segundo Mirsal (2008), os organismos do solo são usualmente classificados em produtores, consumidores e decompositores, conforme suas atividades biológicas. Os decompositores são responsáveis pela formação da base da cadeia nutritiva entre os três grupos pois, através da degradação de resíduos orgânicos, liberam ao ambiente os recursos primários utilizados pelos produtores para sintetizar material nutritivo complexo, que por sua

vez será consumido pelo grupo de consumidores. Todos os três grupos trabalham em conjunto para a dinâmica dos processos edáficos, que por sua vez define a qualidade do solo.

A problemática acerca de acidentes e vazamentos de combustíveis, principalmente aqueles derivados do petróleo, engloba os efeitos negativos que estes podem provocar nos ambientes, à biota que habita estes locais e exerce inúmeras funções ecológicas que permitem a manutenção dos próprios ecossistemas e, obviamente ao ser humano. No caso dos solos, estudos reportam efeitos sobre a fauna (SOUZA et al., 2013; GOSPODAREK e RUSIN, 2015; GOSPODAREK, PETRYSZAK e KOŁOCZEKC et al., 2016). Ainda, a contaminação por hidrocarbonetos pode ocasionar deficiências na germinação de sementes, na sobrevivência e no crescimento de plantas (LABUD et al., 2007; NJOKU, AKINOLA e TAIWO, 2009; BONA et al., 2011).

Além do efeito direto, os hidrocarbonetos do petróleo podem ser incorporados e bioacumulados em tecidos ricos em proteínas e gorduras da flora e fauna do solo, sendo transferidos através da cadeia alimentar, prejudicando humanos e animais, para os quais estes compostos apresentam potenciais tóxicos e/ou mutagênicos e carcinogênicos, como é o caso do benzeno, que vem sendo reconhecido agente causador de leucemia em humanos (TIBURTIUS et al., 2004). Ainda, outro fator importante a ser considerado, é adição de compostos sintéticos e naturais aos combustíveis (aditivos) que possam prejudicar a ação microbiana e intoxicar seres vivos (BLOCH, 2000).

Em relação ao biodiesel, mesmo que seus componentes sejam menos tóxicos e mais biodegradáveis que os hidrocarbonetos de petróleo, o risco à biota ainda é considerável caso haja algum derramamento e/ou vazamento, dado seus potenciais genotóxicos e mutagênicos (LEME et al., 2012).

2.4.1 Microbiota do solo

Os principais grupos de organismos presentes em abundância nos solos são as bactérias e os fungos. As bactérias são organismos procariotos, usualmente apresentando elevadas taxas de reprodução, fazendo-se presentes em números bastante elevados (10^{12} - 10^{15} m⁻²), geralmente nos filmes de água em torno das partículas do solo. O papel das bactérias no solo é bem amplo. Em sua maioria, bactérias são heterotróficas, participando dos processos de decomposição de uma ampla gama de materiais orgânicos sob várias condições. Outros grupos são autotróficos, realizando fotossíntese (como as cianobactérias), ou quimiossíntese (como as bactérias nitrificantes). Ainda, outras propriedades são observadas somente em

poucos grupos de bactérias, como a capacidade de fixar nitrogênio, produzir metano, entre outras (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os fungos têm como principal característica suas estruturas filamentosas (hifas), com diâmetro de cerca de 0,5 a 10 µm de diâmetro, que crescem em uma rede densa (micélio). Há ainda os fungos unicelulares, denominados genericamente de leveduras. Os microrganismos desse grupo dependem de material nutritivo sintetizado por outros organismos para suprir suas necessidades de carbono, ou seja, são heterotróficos, e vivem principalmente nas camadas superficiais do solo, preferivelmente em condições ácidas, porém também podem ser encontrados vivendo simbioticamente em tecidos vegetais. Caso se encontrem em condições favoráveis, os fungos podem ser responsáveis por até 80% da matéria orgânica do solo (MIRSAL, 2008).

Esses dois grupos de microrganismos são os maiores responsáveis pela transformação de substâncias no solo, sejam naturais ou xenobióticas, como por exemplo, a degradação e mineralização de compostos orgânicos, o que contribui para o equilíbrio dos ecossistemas (MIRSAL, 2008). Alguns fatores fazem com que as bactérias sejam mais capazes de degradar substâncias do que os fungos, quais seja, uma maior diversidade e versatilidade metabólica (SANOMIYA e NAHAS, 2003), maior velocidade de crescimento e menores exigências nutricionais (CARDOSO, TSAI e NEVES, 1992).

A microbiota dos solos, assim como a fauna e a flora, pode sofrer impactos negativos diretos da presença de combustíveis, especialmente aqueles obtidos do petróleo, que afetam a diversidade, a abundância e a estrutura da microbiota dos solos (LI et al., 2007; SHENG et al., 2016). Apesar de altos níveis de contaminação potencialmente diminuírem o número de microrganismos e alterarem o perfil das comunidades e dos processos microbianos (MEYER et al., 2012), há microrganismos denominados hidrocarbonoclasticos, ou seja, que possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos derivados do petróleo. Esses microrganismos, além de conseguirem sobreviver aos impactos gerados pelos poluentes, podem utilizar estes compostos como fonte de carbono e energia em condições de estresse (LABUD et al., 2007).

Conforme Grady (1985), a degradação dos compostos xenobióticos ocorre por duas diferentes classes de microrganismos. Os primários metabolizam a substância principal disponível no sistema, enquanto que os secundários metabolizam apenas aqueles produtos provindos de substâncias metabolizadas pelo primeiro grupo.

Rahman et al. (2002) apontam que a capacidade e velocidade da metabolização microbiológica dos compostos poluentes presentes no ambiente dependem da estrutura química e da biodisponibilidade dos mesmos, fazendo então com que alguns compostos sejam

biodegradados rapidamente e outros persistam no ambiente. Ainda, o sucesso do processo de degradação microbiana irá depender não apenas dos fatores ambientais, mas obviamente da diversidade genética da microbiota, com genes que potencialmente codifiquem características para a metabolização dos poluentes em situações de contaminação (ROJO, 2009).

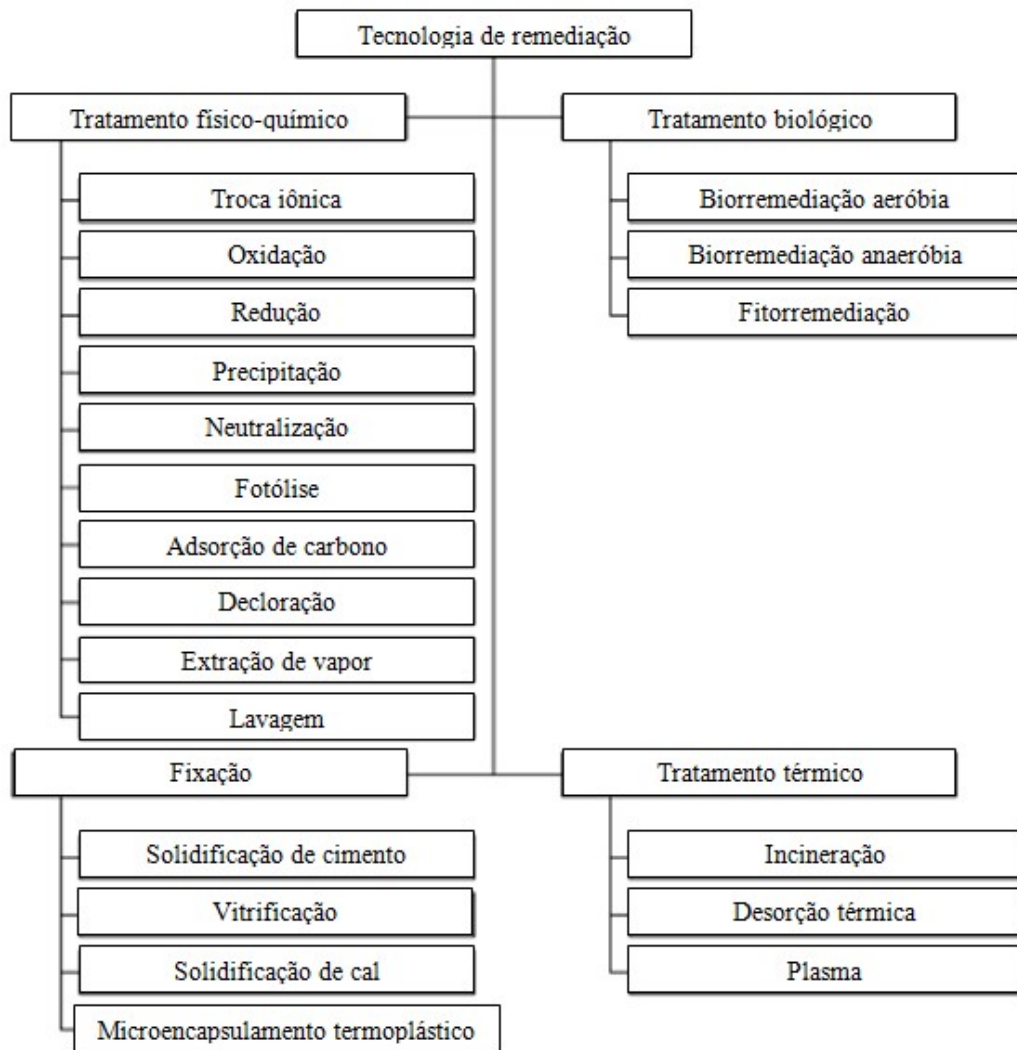
2.5 TECNOLOGIAS DE REMEDIAÇÃO

As tecnologias de remediação são técnicas, sejam essas químicas, físicas ou biológicas, que são aplicadas a locais que sofreram algum tipo de contaminação, geralmente solo ou água, visando a redução dos teores de contaminantes de modo que estes se encontrem em níveis baixos o suficiente para não representar risco à saúde humana. Além da redução, algumas tecnologias também objetivam imobilizar ou dificultar a disseminação de substâncias nocivas ao ambiente (TAVARES, 2013).

A tomada final de decisão em relação a qual tecnologia de remediação aplicar irá depender de alguns fatores como a escala de poluição, o nível de risco e as restrições financeiras e de tempo no projeto de remediação. Se estes forem favoráveis, o tratamento do solo pode ocorrer imediatamente (*in situ*), ou seja, no próprio local em que houve a contaminação. Caso essa opção não seja possível, o solo contaminado pode ser transportado e disposto em um local preparado (*ex situ*), visando principalmente evitar a propagação da contaminação (MIRBAS, 2008).

