



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

VIVIANE DE VARGAS BERWALDT

HABILIDADE DEGRADADORA DE COMBUSTÍVEIS POR ISOLADOS
BACTERIANOS

CERRO LARGO
2019

VIVIANE DE VARGAS BERWALDT

**HABILIDADE DEGRADADORA DE COMBUSTÍVEIS POR ISOLADOS
BACTERIANOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

Coorientadora: Isabela Karina Della-Flora

CERRO LARGO

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Berwaldt, Viviane de Vargas
Habilidade degradadora de combustíveis por isolados bacterianos / Viviane de Vargas Berwaldt. -- 2019.
66 f.:il.

Orientador: Doutor Daniel Joner Daroit.
Co-orientadora: Isabela Karina Della-flora.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Engenharia Ambiental e Sanitária, Cerro Largo, RS ,
2019.

1. Biodegradação. 2. Biossurfactantes. 3. Isolados bacterianos. 4. Combustíveis. I. Daroit, Daniel Joner, orient. II. Della-flora, Isabela Karina, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

VIVIANE DE VARGAS BERWALDT

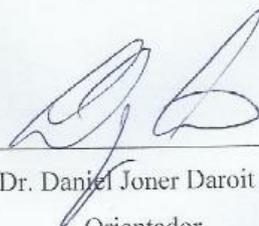
**HABILIDADE DEGRADADORA DE COMBUSTÍVEIS POR ISOLADOS
BACTERIANOS**

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

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

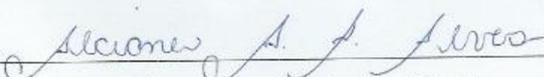
06 / 12 / 2019

BANCA EXAMINADORA

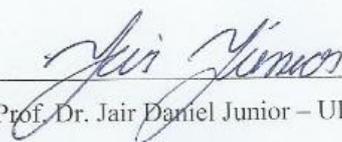


Prof. Dr. Daniel Joner Daroit – UFFS

Orientador



Profa. Dra. Alcione Aparecida de Almeida Alves – UFFS



Prof. Dr. Jair Daniel Junior – UFFS

Dedico esse trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de ingressar em uma universidade pública e por ter me abençoado e me protegido durante todo o caminho trilhado até aqui.

À minha família, principalmente à minha mãe, Verônica, ao meu pai, Leonício, aos meus padrinhos, Alécio e Vera, à minha vó, Glória e a minha tia Vandrieli, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando desde o início da graduação, me deram força e motivação para nunca desistir. Com certeza eles são uns dos maiores responsáveis por eu ter chegado a esse momento tão importante.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Joner Daroit, pelos conhecimentos compartilhados, pelo esforço em me auxiliar sempre que possível e sanar dúvidas, e principalmente por acreditar no meu trabalho.

À equipe técnica dos laboratórios, especialmente à Caroline Badzinski, pela disponibilidade de conseguir reagentes sempre que necessário, e pelo auxílio no laboratório.

À minha coorientadora e companheira de laboratório, Isabela, que não mediu esforços para me ajudar e ensinar acerca dos meus experimentos e na escrita do meu trabalho. E também as outras companheiras do laboratório de Microbiologia, que sempre me ajudaram quando preciso.

Às minhas colegas e amigas da graduação, Jaíne e Jaqueline, pela companhia diária, por todos os conhecimentos e conselhos compartilhados. E a todos os colegas que estiverem comigo nessa caminhada.

À minha amiga, Carolina, por todo o auxílio desde o começo dos meus experimentos falhos, por estar presente mesmo quando eu não podia estar, e pelo apoio emocional.

Agradeço às Mimosas por todo o apoio emocional, conversas, risadas, mesmo que de longe.

Às minhas amigas da escola, que também sempre me incentivaram, apesar da distância.

Agradeço a Universidade Federal da Fronteira Sul e todos os seus colaboradores, por fazerem parte desse sonho.