Além da classificação conforme o local em que ocorrem, as técnicas de remediação também podem ser segregadas de acordo com a natureza das mesmas, em métodos químicos e físicos, métodos biológicos, métodos de fixação (armazenamento e imobilização), métodos de destruição térmica. Na Figura 1 está representado um esquema das principais técnicas de remediação utilizadas em cada um destes quatro grupos.

Figura 1 – Principais tecnologias de remediação



FONTE: Adaptado de Mirsal (2008).

Para a aplicação dos métodos apresentados acima, pode-se necessitar diferentes tipos de locais, visto que alguns podem exigir instalações técnicas específicas (tanques e leitos preparados), outros podem ser aplicados no local na contaminação (*in situ*), e ainda para outros há a possibilidade de uso de todos os três modos operacionais de remediação. Na Tabela 2 estão representados, genericamente, os melhores modos de aplicação para cada uma das técnicas acima mencionadas.

Tabela 2 – Diferentes modos operacionais com suas técnicas de remediação correspondentes.

| Modo operacional | Técnica de remediação adequada |
|---|--|
| <i>In situ</i> | Extração a vácuo, lavagem |
| <i>In situ</i> ou em leitos preparados | Adsorção de carbono, troca iônica |
| <i>In situ</i> ou em tanques | Decapagem térmica, decloração, solidificação de cimento, vitrificação, solidificação de cal, microencapsulamento termoplástico |
| Todas (<i>in situ</i> , em tanques ou em leitos) | Neutralização, oxidação, biorremediação (todos os métodos) |
| Em leitos preparados | Fotólise |
| Em leitos preparados ou em tanques | Precipitação, redução, adsorção de carbono, troca iônica |
| Em tanques | Pirólise, infravermelho, forno rotativo, leito fluidizado, lavagem |

FONTE: Boulding (1995) *apud* Mirsal, 2008 (adaptado).

Conforme apresentado na Tabela 2, observa-se que tecnologias como extração a vácuo e lavagem do solo são feitas principalmente *in situ*, enquanto todos os métodos de biorremediação são adequados para todos os modos operacionais, fato esse interfere fortemente no planejamento financeiro do projeto de remediação. Porém, o fator que deve ser levado mais em conta é a eficácia do método em relação ao tipo de contaminação que necessita ser remediada.

2.5.1 Biorremediação

Esta técnica baseia-se, fundamentalmente, no uso de microrganismos de ocorrência natural no solo, geralmente bactérias e leveduras, capazes de degradar materiais tóxicos através de suas atividades metabólicas. A biorremediação é uma ótima opção de escolha como técnica de descontaminação, pois é um método que, usualmente, resulta na conversão de contaminantes orgânicos, como derivados de petróleo ou outros combustíveis, em dióxido de carbono e água. Além disso, algumas bactérias são capazes de digerir uma ampla gama de

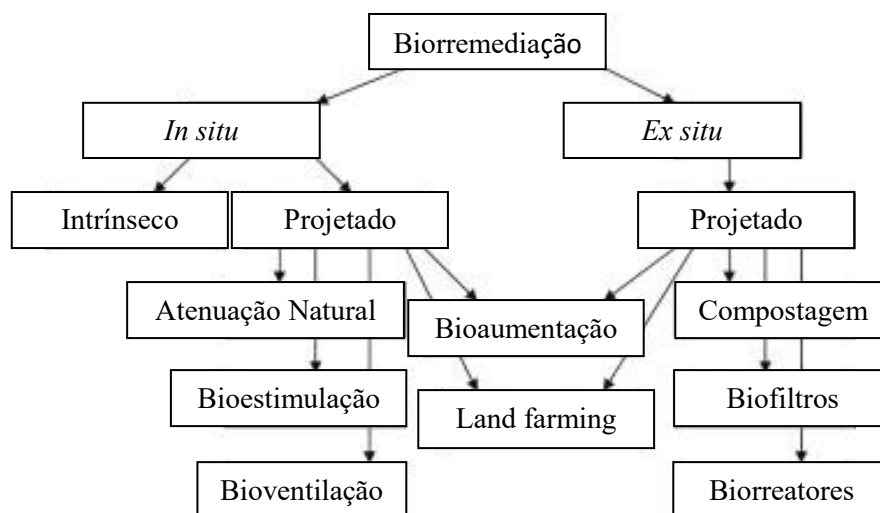
contaminantes orgânicos que são separados e degradados de forma eficaz por outras técnicas de remediação (PRYBUTOK e SPINK, 1999; MIRBAS, 2008; NEUHAUSER et al., 2009).

A biorremediação tem inúmeras aplicações, incluindo a limpeza de águas subterrâneas, solos, lagoas, lamas e fluxos de resíduos de processo (BOOPATHY, 2000). Para essa técnica seja eficaz, além de fatores ambientais adequados, necessita-se microrganismos apropriados, ou seja, que têm as capacidades fisiológicas e metabólicas para degradar os poluentes. A biorremediação pode ser feita no local, é geralmente mais barata e os impactos causados no local a ser tratado é mínima, tendo maior aceitação pública (BOOPATHY, 2000; ROJO, 2009; LV et al., 2018).

Entretanto, uma desvantagem da biorremediação é o tempo necessário para degradação completa do contaminante, visto que pode ser mais demorado do que outros métodos. Este tempo dependerá do local onde a técnica for aplicada, ao passo que as tecnologias *ex situ* são normalmente mais rápidas e mais eficazes que os processos *in situ* (MIRBAS, 2008). Além disso, a biorremediação não pode ser utilizada para qualquer tipo de contaminante, visto que a biodegradação de alguns produtos químicos como metais pesados e alguns compostos clorados, não é possível. Devido à necessidade dos microrganismos envolvidos na biorremediação de se adaptarem às condições específicas do local, é de suma importância a realização de estudos em relação ao meio a ser remediado, antes dessa técnica ser implantada.

A Figura 2 apresenta um esquema dos processos mais comuns para a biorremediação de solos poluídos e as relações que os conectam.

Figura 2 – Diagrama esquemático das diferentes tecnologias de biorremediação.



FONTE: Adaptado de Mrozik e Piotrowska-Seget (2010).

2.5.1.1 Técnicas de biorremediação *ex situ*

Apesar de serem mais rápidas e aplicáveis a uma maior gama de contaminantes, as tecnologias de biorremediação *ex situ* são mais caras que as tecnologias *in situ*, e podem às vezes necessitar de pré-tratamento e algumas medidas de pós-tratamento, para alcançar a eficácia ideal. Essas técnicas consistem em dois métodos principais (MIRBAS, 2008):

- i. *Tratamento em fase de lama*: aqui o solo é retirado do local de contaminação e encaminhado a uma instalação específica, onde será misturado com água em tanques especiais denominados biorreatores. Posteriormente, adiciona-se oxigênio e nutrientes à mistura formando um *slur* fino. A temperatura e as concentrações de nutrientes e oxigênio são controladas visando proporcionar as melhores condições para sustentar as atividades biológicas dos organismos, levando à degradação dos poluentes;
- ii. *Tratamento em fase sólida*: neste o solo é tratado em canteiros preparados acima do solo, espalhado ou em pilhas altas, podendo haver inserção de ar ou adição de nutrientes ou outros materiais, como a palha, para facilitar a circulação de ar e água necessários para as atividades biológicas dos microrganismos.

2.5.1.2 Técnicas de biorremediação *in situ*

Caracterizam-se pelo fato de o tratamento ocorrer no local contaminado, sem necessidade de transportar o solo para alguma planta ou local específico, fazendo então com que sejam as técnicas mais baratas de remediação do solo. Estas podem ser realizadas com a inserção de aditivos no solo a fim de acelerar a biodegradação dos contaminantes, ou apenas pelo monitoramento da atividade microbiana já presente no meio. A biorremediação *in situ* é principalmente utilizada para o tratamento de compostos orgânicos semi-voláteis não halogenados, como óleo diesel e óleos pesados (WU et al., 2016).

2.5.1.2.1 *Atenuação natural monitorada*

Esta tecnologia representa um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos sem intervenção humana, que reduzem a massa, toxicidade, mobilidade, volume ou concentração de contaminantes no solo. A biodegradação ocorre por meio da adaptação natural da microbiota nativa do solo à presença do contaminante, assim como por processos

químicos e físicos (oxidação, lixiviação, volatilização) que podem também diminuir a concentração do poluente (YU et al., 2005; SANTOS et al., 2009; LV et al. 2018).

A principal vantagem dessa técnica de biorremediação é a redução dos custos totais em relação às tecnologias de bioestimulação e bioaugmentação, descritas abaixo, o que se torna algo bastante relevante para remediação de áreas impactadas em países em desenvolvimento onde a questão ambiental é frequentemente deixada em segundo plano por ausência de recursos para este fim. Porém, por outro lado, o tempo de processo associado à Atenuação Natural Monitorada é geralmente maior do que aquele o associado à processos de biorremediação *in situ* ou *ex situ* (SANTOS et al., 2009; SILVA e CORSEUIL, 2012; WANG et al., 2012).

2.5.1.2.2 Bioestimulação

Conforme apresentado por Adams et al. (2015), a bioestimulação consiste em uma alteração do ambiente onde os microrganismos estão inseridos visando uma estimulação da atividade dos mesmos. Essa alteração pode ser realizada por meio da adição de nutrientes limitantes e receptores de elétrons, como fósforo, nitrogênio, oxigênio ou carbono, que não estejam em quantidade suficiente e limitem uma atividade microbiana mais eficiente. Ainda, essa técnica pode ser aplicada por meio da otimização de condições como pH e controle de temperatura. Para que a bioestimulação seja eficaz é necessária a avaliação tanto da capacidade de degradação intrínseca da microbiota autóctone como dos parâmetros ambientais envolvidos na cinética do processo *in situ* (YU et al., 2005; KAUPPI, SINKKONEN, ROMANTSCHUK, 2011; SAYARA et al., 2011; TACCARI et al., 2012; ABED et al., 2014).

A principal vantagem dessa tecnologia é que a biorremediação será realizada por microrganismos nativos já presentes, que já estão adaptados ao ambiente e bem distribuídos espacialmente na subsuperfície. Por outro lado, o principal desafio é a distribuição dos aditivos de modo com que estes estejam uniformemente disponíveis para a microbiota. Solos mais argilosos e impermeáveis dificultam a difusão dos aditivos em toda a área afetada, assim como fraturas na subsuperfície criam caminhos preferenciais e impedem a distribuição uniforme desses nutrientes. Além disso, outra desvantagem indireta é a possibilidade da adição de compostos também promover o crescimento de microrganismos heterotróficos que

não são biodegradadores do poluente presente, criando assim uma competição entre a microbiota indígena do solo a ser tratado (YU et al., 2005; ADAMS et al., 2015).

2.5.1.2.3 Bioaugmentação

A bioaugmentação é entendida como a adição de microrganismos degradadores para suplementar as populações indígenas, para o caso destas não apresentarem a capacidade muito elevada de degradação dos contaminantes ou estejam em estado de estresse como resultado da recente contaminação. Ainda, a bioaugmentação pode ser uma opção quando se visa um aumento na velocidade do processo de degradação quando a microbiota indígena degradadora apresenta baixas densidades populacionais (ADAMS et al., 2015; MROZIK e PIOTROWSKA-SEGET, 2010).

Em concordância com Adams et al. (2015), o sucesso da bioaugmentação depende do uso de inóculos que consistem em linhagens microbianas ou consórcios microbianos que bem adaptados ao local a ser remediado. A eficiência dos microrganismos não autóctones depende da capacidade de competir com microrganismos nativos, tolerar ou resistir a vários outros fatores bióticos e abióticos que possam afetar sua proliferação, além da habilidade de adaptação à estrutura química e concentração de poluentes. O ambiente físico, a densidade e a natureza da população microbiana também devem ser levados em consideração na triagem dos microrganismos a serem aplicados (RUBERTO et al., 2003; MARIA et al., 2011; TACCARI et al., 2012; WU et al., 2013).

Um dos problemas relacionados à utilização da bioaugmentação é a dificuldade de se inocular o solo uniformemente de modo com que os microrganismos adequados estejam bem distribuídos por todos os locais desejados, dificultando o tratamento em ambientes subsuperficiais. Os solos têm potencial para o transporte microbiano, mas a adesão celular à matéria orgânica limita fortemente sua distribuição (MROZIK e PIOTROWSKA-SEGET, 2010; WU et al., 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Cerro Largo/RS*.

3.2 ISOLADOS BACTERIANOS

As bactérias utilizadas neste trabalho foram previamente isoladas a partir de experimentos de contaminação do solo com óleo diesel comercial, realizados em microcosmos. Os isolados vêm sendo mantidos em placas de Petri contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA) sob refrigeração (4 °C). A cada 30 dias os isolados são repicados, para manutenção, em novas placas de PCA.

Os isolados foram inoculados por esgotamento em placas de PCA e cultivados a 30 °C por 24-48 h. A biomassa bacteriana produzida nas placas de PCA (crescimento bacteriano) foi empregada nos testes de degradação de combustíveis e produção de surfactantes. Na Tabela 3 estão apresentados os microrganismos utilizados, classificados conforme sua morfologia celular e perfil tintorial de Gram.

Tabela 3 – Microrganismos utilizados neste trabalho.

| Isolado | Morfologia | Teste de Gram | Isolado | Morfologia | Teste de Gram |
|----------------|-------------------|----------------------|----------------|-------------------|----------------------|
| NI 1 | bastonete | - | NI 18 | bastonete | + |
| NI 2 | coco | + | NI 20 | bastonete | + |
| NI 3 | bastonete | + | NI 21 | bastonete | + |
| NI 12 | bastonete | - | NI 28 | bastonete | + |
| NI 13A | bastonete | + | NI 32B | bastonete | + |
| NI 17 | bastonete | + | NI 32C | bastonete | - |

FONTE: Autor, 2018.

3.3 PREPARO DOS COMBUSTÍVEIS

Óleo diesel e gasolina comerciais foram adquiridos em postos de combustíveis da região, e o biodiesel em uma empresa agroindustrial, também regional. Esterilizaram-se os

combustíveis por filtração (membranas de 0,22 μm) e, após, armazenou-se os mesmos em temperatura ambiente, acondicionados frascos de vidro estéreis envoltos em papel alumínio para evitar a foto-oxidação.

3.4 HABILIDADE DEGRADADORA DE COMBUSTÍVEIS E PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

3.4.1 Preparo do inóculo

Placas de PCA cultivadas com o respectivo isolado bacteriano foram utilizadas para o preparo do inóculo. Para tanto, coletou-se a biomassa bacteriana a partir das placas de PCA e esta foi adicionada a meio mineral Bushnell-Hass (composição, em g L^{-1} : sulfato de magnésio, 0,2; cloreto de cálcio, 0,02; fosfato monopotássico, 1,0; fosfato dipotássico, 1,0; nitrato de amônio, 1,0; cloreto férrico, 0,05; pH 7,0) (OBI; ATAGANA; ADELEKE, 2016), de maneira a formar uma suspensão bacteriana com densidade óptica de 0,1-0,2 unidades a 600 nm ($\text{OD}_{600} \sim 0,1-0,2$) em espectrofotômetro (MEYER et al., 2012).

Em seguida, os frascos contendo a suspensão bacteriana foram mantidos a 30 °C em estufa com agitação orbital (100 rpm), durante 24 h, para ocorrer a exaustão das reservas energéticas das bactérias (CERQUEIRA et al., 2012). Estas suspensões foram utilizadas para os experimentos descritos a seguir.

3.4.2 Avaliação de habilidade degradadora de combustíveis

A avaliação da capacidade degradadora de combustíveis foi realizada utilizando o indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (BRADDOCK e CATTERALL, 1999). O TTC é um acceptor artificial de elétrons e, indiretamente, sua redução indica a oxidação e utilização microbiana do substrato orgânico presente no meio, neste caso o combustível. A redução do TTC (incolor) resulta no composto formazan (coloração rósea), sendo que os resultados destes experimentos, realizados em triplicata, foram expressos como “positivo” ou “negativo” (SOUZA et al., 2016).

Esta avaliação ocorreu em microplacas de 96 poços, com volume útil de 300 μL por poço (CERQUEIRA et al., 2012). A essas microplacas adicionou-se 15 μL do combustível estéril, 270 μL de meio mineral estéril contendo TTC, e 15 μL de inóculo bacteriano, preparado como especificado no Item 3.4.1. Desta forma, o combustível foi única fonte de

carbonos e energia para crescimento bacteriano. As microplacas foram incubadas a 30 °C por 10 dias. A partir de avaliações visuais diárias, anotou-se o dia em que ocorreu a mudança de coloração do meio causada pela redução do TTC. Esse procedimento foi realizado para cada um dos três combustíveis, em triplicatas.

3.4.3 Avaliação de produção de biossurfactantes

Os isolados selecionados como degradadores, a partir dos experimentos com o indicador TTC, foram avaliados quanto à capacidade de produção de biossurfactantes. Inicialmente, utilizaram-se tubos de ensaio fechados com bucha de algodão (volume útil de 10 mL) para os cultivos. Considerando o volume útil, adicionou-se 500 µL de combustível estéril, 9 mL de meio mineral estéril e 500 µL de inóculo bacteriano, preparado como especificado no Item 3.4.1.

Após inoculação, os frascos foram incubados a 30 °C por 10 dias. A partir dos cultivos, alíquotas foram retiradas para avaliação da produção de biossurfactantes, que foi estimada através do índice de emulsificação e pelo nível de hidrofobicidade celular (CERQUEIRA et al., 2012).

3.4.3.1 Índice de Emulsificação (IE)

A avaliação do IE foi realizada na presença e na ausência de células, após cultivos em meio mineral contendo combustíveis. Para o preparo de solução sem células, os meios foram centrifugados (6.000 g por 15 min) e os sobrenadantes foram utilizados para avaliação do IE. Dois mL da respectiva suspensão dos cultivos (com ou sem células) foram adicionados a 2 mL de tolueno, em tubos de fundo chato. Os tubos foram agitados em vórtex por 2 min na agitação máxima e, então, deixados em repouso por 24 h. Após este período, o índice de emulsificação foi dado pela relação entre a coluna de emulsificado e a coluna de líquido total (RAZA et al., 2006), onde:

$$IE_{(24)} = (\text{altura da coluna emulsificada} / \text{altura total de líquido}) \times 100.$$

3.4.3.2 Medida da hidrofobicidade celular

O nível de hidrofobicidade celular foi realizado pelo método de Adesão Bacteriana a Hidrocarbonetos (BATH) (ROSENBERG, 1984). Para esse método, as células dos cultivos

em meio mineral contendo diferentes combustíveis foram coletadas por centrifugação (6.000 g por 15 min). A biomassa celular foi lavada duas vezes com tampão PUM (composição, em g L⁻¹: K₂HPO₄·3H₂O, 22,2; KH₂PO₄, 7,26; MgSO₄·7H₂O, 0,2; ureia, 1,8; pH 7,1) e resuspendida no mesmo tampão até atingir OD₆₀₀ entre 0,6 e 0,8 unidades. Uma alíquota de 2,4 mL das células suspensas foi agitada com 0,4 mL de tolueno, em tubos de vidro, por 2 min, usando vórtex. Os tubos permaneceram em repouso por 30 min para a separação de fases. Mensurou-se a densidade óptica da fase aquosa a 600 nm. A hidrofobicidade foi expressa pela percentagem de aderência das células à fase apolar, calculada da seguinte forma:

$$HC = [1 - (OD_{600} \text{ da fase aquosa} / OD_{600} \text{ inicial da suspensão de células})] \times 100.$$

3.4.4 Seleção dos melhores degradadores e constituição do consórcio bacteriano

Após análise dos resultados obtidos nos experimentos realizados com óleo diesel comercial, selecionou-se quatro isolados bacterianos que apresentaram melhores índices de degradação do combustível para preparo de um consórcio microbiano.

Para o preparo deste consórcio bacteriano, inoculou-se as respectivas bactérias em placas de Petri separadas contendo PCA, e então, as placas foram incubadas a 30 °C por 24 h. Após a incubação, a biomassa fresca foi transferida para Erlenmeyers contendo água destilada estéril até que o inóculo atingisse OD₆₀₀ de 1,5 unidades, mensurada em espectrofotômetro, para cada isolado bacteriano. Em seguida, volumes iguais de cada inóculo foram transferidos para um Erlenmeyer estéril, visando atingir quantidade similar de células de cada bactéria no inóculo final. Este consórcio foi imediatamente utilizado nos experimentos de bioaugmentação para a degradação de óleo diesel em microcosmos, como descrito a seguir.

3.5 EXPERIMENTOS DE BIORREMEDIAÇÃO

3.5.1 Amostra de solo

As amostras de solo foram coletadas no município de Cerro Largo/RS, em área próxima a posto de combustíveis sem histórico de vazamentos, na camada de 0-15 cm. Submeteu-se o solo à secagem (22 ± 5 °C por 2 dias) e o mesmo foi peneirado utilizando peneira com malha de 2 mm. Após homogeneização, este solo foi utilizado para a montagem

dos microcosmos. Na Tabela 4 estão apresentadas as principais características do solo utilizado.