Enfim, agradeço à banca examinadora, por aceitarem ao meu convite e se fazerem presentes na defesa deste trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis” (ALENCAR).

RESUMO

A contaminação de solos e águas por combustíveis é um dos grandes problemas no cenário mundial. Microrganismos são protagonistas na degradação destes contaminantes, formando a base de processos de biorremediação. Logo, o reconhecimento da habilidade degradadora de microrganismos pode contribuir para processos de biorremediação, como a bioaugmentação. Este estudo objetivou avaliar o potencial de degradação de combustíveis [diesel S10 e S500, gasolina de aviação (GAV) e etanol] por isolados bacterianos obtidos a partir de uma caixa separadora óleo/água de uma lavagem automotiva. Testes de biodegradabilidade foram realizados em meio mineral contendo indicador redox e os combustíveis como únicas fontes de carbono e energia para o crescimento microbiano, além de experimentos para determinação da capacidade emulsificante (IE_{24}) e hidrofobicidade celular dos isolados. Onze linhagens bacterianas, denominadas de UFFS 1 a UFFS 11, foram isoladas. Oito degradaram constituintes do diesel S10 nas concentrações de 5, 10 e 15 % (v/v). Testes realizados com diesel S10 resultaram, em geral, em baixos níveis de capacidade emulsificante; os isolados UFFS 6, 8, 9 e 11 apresentaram IE_{24} de 0,94 % (UFFS 8) a 10,14 % (UFFS 10) na presença de células, e de 0 % (UFFS 6 e 8) a 8,18 % (UFFS 9) na ausência de células. A hidrofobicidade celular, avaliada em diesel S10, variou de 0 % a 57,9 %, com destaque para os isolados UFFS 1 e 9 (~56 %). Quatro isolados foram selecionados (UFFS 6, 8, 9 e 11) para testes de degradação de diesel S500, GAV e etanol, na concentração de 10 %. Estes isolados foram capazes de degradar constituintes do diesel S500; contudo, não degradaram GAV e etanol, possivelmente devido a efeitos tóxicos nesta concentração. Isolados cultivados em diesel S500 e avaliados quanto à capacidade emulsificante de tolueno apresentaram IE_{24} de 24 % (UFFS 6) a ~71 % (UFFS 8 e 11) na presença de células, e de ~53 % na ausência de células, indicando a produção de bioemulsificantes extracelulares e também associados à superfície celular. A hidrofobicidade celular, avaliada com tolueno, variou de 80 % a 89 %. A produção de bioemulsificantes e as elevadas hidrofobicidades celulares podem atuar positivamente na acessibilidade dos constituintes do diesel S500 para a degradação microbiana. Os resultados obtidos para os quatro isolados selecionados sugerem sua aplicabilidade em processos de bioaugmentação para a degradação de constituintes do óleo diesel, que deve ser confirmada por estudos subsequentes.

Palavras-chave: Biodegradação. Diesel. Etanol. Gasolina de aviação. Biossurfactantes.