Tabela 4 – Características físico-químicas do solo (0-15 cm) utilizado no experimento.

| Características | Determinação |
|---|---------------------|
| Matéria orgânica (%) | 2,9 |
| Argila (%) | 22,0 |
| Nitrogênio total (g kg ⁻¹) | 1,6 |
| Carbono orgânico (g kg ⁻¹) | 20,0 |
| S (mg dm ⁻³) | 11,7 |
| P-Mehlich (mg dm ⁻³) | 52,8 |
| K (mg dm ⁻³) | 264,0 |
| Cu (mg dm ⁻³) | 15,2 |
| Zn (mg dm ⁻³) | 69,2 |
| B (mg dm ⁻³) | 0,5 |
| CTC efetivo (cmol _c dm ⁻³) | 17,6 |
| CTC pH7 (cmol _c dm ⁻³) | 19,8 |
| Al (cmol _c dm ⁻³) | 0,0 |
| Ca (cmol _c dm ⁻³) | 12,8 |
| Mg (cmol _c dm ⁻³) | 4,1 |
| H + Al (cmol _c dm ⁻³) | 12,2 |
| pH (H ₂ O) | 6,6 |
| Índice SMP | 6,6 |

FONTE: Autor, 2018.

3.5.2 Preparo do contaminante

Utilizou-se como contaminante óleo diesel comercial, adquirido em posto de combustível da região. O mesmo foi submetido a esterilização por filtração (membranas de 0,22 µm). Após a filtração, armazenou-se o combustível em temperatura ambiente, em frascos de vidro esterilizados envoltos em papel alumínio para evitar foto-oxidação.

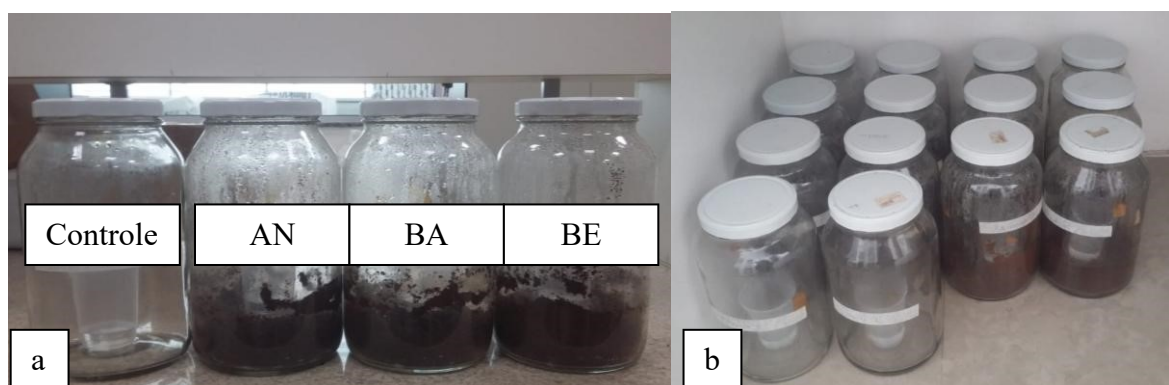
3.5.3 Montagem e incubação dos microcosmos

Os microcosmos foram montados utilizando frascos de vidro estéreis com tampa de fechamento hermético e capacidade de 3 L (Figura 6a). A cada frasco, adicionou-se 500 g de solo seco, garantindo assim que o oxigênio não fosse fator limitante para a microbiota. A umidade dos solos foi ajustada para 60% da capacidade de campo, através da adição de água destilada estéril. O solo foi contaminado com 5% de óleo diesel (massa do combustível em relação à massa de solo seco), sendo revolvido com espátula estéril para a homogeneização.

Foram mantidos microcosmos em quadruplicata para três diferentes tipos de tratamento: atenuação natural (AN), bioestimulação (BE) e bioaumentação (BA). No tratamento BE, adicionou-se 8,1 g de fertilizante NPK 10:10:10 a cada microcosmo, de modo a ser alcançada uma relação carbono nitrogênio (C/N) final de aproximadamente 12:1. No tratamento BA foram adicionados 5% de inóculo do consórcio bacteriano (massa do inóculo em relação à massa de solo seco). Em todos os microcosmos foi garantida a adição de mesmo volume de líquidos. Após as adições, os microcosmos foram revolvidos com espátula estéril para a homogeneização.

As incubações foram realizadas por 60 dias em temperatura ambiente, na ausência de luz (Figura 3b). A umidade gravimétrica foi monitorada ao longo do período de incubação do solo a partir de pesagens dos microcosmos, e água destilada estéril foi adicionada, quando necessário. Durante a incubação, revolvimentos periódicos foram realizados para a aeração dos microcosmos.

Figura 3 – (a) Quatro tipos de microcosmos montados. (b) Local de incubação.



FONTE: Autor, 2018.

3.5.4 Atividade respiratória

A atividade respiratória microbiana nos microcosmos (NA, BE e BA) foi avaliada com base na liberação cumulativa de C-CO₂ (ALEF, 1995). Para a captação do CO₂ liberado foi montado, em cada microcosmo, um sistema constituído de um recipiente plástico contendo 20 mL de NaOH (0,5 mol L⁻¹). Os microcosmos foram mantidos hermeticamente fechados, sendo abertos apenas para a substituição dos recipientes contendo NaOH e retirada de amostras de solo. Como provas em branco, foram utilizados dois frascos sem solo, mas contendo recipiente com NaOH.

Aos recipientes contendo NaOH retirados dos microcosmos adicionou-se 1 mL de solução de BaCl₂ (30%, m v⁻¹) e três gotas de fenolftaleína 1%. A quantidade residual de NaOH foi titulada com HCl (0,5 mol L⁻¹). A quantidade de C-CO₂ liberado foi determinada pela seguinte equação:

$$\text{C-CO}_2 \text{ (mg kg solo}^{-1}\text{)} = [(B - T) \times \text{eq} \times M_{\text{HCl}} \times F_c] / M_c$$

onde:

B = volume (mL) de HCl 0,5 mol L⁻¹ usado na titulação da prova em branco;

T = volume (mL) de HCl 0,5 mol L⁻¹ usado na titulação do tratamento (microcosmos);

eq = equivalente-grama do carbono (igual a 6);

M_{HCl} = concentração molar da solução padronizada de HCl;

F_c = fator de correção da molaridade de ácido/base (mol L⁻¹ HCl / mol L⁻¹ NaOH);

M_c = massa de solo seco (em kg) no microcosmo.

3.5.5 Determinação de microrganismos heterotróficos totais

Amostras de solo, periodicamente coletadas dos microcosmos (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias), foram diluídas serialmente em escala decimal, de 10⁻¹ a 10⁻⁸, em solução salina estéril (8,5 g L⁻¹ NaCl) e, em seguida, inoculou-se 20 µL destas diluições em 180 µL de Caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI) estéril contidos em poços de placas de poliestireno de 96 poços estéreis, em triplicata. As placas foram envoltas em papel alumínio e incubadas por 5 dias a 30 °C. Avaliações foram realizadas através da verificação da turbidez do meio, indicando crescimento microbiano. O Número Mais Provável (NMP) de microrganismos heterotróficos totais das amostras foi obtido por meio de tabela de referência (BLODGETT,

2010) e a quantificação de microrganismos foi expressa como Log NMP g⁻¹ solo seco, considerando o volume de amostra utilizado e o fator de diluição.

3.5.6 Extração do combustível a partir do solo e determinação gravimétrica

Amostras de solo foram retiradas dos microcosmos no início (tempo zero) e ao final das incubações (60 dias), armazenadas em frascos de vidro (estéreis e vedados), e mantidas em freezer até a extração. Para a extração, 10 g de solo de cada tratamento foram acondicionados em cartuchos de papel filtro, sendo adicionados 5 g de sulfato de magnésio anidro com o propósito de capturar a água presente na amostra e facilitar o processo de extração (MEDAURA e ÉRCOLI, 2008). Na sequência, os cartuchos foram fechados e realizou-se a extração com o auxílio de um extrator contínuo de óleos e graxas por imersão, do tipo Soxhlet (Marconi, modelo MA 044/850).

Copos reboilers, previamente lavados e mantidos em estufa por 24 h a 105 °C para secagem, foram alocados em um dessecador até atingirem temperatura ambiente e, então, foram pesados. Para a extração utilizou-se hexano (VILLALOBOS et al., 2008), adicionando-se 200 mL deste solvente em cada um dos copos. Em seguida, colocaram-se os cartuchos contendo as amostras nos berços do extrator e estes foram imersos nos balões com hexano.

A temperatura do extrator foi elevada gradativamente, para evitar superaquecimento, até chegar a 100 °C. Atingida a temperatura, os cartuchos permaneceram submersos por 4 h. Posteriormente, os berços foram suspensos dentro do sistema, o qual permaneceu fechado, para que houvesse o gotejamento por 30 min. Ao final, elevou-se a temperatura a 135 °C e o sistema foi aberto para permitir a recuperação do solvente (até 80%, conforme capacidade do equipamento), sem tempo limite para tanto.

Realizada a extração, retirou-se os copos do extrator e estes foram mantidos em estufa (60 °C) para evaporação do solvente até que atingissem massa constante. Os valores foram anotados e, através da média dos valores das extrações (realizadas de duplicata), mensurou-se gravimetricamente o residual extraído do combustível, subtraindo-se a massa dos frascos e também o valor da amostra controle, para cada tempo de incubação dos diferentes microcosmos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA HABILIDADE DEGRADADORA E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

4.1.1 Avaliação de habilidade degradadora em cultivos submersos

A avaliação de habilidade degradadora de microrganismos pode ser feita por meio da utilização de um combustível líquido como única fonte de carbono para o crescimento microbiano, na presença de indicadores redox, como o TTC (GOMES et al., 2016; OBI et al., 2016; SOUZA et al., 2016). Estes indicadores atuam como aceptores artificiais de elétrons que, quando reduzidos, indicam indiretamente que o substrato orgânico, neste caso os combustíveis, foram oxidados e utilizados como fonte de energia pela microbiota presente no meio (CERQUEIRA et al., 2012).

Na Tabela 5 está representado o tempo de incubação necessário para a mudança de coloração do meio, indicativa da redução do TTC, para cada um dos doze isolados testados com cada um dos três combustíveis (5%, v v⁻¹). Como esperado, devido à sua natureza mais biodegradável, os melhores resultados foram obtidos na incubação que utilizou o biodiesel como principal fonte de carbono. Todos os microrganismos foram capazes de degradar o biodiesel, sendo que para seis isolados o indicador mudou de coloração antes do 5º dia de incubação (Tabela 5).

Em relação aos combustíveis derivados de hidrocarbonetos de petróleo, dez dos doze isolados bacterianos apresentaram capacidade de degradação de óleo diesel comercial durante 10 dias de incubação e para a gasolina, nove dos isolados bacterianos demonstraram essa capacidade, cinco destes nos primeiros cinco dias de cultivo (Tabela 5).