ABSTRACT

Soil and water contamination by fuels is one of the major problems on the world stage. Microorganisms are protagonists in the degradation of these contaminants, forming the basis of bioremediation processes. Therefore, recognition of the degrading ability of microorganisms can contribute to bioremediation processes, such as bioaugmentation. This study aimed to evaluate the degradation potential of fuels [diesel S10 and S500, aviation gasoline (GAV) and ethanol] by bacterial isolates obtained from an oil/water separator of an automotive wash. Biodegradability tests were performed in mineral medium containing redox indicator and fuels as the only carbon and energy sources for microbial growth, as well as experiments to determine the emulsifying capacity (IE_{24}) and cellular hydrophobicity of the isolates. Eleven bacterial strains, named UFFS 1 to UFFS 11, were isolated. Eight strains degraded S10 diesel constituents at concentrations of 5, 10 and 15 % (v/v). Tests performed with S10 diesel generally resulted in low emulsifying capacity levels; isolates UFFS 6, 8, 9 and 11 presented IE_{24} from 0.94 % (UFFS 8) to 10.14 % (UFFS 10) in the presence of cells, and from 0 % (UFFS 6 and 8) to 8.18 % (UFFS 9) in the absence of cells. Cellular hydrophobicity, evaluated on S10 diesel, ranged from 0 % to 57.9 %, with emphasis for UFFS 1 and 8 isolates (~ 56 %). Four isolates were selected (UFFS 6, 8, 9 and 11) for degradation tests using diesel S500, GAV and ethanol, at 10 %. These isolates were able to degrade diesel S500 constituents; however, they did not degrade GAV and ethanol, possibly due to toxic effects at this concentration. Isolates grown on S500 diesel and evaluated for toluene emulsifying capacity showed IE_{24} from 24 % (UFFS 6) to ~71 % (UFFS 8 and 11) in the presence of cells, and ~53 % in the absence of cells, indicating production of extracellular and cell-associated bioemulsifiers. Cellular hydrophobicity, assessed with toluene, ranged from 80 % to 89 %. The production of bioemulsifiers and high cellular hydrophobicities may positively affect the accessibility of diesel S500 constituents to microbial degradation. The results obtained for the four selected isolates suggest their applicability in bioaugmentation processes for the degradation of diesel oil constituents; however, this should be confirmed by subsequent studies.

Keywords: Biodegradation. Diesel. Ethanol. Aviation gasoline. Biosurfactants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmulas estruturas de hidrocarbonetos monoaromáticos do petróleo.....	23
Figura 2 – Interferência da concentração de surfactante na tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade.....	37
Figura 3 – Fluxograma da abordagem metodológica conforme ordem das etapas de execução.	38
Figura 4 – Etapas da Coloração de Gram.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentagem de biodiesel presente no diesel fóssil no Brasil	19
Tabela 2 – Avaliação da degradação de óleo diesel S10 por isolados bacterianos em meio líquido contendo TTC nas diferentes concentrações.....	44
Tabela 3 – Índice de emulsificação (IE24) na presença e ausência de células utilizando diesel comercial S10.....	46
Tabela 4 – Adesão das células bacterianas à fase apolar (diesel S10).	47
Tabela 5 – Caracterização dos microrganismos utilizados no processo.....	49
Tabela 6 – Avaliação da degradação de óleo diesel S500, gasolina de aviação (GAV) e etanol por quatro isolados bacterianos, em meio líquido contendo o indicador redox TTC.....	50
Tabela 7 – Índice de emulsificação (IE24), avaliado em tolueno, para cultivos bacterianos realizados com óleo diesel S500 (10 % v/v) por 15 dias.....	52
Tabela 8 – Percentual de adesão das células bacterianas ao tolueno.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Propriedades do óleo diesel (S10 e S500).....	20
Quadro 2 – Especificações da gasolina de aviação (GAV).....	20
Quadro 3 – Propriedades físicas e químicas do etanol.....	22
Quadro 4 – Biodegradabilidade de constituintes do petróleo.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Unidade de absorbância
ANEEL	Agência Nacional de Energia Elétrica
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
BATH	Adesão Bacteriana a Hidrocarbonetos
BH	<i>Bushnell-Haas</i>
BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FEPAM	Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler
FISPQ	Ficha de Informação de Segurança para Produtos Químicos
G ⁺	Gram-positiva
G ⁻	Gram-negativa
GAV	Gasolina de aviação
N	Nitrogênio
OD	Densidade ótica
P	Fósforo
PAHs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>)
PCA	Ágar Padrão para Contagem
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
ppm	Partes por milhão
TAS	Tanques de armazenamento subterrâneos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo geral.....	17
1.1.2	Objetivos específicos.....	17
1.2	JUSTIFICATIVA	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	PETRÓLEO E DERIVADOS	18
2.1.1	Óleo diesel.....	18
2.1.2	Gasolina de aviação	20
2.2	BIOCOMBUSTÍVEIS.....	21
2.2.1	Etanol.....	21
2.3	CONTAMINAÇÃO DO SOLO E ÁGUAS SUBTERRÂNEAS	22
2.4	BIODEGRADAÇÃO E BIORREMEDIAÇÃO.....	24
2.4.1	Biorremediação in situ	28
2.4.2	Biorremediação ex situ.....	29
2.5	TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO	30
2.5.1	Atenuação Natural Monitorada	30
2.5.2	Biaumentação.....	31
2.5.3	Bioestimulação	32
2.6	SUBSTÂNCIAS PASSÍVEIS A BIORREMEDIAÇÃO	33
2.7	VANTAGENS E DESVANTAGENS DA BIORREMEDIAÇÃO	34
2.7.1	Vantagens	34
2.7.2	Desvantagens.....	35
2.8	BIOSURFACTANTES	35
3	METODOLOGIA	38