Apesar de a gasolina apresentar 25 % de etanol (composto de mais fácil degradação) em sua composição, essa diferença entre os dois hidrocarbonetos talvez se deva à presença dos 10% de biodiesel que são adicionados ao óleo diesel vendido em território brasileiro, fazendo com o mesmo tenha uma parcela ainda mais biodegradável que a gasolina (BRASIL, 2016). Em tese, dentre os microrganismos testados, o isolado NI 17 foi o que apresentou melhor capacidade degradadora, visto que esta habilidade foi detectada para os três combustíveis até o quinto dia de incubação, sendo seguido por NI 13A e NI 21, que

demonstraram capacidade de degradação de todos os combustíveis, em períodos iguais ou superiores a cinco dias (Tabela 5).

Tabela 5 - Tempo de incubação necessário para mudança de coloração do TTC

| Isolado | Combustível | | |
|---------|-------------|--------|----------|
| | Biodiesel | Diesel | Gasolina |
| NI 01 | + | + | + |
| NI 02 | ++ | - | ++ |
| NI 03 | + | - | ++ |
| NI 12 | ++ | ++ | - |
| NI 13A | ++ | + | ++ |
| NI 17 | ++ | ++ | ++ |
| NI 18 | + | ++ | + |
| NI 20 | + | + | ++ |
| NI 21 | ++ | ++ | + |
| NI 28 | + | + | - |
| NI 32B | + | + | + |
| NI 32C | ++ | ++ | - |

–: sem mudança; ++: mudança de coloração até o 5º dia de incubação; +: mudança de coloração do 6º ao 10º dia de incubação. FONTE: Autor, 2018.

Experimentos semelhantes foram feitos por Cerqueira et al. (2012), que avaliaram a capacidade de redução do TTC em meio contendo óleo diesel (1% e 3%, v v⁻¹) por bactérias isoladas de ambientes contaminados por resíduos de petróleo. Dos 45 isolados bacterianos avaliados, 12 apresentaram resultados positivos. Resultados mais promissores foram encontrados por Meyer et al. (2012), que utilizaram em seus estudos uma mistura diesel/biodiesel como única fonte de carbono para bactérias isoladas de ambientes contaminados por hidrocarbonetos e ésteres. Neste estudo, de 24 bactérias, 10 apresentaram potencial de degradação. Ainda, estudos utilizando biodiesel em diferentes concentrações (B5, B10, B25 e B100) foram realizados por Souza et al. (2016). O isolado *Serratia marcescens* conseguiu reduzir o indicador em todas as misturas testadas, com o tempo variando de 1 a 7 dias de incubação.

Estes resultados indicam que os isolados bacterianos testados, possivelmente expostos aos hidrocarbonetos e biodiesel pela primeira vez, apresentaram capacidade de degradação dos mesmos, indicada por meio da redução do indicador redox TTC. Segundo Jacques et al. (2007) sugere-se que os isolados possuam mecanismo enzimático capaz de transformar os combustíveis em intermediários comuns das suas rotas catabólicas.

4.1.2 Avaliação de produção de biossurfactantes

Quando microrganismos apresentam a capacidade de degradar combustíveis, muitas vezes eles podem produzir moléculas conhecidas como biossurfactantes e bioemulsificantes, que são liberadas pelo microrganismo para o meio extracelular ou permanecem associadas às células. Os biossurfactantes atuam na redução da tensão superficial e os bioemulsificantes na formação de emulsões dos combustíveis em meio aquoso. Os bioemulsificantes são geralmente moléculas com massa molecular elevada que promovem a formação de emulsões óleo/água, fazendo com que aumente a solubilidade de hidrocarbonetos na fase aquosa e a desorção de hidrocarbonetos das partículas de solo (BENTO et al., 2008).

4.1.2.1 Medida da hidrofobicidade celular

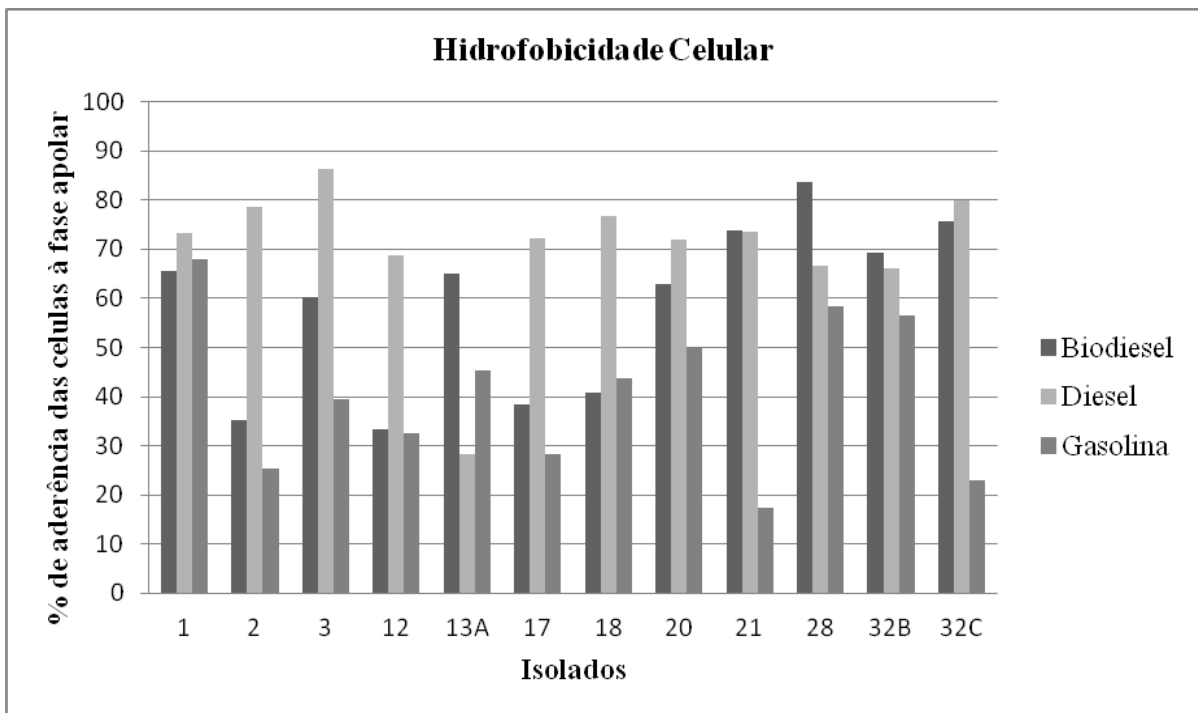
A hidrofobicidade tem grande importância na adesão inicial de microrganismos entre a fase aquosa e a fase hidrofóbica (combustíveis). Algumas espécies de bactérias procuram aderir-se às superfícies das gotículas dos combustíveis líquidos para melhor degradação, pois o contato direto entre as células bacterianas e o poluente aumenta o crescimento e a taxa de dissolução dos combustíveis, por meio do aumento da taxa de difusão para a célula (CERQUEIRA et al., 2012).

O ensaio utilizado permitiu avaliar o grau de hidrofobicidade da superfície celular através da porcentagem de células aderidas a compostos hidrofóbicos (CERQUEIRA et al., 2012). Os experimentos foram realizados utilizando os inóculos cultivados com os três diferentes combustíveis e o tolueno como molécula-teste, para que a comparação entre os mesmos fosse possível. Na Figura 4 estão apresentados os resultados obtidos.

As melhores medidas de hidrofobicidade foram observadas para células recuperadas de cultivos realizados com óleo diesel e biodiesel, tendo como médias 70,20% e 58,66%, respectivamente, ao passo que a média para cultivos realizados com gasolina foi de apenas 40,68%. Os melhores isolados para cada um dos combustíveis foram NI 28 para o biodiesel

(83,78%), NI 3 para o diesel (86,40%) e NI 1 para a gasolina (67,96%). De uma maneira geral, os isolados que apresentaram melhores medidas de hidrofobicidade celular foram NI 1, NI 20, NI 28 e NI 32B, que foram superiores a 50% para células cultivadas em todos os combustíveis.

Figura 4 - Medida da hidrofobicidade celular dos isolados cultivados em meio mineral contendo diferentes combustíveis (5%, v v⁻¹).



FONTE: Autor, 2018.

Cerqueira et al. (2012) testaram em seu estudo vinte diferentes linhagens bacterianas isoladas de solo contaminado com resíduos petroquímicos, tendo obtido resultados de hidrofobicidade celular que variaram de 5,6 a 46,5% para ensaios realizados com querosene, e de 9,4 a 34,8% para ensaios realizados com octano. Em outro estudo, quatro isolados bacterianos provindos de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo apresentaram medida de hidrofobicidade celular maiores de que 80% quando testados com óleo diesel (KHAN et al., 2017). Ainda, Wang e Han (2007) testaram quatro linhagens bacterianas isoladas de lagoas de criação de carpas utilizando *n*-octano, e a hidrofobicidade celular variou de 20 a 70%.

4.1.2.2 Índice de Emulsificação (IE)

A produção de bioemulsificantes é de suma importância no processo de biodegradação, pois permite que os microrganismos elevem a solubilidade dos hidrocarbonetos, incrementando, então, a assimilação e catabolismo dos contaminantes pelas bactérias (CERQUEIRA et al., 2012). Os doze isolados foram submetidos a ensaios para verificar a capacidade de produção de biossurfactantes, após serem incubados por 10 dias em meio mineral contendo apenas os combustíveis como substrato orgânico. Estes experimentos foram realizados com a presença e ausência de células. Os resultados dos índices de emulsificação (IE₂₄) são apresentados na Tabela 6.

A emulsificação dos combustíveis foi observada em todos os cultivos não centrifugados (com células), e na maioria dos cultivos centrifugados (sem células), indicando uma capacidade de produção de moléculas biossurfactantes por estes isolados bacterianos. Os ensaios realizados com biodiesel foram os que apresentaram maior quantidade de isolados com capacidade de produção dessas moléculas, visto que em apenas dois ensaios sem células não houve emulsão (Tabela 6).

Tabela 6 - Índice de Emulsificação (IE) dos isolados em porcentagem para os três diferentes combustíveis

| Isolado | Biodiesel | | Diesel | | Gasolina | |
|---------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Com célula | Sem célula | Com célula | Sem célula | Com célula | Sem célula |
| NI 01 | 55,56 | 52,38 | 55,00 | 47,62 | 50,00 | 47,62 |
| NI 02 | 50,00 | 47,62 | 66,67 | 42,86 | 45,00 | - |
| NI 03 | 50,00 | 47,62 | 55,00 | 55,00 | 45,00 | - |
| NI 12 | 47,62 | 47,62 | 57,14 | - | 45,00 | 19,05 |
| NI 13A | 57,14 | 52,38 | 63,64 | 40,00 | 47,62 | 38,10 |
| NI 17 | 70,00 | 65,00 | 63,64 | 40,91 | 50,00 | 38,10 |
| NI 18 | 73,68 | 66,67 | 71,43 | 47,62 | 60,00 | 36,36 |
| NI 20 | 55,00 | 45,00 | 60,00 | 42,86 | 55,00 | - |
| NI 21 | 55,00 | 40,91 | 71,43 | 45,00 | 52,38 | 42,86 |
| NI 28 | 45,00 | - | 57,14 | - | 50,00 | - |
| NI 32B | 60,00 | 40,00 | 60,00 | 42,86 | 60,00 | - |
| NI 32C | 47,62 | - | 45,00 | - | 47,62 | - |

FONTE: Autor, 2018.

Segundo Plaza, Zjawiony, E Banat (2006), emulsões são consideradas estáveis quando o IE₂₄ for maior ou igual a 50%. Nos ensaios realizados na presença de células, os isolados que apresentaram melhores resultados de IE₂₄ foram NI 17 (70,00%) e NI 18 (73,68%) para o

biodiesel, NI 18 (71,43%) e NI 21 (71,43%) para o óleo diesel, e NI 18 (60%) e NI 32B (60%) para a gasolina. Porém, esses resultados não se repetiram para os ensaios sem célula, sendo que dos citados acima apenas os isolados NI 17 e NI 18 apresentaram resultados estáveis quando testados com biodiesel, sugerindo que parte das moléculas com capacidade emulsificante estejam associadas à superfície celular.

Experimentos semelhantes foram realizados por Gomes et al. (2016) utilizando quatro diferentes tipos de fonte de carbono: diesel, querosene, óleo de soja e óleo mineral. Os resultados obtidos indicaram que, das 79 bactérias testadas, 78 apresentaram IE₂₄ superiores a 50% em pelo menos uma das fontes de carbono restadas. Já os resultados apresentados por Cerqueira et al. (2012) não foram estáveis quanto testados com resíduos petroquímicos, tendo como índices de emulsificação valores inferiores a 40%. Em outro estudo realizado por este mesmo grupo de pesquisa, foi possível observar, assim como o apresentado na Tabela 5, uma discrepância entre os índices de emulsificação obtidos nos experimentos centrifugados e não centrifugados, com valores variando de 23,3-40,0% e de 20,0-48,0% para testes realizados na ausência e presença de células, respectivamente (CERQUEIRA et al., 2011).

4.1.3 Seleção dos melhores degradadores

Obtidos os resultados de avaliação de capacidade degradadora e produção de biosurfactantes, os isolados que apresentaram, no geral, resultados mais promissores quando testados com óleo diesel (NI 1, NI 20, NI 28 e NI 32B) foram selecionados. Estes isolados constituíram um consórcio microbiano para os experimentos de biorremediação realizados em microcosmos de solo contaminados com 5% (m m⁻¹) de óleo diesel comercial.

4.2 EXPERIMENTOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Nesta parte do trabalho foram montados microcosmos em quadruplicata para três diferentes tipos de tratamento: atenuação natural (AN), bioestimulação (BE) e bioaumentação (BA). No tratamento BE, a relação carbono nitrogênio (C/N) no solo foi ajustada de modo que a relação final fosse aproximadamente 12:1 (ótima para a microbiota). Para tal, foram adicionadas 8,1 g de fertilizante NPK 10:10:10 em cada microcosmo. No tratamento BA foram adicionados 5% de inóculo do consórcio bacteriano (massa do inóculo em relação à massa de solo seco) preparado com as linhagens bacterianas selecionadas (NI 1, NI 20, NI 28 e NI 32B). No tratamento AN foi adicionado apenas o contaminante. Todos os tratamentos tiveram sua umidade ajustada para 60 % da Capacidade de Campo.

O objetivo desse experimento foi avaliar e comparar a capacidade de degradar óleo diesel comercial da microbiota autóctone de um solo sem registros de contaminação, de forma natural e estimulada. Além da comparação desta com a capacidade de degradação de microrganismos comprovadamente degradadores.

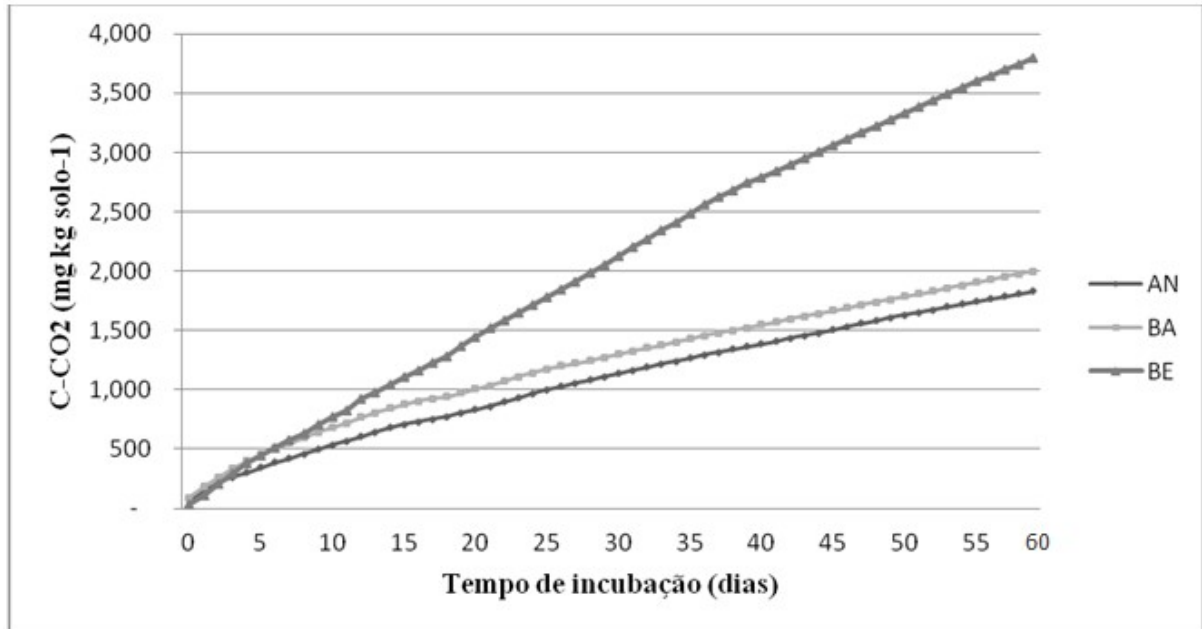
4.2.1 Atividade respiratória

Grande parte dos microrganismos encontrados no solo é heterotrófica, ou seja, tem suas necessidades energéticas supridas pela oxidação de compostos orgânicos, geralmente através de processos respiratórios. Esse processo usualmente resulta na produção de CO₂, fazendo com que seja comum a quantificação de atividades metabólicas de microrganismos através da liberação de desse gás a partir do solo (ALEF, 1995).

Segundo Mirsal (2008), as melhores condições para as atividades microbianas são fornecidas quando os poros do solo estiverem com umidade de até 60%, pois acima disso os mesmos não conseguem fornecer concentração de oxigênio suficiente para que os decompositores realizem de forma eficaz a degradação de materiais orgânicos. Algo parecido também ocorre em relação à temperatura, visto que as atividades microbianas dobram a cada aumento de 7-8 °C até certo limite (específico para grupos diferentes); após a temperatura ótima ser atingida, incrementos na temperatura passam a prejudicar as atividades biológicas. Ainda, a adição de certas substâncias no solo pode alterar as taxas de respiração, visto que a respiração tende a aumentar com a adição de matéria orgânica de baixa relação C/N (facilmente decomponíveis) ao solo.

Na Figura 5 está apresentada a mensuração da respiração microbiana acumulada durante os 60 dias de incubação dos microcosmos para os tratamentos de atenuação natural, bioaugmentação e bioestimulação testados. Percebeu-se que, nos primeiros dias, a quantidade de CO₂ liberado foi semelhante para os três tipos de microcosmos, com a discrepância entre eles aumentando a partir do quinto dia. De modo geral, naqueles tratamentos onde houve a adição de nutrientes ou microrganismos a respiração acumulada foi superior aos microcosmos com o tratamento de atenuação natural.

Figura 5 – Respiração microbiana acumulada durante 60 dias de incubação de microcosmos contaminados com óleo diesel comercial e submetidos aos tratamentos de atenuação natural (AN), bioestimulação (BE) e bioaumentação (BA).



FONTE: Autor, 2018.

Os maiores resultados de respiração acumulada foram obtidos no tratamento de bioestimulação, onde a respiração continuou elevada durante toda a incubação, sem aparente estabilização ao final dos 60 dias. A respiração acumulada na bioestimulação foi 1,9 vezes maior que na bioaumentação, e 2,1 vezes maior que na atenuação natural (Figura 5). Sendo assim, supõe-se que a microbiota autóctone do solo, ao ser estimulada, apresentou uma maior capacidade de degradação da matéria orgânica do solo, incluindo do óleo diesel adicionado, do que nos tratamentos onde houve bioaumentação.

Jiang et al. (2016) testaram dois tipos de solos, ambos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, com tratamentos de bioaumentação e bioestimulação. Em um dos solos avaliados (A), os autores encontraram valores de respiração maiores para o tratamento de bioestimulação em determinados tempos de incubação. No outro solo (B), os valores para a bioaumentação foram maiores, o que pode indicar uma maior capacidade de degradação da microbiota autóctone do solo A.

Em estudos realizados por Cerqueira et al. (2014), com solo contaminado com petróleo bruto, a respiração nos microcosmos de bioaumentação e bioestimulação se mantiveram praticamente iguais em todo o experimento (90 dias), sendo um pouco maior apenas que os resultados obtidos para a atenuação natural. Resultados diferentes podem ser

observados nos estudos feitos por Mancera-López et al. (2008), onde comparou-se a bioaumentação por quatro diferentes microrganismos, bioestimulação e atenuação natural de solo contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. A respiração microbiana demonstrou-se maior entre tratamentos para as quatro bactérias testadas, seguida pela bioestimulação e por fim a atenuação natural.

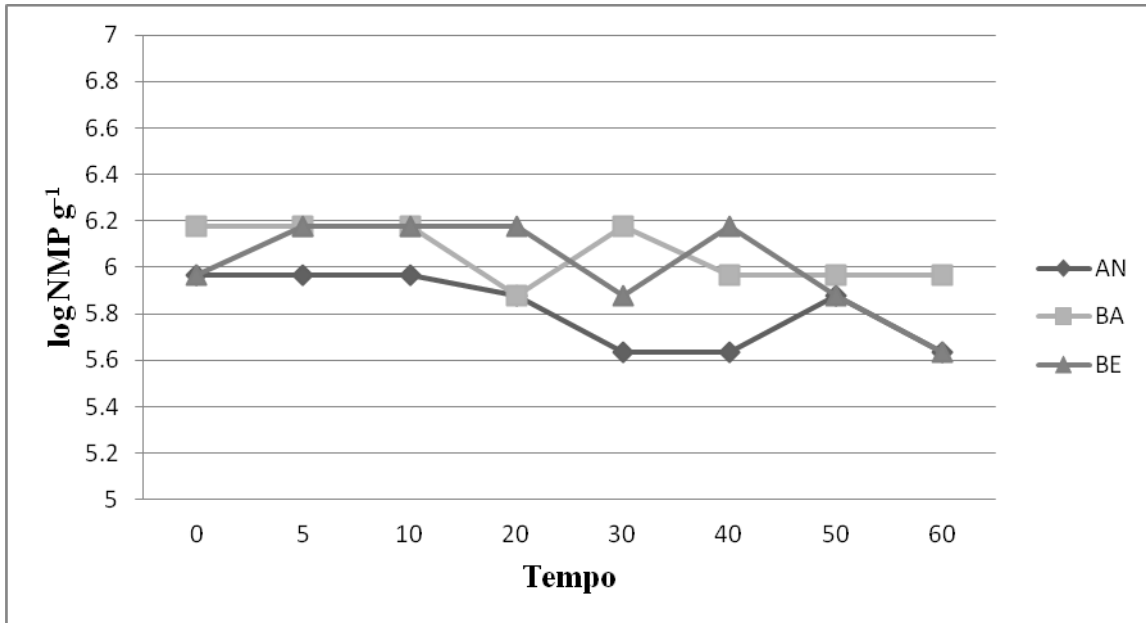
4.2.2 Microrganismos Heterotróficos Totais

Determinações do número de microrganismos heterotróficos totais no solo podem ser empregadas como estratégias de monitoramento, indicando efeitos positivos ou negativos sobre a microbiota do solo, após a mesma ser exposta a alguma contaminação (MARGESIN et al., 2000b). Durante a incubação dos microcosmos, o Número Mais Provável (NMP) de microrganismos heterotróficos das amostras foi avaliada por meio de tabela de referência (BLODGETT, 2010), e os resultados estão apresentados na Figura 6.

Como esperado, a contagem inicial foi maior nos tratamentos com a adição do consórcio microbiano (BA). Nota-se que não houve variações elevadas durante o período de incubação dos microcosmos nos diferentes tratamentos. No geral, as menores contagens foram observadas no tratamento AN. Quando feita a comparação entre os três tratamentos, foi possível observar que houve um maior número de microrganismos heterotróficos totais nos tratamentos contendo aditivos. Ao final da incubação dos microcosmos, a contagem se tornou a maior no tratamento BA.

Uma possível explicação para a diminuição de microrganismos ao passar do tempo para a AN e BA, é a morte de parte da microbiota sensível à contaminação (TACCARI et al., 2012). Ao fazer a análise os resultados da BE separadamente, nota-se um crescimento da microbiota no quinto dia fazendo com que este tratamento se igualasse à BA, caracterizando um efeito positivo ocasionado pela adição de nutrientes. A diminuição da microbiota no tratamento BE após o trigésimo dia de incubação pode ser atribuído à gradual diminuição de nutrientes no meio.

Figura 6 – Número mais provável de microrganismos heterotróficos totais durante 60 dias de incubação de microcosmos contaminados com óleo diesel comercial e submetidos aos tratamentos de atenuação natural (AN), bioestimulação (BE) e bioaumentação (BA).



FONTE: Autor, 2018.

Em experimentos realizados por Yu et al. (2005) em solo contaminado com hidrocarbonetos, a bioaumentação teve maior contagem de microrganismos no tempo 0 quando comparada com atenuação natural e bioestimulação. Porém se manteve maior apenas que a atenuação natural nos outros tempos analisados, com os valores de heterotróficos na bioestimulação se tornando maiores após a primeira semana de incubação e se mantendo assim até o final do experimento (28 dias).

O mesmo comportamento foi observado por Wu et al. (2016) em solo contaminado com petróleo. No entanto, a população microbiana dos tratamentos AN e BA se tornaram iguais ao final do experimento (7 semanas). Diferentemente, apesar de a atenuação natural ainda apresentar o maior número de heterotróficos totais, Cerqueira et al. (2014) observaram em seus estudos uma microbiota mais numerosa em solo bioaumentado em comparação com o bioestimulado durante 90 dias de incubação, com solo contaminado com 1,5% de óleo bruto de petróleo. Assim, sugere-se que a variância dos valores de MHT entre os tratamentos, se dá conforme as características da microbiota autóctone do solo e as características da microbiota que é adicionada no processo de bioaumentação.

4.2.3 Determinação gravimétrica

Durante a incubação dos microcosmos foram retiradas amostras de solo nos tempos 0, 30 e 60 para que fosse possível o monitoramento da biodegradação do combustível no solo. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Nota-se que a quantidade de combustível degradado condiz com os dados de respiração microbiana obtidos (Figura 8), visto que a maior degradação ocorreu no tratamento de bioestimulação (55,43%), seguido pela bioaumentação (47,28%) e, por fim, a atenuação natural (33,02%). Ainda, observou-se que a maior quantidade degradada ocorreu nos primeiros 30 dias de incubação dos microcosmos, podendo ser pelo fato de que moléculas mais facilmente degradáveis são degradadas primeiro e, portanto, mais rapidamente (JIANG et al., 2016).

Por outro lado, a diferença entre o tempo 30 e o tempo 60 foi mais elevada nos tratamentos de bioestimulação e bioaumentação, com 20,4 % e 19,2 %, respectivamente, ao passo que na atenuação natural a diferença foi de apenas 15,5%. Pode-se sugerir então, que a diminuição da velocidade de degradação ao decorrer do experimento tenha se dado pela diminuição de nutrientes disponíveis no meio após consumo pela microbiota, se tornando um fator limitante, e por consequência diminuindo a quantidade de microrganismos presentes no solo. (CERQUEIRA et al., 2014).

Tabela 7 – Porcentagem de degradação do óleo diesel comercial nos três tratamentos testados, após 30 e 60 dias de incubação dos microcosmos, em relação ao tempo 0.

| Tratamento | Degradação (%) | |
|--------------------------|----------------|---------|
| | 30 dias | 60 dias |
| Atenuação Natural | 17,50 | 33,02 |
| Bioaumentação | 28,09 | 47,28 |
| Bioestimulação | 34,97 | 55,43 |

FONTE: Autor, 2018.

Situação similar foi observada por Wu et al. (2016) em seus estudos, onde foram comparadas bioestimulação, bioaumentação e atenuação natural de solo contaminado por derivados de petróleo durante 10 semanas. As porcentagens de degradação foram de 60%, 34% e 16% para bioestimulação, bioaumentação e atenuação natural, respectivamente. Yu et al. (2005) também relataram que a bioestimulação foi a melhor opção entre os três

tratamentos (BE e BA) para degradação de pireno, chegando a quase 100% após quatro semanas de incubação, enquanto os outros tratamentos não passaram de 40% de degradação.

Diferentemente, nos experimentos realizados por Bento et al. (2005), utilizando solo contaminado com diesel provindo de Hong Kong, a atenuação natural prevaleceu, com 47,1% de degradação, contra 43,8% para BA e 35,3% para BE após 12 semanas de incubação. Neste mesmo estudo, em solo de Long Beach (Califórnia) também contaminado com diesel, a bioaugmentação foi o melhor tratamento, com 68,1% de degradação, seguido da BE (59,4%) e AN (36,3%), sugerindo então que o sucesso de cada técnica dependerá da natureza do solo a ser remediado.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados da avaliação do potencial degradador e produção de biossurfactantes demonstram que as doze linhagens bacterianas previamente isoladas de solo sem histórico de contaminação possuem capacidade de degradar os combustíveis comerciais gasolina 'C', óleo diesel e biodiesel. Devido à sua natureza mais biodegradável, os melhores resultados foram obtidos, em geral, nos testes feitos com biodiesel. Os resultados obtidos com o óleo diesel indicam sua maior suscetibilidade à degradação do que a gasolina, possivelmente devido à composição e menor toxicidade do diesel, visto que possui cadeias carbônicas mais longas e menor conteúdo de hidrocarbonetos aromáticos.

Esse cenário também indica que a microbiota presente no solo, de onde essas bactérias foram isoladas, possui a capacidade não apenas de tolerar, mas também de degradar contaminantes combustíveis em caso de algum derramamento, se tornando viável a utilização de técnicas como a atenuação natural, bioaugmentação e bioestimulação. Investigações subsequentes poderão indicar o potencial dos outros isolados bacterianos quanto ao seu potencial para utilização em processos de biorremediação de algum destes combustíveis, seja em consórcio bacteriano ou separadamente.

Em relação aos experimentos de biorremediação, a quantidade acumulada de CO₂ liberado foi superior nos tratamentos de bioestimulação. De forma similar, as contagens de microrganismos heterotróficos totais foram, no geral, similares nos tratamentos de bioestimulação e bioaugmentação. Estes resultados sugeriram que a melhor remediação estivesse ocorrendo nos tratamentos bioestimulados, e essa suposição foi confirmada pelas análises da massa residual do óleo diesel comercial nestes microcosmos, que demonstraram que mais da metade do contaminante foi degradada.

Em suma, para o solo em questão, os microrganismos autóctones têm uma melhor capacidade de degradação de óleo diesel comercial quando há um aumento dos nutrientes minerais (N, P e K) disponíveis no meio, caracterizando a bioestimulação como melhor opção de biorremediação. Apesar de não serem as mais eficientes, a atenuação natural e a bioaugmentação também demonstraram ser opções de tratamento para o solo testado.

REFERÊNCIAS

ABED, R. M. M., et al. Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments **International Biodeterioration and Biodegradation** 89, p. 58-66, 2014.

ADAMS, G. O., et al. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, Vol. 3, No. 1, 28-3, 2015.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro: ANP, 2015.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro: ANP, 2018.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Petróleo e Derivados**. ANP, 2018. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/petroleo-e-derivados2>> Acesso em: 04 de out. 2018.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Óleo Diesel**. ANP, 2017. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/petroleo-derivados/155-combustiveis/1857-oleo-diesel>> Acesso em: 06 de abr. 2018.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Dados estatísticos**. ANP, 2018. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/dados-estatisticos>> Acesso em: 06 de abr. 2018.

ALEF, K. Soil respiration. In: Alef K, Nannipieri P (Eds). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, p.214-219, 1995.

ANDREOLLI, M., et al. Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of a burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons: A comparative study. **Journal of Environmental Management** 153, p. 121-131, 2014.

BENTO, F. M., et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource technology** 96, p. 1049-1055, 2005.

BLODGETT, R. FDA, **Bacterial Analytical Manual**, Appendix 2 Most Probable Number from Serial Dilutions, 2010. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656>> Acesso em: 16 de abr. 2018.

BLOCH, H. P. Lubricant testing. BLOCH, H. P. In: **Practical Lubrication for Industrial Facilities**. 1. ed. Lilburn: **The Fairmont Press**. 2000. cap. 3, p. 33-90.

- BONA, C., et al. Effect of soil contaminated by diesel oil on the germination of seeds and the growth of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) seedlings. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 54, p. 1379-1387, 2011.
- BOOPATHY, R. Review: Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology** 74, p. 63-67, 2000.
- BRASIL. Lei n. 13.263, de 23 de março de 2016. **Adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional**. Brasília, DF, mar 2016.
- BRADDOCK, J. F.; CATTERALL, P. H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal** 3, p. 81-84, 1999.
- CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. Microbiologia do solo. 1. ed. Campinas, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 1992.
- CERQUEIRA V. S., et al. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology** 102, 11003-11010, 2011.
- CERQUEIRA, V. S., et al. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 28, p. 1203–1222, 2012.
- CERQUEIRA, V. S., et al. Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily slugde. **International Bioderiation & Biodegradation** 95, p. 338-345, 2014.
- CHACHINA, S. B., VORONKOVA, N. A., BAKLANOVA, O. N. Biological remediation of the petroleum and diesel contaminated soil with earthworms *Eisenia fetida*. **Procedia Engineering** 152, p. 122-133, 2016.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). **Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo, Dezembro de 2014**. São Paulo: CETESB, 2014.
- DELLA FLORA, I. K.; WELTER, N.; DAROIT, D. J. Efeito da contaminação do solo com óleo diesel sobre parâmetros microbianos em microcosmos. **VII Jornada Científica de Iniciação e Tecnologia: Habitats de Inovação e Desenvolvimento**. Universidade Federal da Fronteira Sul – Erechim, 2017.
- DEMIRBAS, A. Biodiesel: A Realist Fuel Alternative fir Diesel Engines. **Springer-Verlag London**, 1 ed. London, England, 2008.
- DEMIRBAS, A. Green Energy and Technology: Biorefineries For Biomass Upgrading Facilities. **Springer-Verlag London**, 1 ed. London, England, 2010.
- FORTE E. J., et al. Contaminação de aquífero por hidrocarbonetos: estudo de caso na Vila Tupi, Porto Velho – Rondônia. **Química Nova** 30, 1539-1544, 2007.

Fundação Estadual do Meio Ambiente (FEAM). **Inventário de áreas contaminadas do Estado de Minas: 2015**. Belo Horizonte: FEAM, 2015.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. T. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília-DF, n. 34, p. 36-43 jan./jun. 2005.

GHOREISHI, G. et al. Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran. **Sustainable Environment Research** 27, p.195-202, 2017.

GOMES, M. B., et al. Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. **Internation Biodeterioration & Biodegradation**, 2016 (*no prelo*). DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.08.014.

GOSPODAREK, J.; RUSIN, M. Residual effect of soil pollution with oil derivatives on the occurrence of Acarina. **Proceedings of ECOpole 9**, p. 71-77, 2015.

GOSPODAREK, J.; PETRYSZAK, P.; KOŁOCZEKC, H. The effect of the bioremediation of soil contaminated with petroleum derivatives on the occurrence of epigeic and edaphic fauna. **Bioremediation Journal** 20, p. 38-53, 2016.

GOUVEIA, J. L. N.; NARDOCCI, A. C. Acidentes em postos e sistemas retalhistas de combustíveis: subsídios para a vigilância em saúde ambiental. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 317-324, 2007.

GRADY, C. P. L. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 27, n. 5, p. 660-674, 1985.

GUEDES, C. L. B. et al. Tratamento de solo contaminado com petróleo utilizando tensoativos e peróxido de hidrogênio. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas** 31, p. 87-100, 2010.

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural** 37, p. 1192-1201, 2007.

JIANG, Y. et al. Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons on contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. **Chemosphere** 161, p. 300-307, 2016.

KAUPPI, S.; SINKKONEN, A.; ROMANTSCHUK, M. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: comparison of biostimulation and bioaugmentation. **International Biodeterioration and Biodegradation** 65, p. 359-368, 2011.

KHAN, A. H. A. et al. Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. **Ecological Engineering** 101, Part A, p. 158-164, 2017.

LABUD, V.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. **Chemosphere** 66, n. 10, p. 1863-1871, 2007.

LEME, D. M. et al. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 199-200, p. 343-349, 2012.

LI, H., et al. Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: a laboratory experiment. **Journal of Environmental Sciences** 19, p. 1003-1013, 2007.

LV, H. et al. Effectiveness and mechanism of natural attenuation at a petroleum-hydrocarbon contaminated site. **Chemosphere** 206, p. 293-301, 2018.

MANCERA-LÓPEZ, M. E. et al. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & biodegradation** 61, p. 151-160, 2008.

MARGESIN, R., et al. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. **Acta Biotechnologica** 20, 313-333, 2000b.

MARIA, Ł. et al. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: field-scale processes in Poland. **Ecological Engineering** 37, p. 1895-1900, 2011.

MEDAURA, M.; ÉRCOLI, E. C. Bioconversion of petroleum hydrocarbons in soil using apple filter cake. **Brazilian Journal of Microbiology** 39, p. 427-432, 2008.

MEYER, D. D., et al. Capability of a selected bacterial consortium for degrading diesel/biodiesel blends (B20): Enzyme and biosurfactant production. **Journal of Environmental Science and Health, Part A** 47, p. 1776–1784, 2012.

MIRSAL, I. A. Soil Pollution: Origin, Monitoring & Remediation. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 2 ed. Dillenburg, German, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2. ed. **Lavras: UFLA**. p. 729, 2006.

MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. **Microbiological Research** 165, p. 363-375, 2010.

NEUHAUSER, E. F. et al. Monitored natural attenuation of manufactured gas plant tar mono and polycyclic aromatic hydrocarbons in ground water: a 14-year field study. **Ground Water Monitoring and Remediation** 29, p. 66-76, 2009.

NJOKU, K. L.; AKINOLA, M. O.; TAIWO, B. G. Effect of gasoline diesel fuel mixture on the germination and the growth of *Vigna unguiculata* (Cowpea). **African Journal of Environmental Science and Technology** 3, p. 466-471, 2009.

OBI, L. U.; ATAGANA, H. I.; ADELEKE, R. A. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. **SpringerPlus** 5: article 1946, 13 pp., 2016.

PEREIRA, L. A. G.; FERREIRA, W. R. Redes de transportes e comércio internacional: uma abordagem geográfica dos fluxos das exportações e das importações de mercadorias em Montes Claros – MG. **Revista Eletrônica de Geografia**, v. 6, n. 17, p. 104-125, 2014.

PLAZA, G.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I. M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated bioremediated soils. **Jornal of Petroleum Science & Engineering**, 50, p. 71-77, 2006.

PRYBUTOK, V. R.; SPINK, A. Intrinsic bioremediation of a petroleum hydrocarbon contaminated aquifer and assessment of mineralization based on stable carbon isotopes. **Biodegradation**, 10 (3), p. 201-217, 1999.

RAHMAN, K. S. M.; THAHIRA-RAHMAN, J; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 3, p. 257–261, 2002.

RAZA, Z. A., et al. Production kinetics and tensioactive characteristics of biosurfactant from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oils. **Biotechnology Letters** 28, p. 1623-1631, 2006.

ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2477-2490, 2009.

ROSEMBERG, M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters** 22, p. 289-295, 1984.

RUBERTO, L. et al. Efectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. **International Biodeterioration and Biodegradation** 52, p. 115-125, 2003.

SANTOS, E. S. dos, et al. Monitoramento da Atenuação Natural de Solo Contaminado por Petróleo. **XVII Jornada de Iniciação Científica – CETEM**, p. 290-296, 2009.

SANOMIYA; NAHAS. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural, Santa Maria** 33, n. 5, p. 835-842, 2013.

- SAYARA, T. et al. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation** 65, p. 859-865, 2011.
- SHENG, Y., et al. Microbial community structures in petroleum contaminated soils at an oil field, Hebei, China. **CLEAN – Soil, Air, Water** 44, p. 829-839, 2016.
- SILVA, M. L. B. D.; CORSEUIL, H. X. Groundwater microbial analysis to assess enhanced btex biodegradation by nitrate injection at a gasohol-contaminated site. **International Biodeterioration and Biodegradation** 67, p. 21-27, 2012.
- SOUZA, R. B., et al. Soil contamination with heavy metals and petroleum derivates: impact on edaphic fauna and remediation strategies. In: SORIANO, M. C. H. (Ed). **Soil processes and current trends in quality assessment**. 1. ed. InTech Publisher, 2013, cap. 6, pp. 175–203.
- SOUZA, M. M., et al. Biodegradation potential of *Serratia marcescens* for diesel/biodiesel blends. **International Biodeterioration & Biodegradation** 110, p. 141-146, 2016.
- TACCARI, M. et al. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. **International Biodeterioration & Biodegradation** 66 , p. 39-46, 2012.
- TAVARES, S. R. L. *Remediação de solos e Águas Contaminadas: Conceitos Básicos & Fundamentos*. **Clube de Autores**, 1 ed. São Paulo, Brasil, 2010.
- TIBURTIUS E. R. L., et al. Contaminação de águas por BTXS e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova** 27, p. 441-446, 2004.
- VIEIRA, P. A., et al. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. **Journal Hazardous Material**, v. 140, p. 52-59. 2007.
- VILLALOBOS, M.; AVILA-FORCADA, A. P.; GUTIERREZ-RUIZ, M. E. An Improved Gravimetric Method to Determine Total Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soils. **Water Air Soil Pollut** 194, p. 151–161, 2008.
- WANG, Y. B.; HAN, J. Z. The role of probiotic cell wall hydrophobicity in bioremediation of aquaculture. **Aquaculture** 269, p. 349-354, 2007.
- WANG, Z. Y., et al. Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms. **Pedosphere** 22, p. 717-725, 2012.
- WEELINK, S. A. B., et al. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology** 9, p. 359-385, 2010.
- WU, M. L. et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. **Environmental Pollution** 178, p. 152-158, 2013.

WU, M., et al. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation** 107, p. 158-164, 2016.

YU, K. S. H., et al. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin** 51, p. 1071-1077, 2005.