3.1	COLETA DE AMOSTRAS, ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS E PREPARO DO INÓCULO	39
3.1.1	Coleta da amostra de água residuária	39
3.1.2	Isolamento dos microrganismos	39
3.1.3	Inóculos bacterianos	40
3.2	PREPARO DOS CONTAMINANTES	40
3.3	TESTES PRELIMINARES	40
3.4	ANÁLISE DA CAPACIDADE BIODEGRADADORA.....	41
3.5	PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES	41
3.5.1	Índice de emulsificação (IE24)	41
3.5.2	Hidrofobicidade celular (HC).....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	EXPERIMENTOS UTILIZANDO ÓLEO DIESEL S10.....	44
4.1.1	Avaliação da habilidade de degradação	44
4.1.2	Produção de biossurfactantes e hidrofobicidade celular	45
4.2	EXPERIMENTOS UTILIZANDO DIESEL S500, GAV E ETANOL	48
4.2.1	Análise da capacidade degradadora	49
4.4.1	Índice de emulsificação e hidrofobicidade celular	52
5	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Nossa sociedade está constantemente em busca por desenvolvimento industrial e tecnológico, cujo inúmeras vezes torna-se um grande vilão para o ecossistema do planeta. A exploração gradativa de recursos, como o petróleo, pode gerar sérios problemas ao meio ambiente, pois frequentemente ele tem sido retirado da natureza (ALVEZ, A.; ALVEZ, B.; MARTINS, 2013).

Segundo os mesmo autores, o petróleo, uma das principais fontes energéticas da humanidade, é, sem dúvidas, um dos maiores proporcionadores do progresso econômico do mundo, compondo a base das indústrias petrolífera e automobilística. Porém, a indústria de petróleo não promove apenas desenvolvimento, a mesma apresenta-se como uma fonte de riscos e impactos ambientais negativos.

Segundo dados da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), em 2018 foram produzidos no Brasil aproximadamente 150 milhões de metros cúbicos de petróleo e 104 milhões em metros cúbicos de derivados por Unidade da Federação. No mesmo ano foram comercializados cerca de 136 milhões (m³) dos combustíveis derivados de petróleo e só em março de 2019, vendeu-se em torno de 11,25 milhões (m³).

A contaminação do solo e da água por hidrocarbonetos de petróleo, ocorre, em geral, em resultado de perdas, rompimentos de dutos ou por acidentes durante o seu transporte, intervindo vigorosamente nas propriedades do ambiente contaminado, tornando-o tóxico para muitos organismos (BENTO, 2005).

Diversos desastres aconteceram devido aos derramamentos de petróleo, provocando problemas ambientais distintos. Análises em relação ao número de vazamentos apresentam que cerca de 2,3 % da produção das refinarias e em torno de 5 % da gasolina consumida são desperdiçadas por derrames, isto em conjunto com o crescimento de produção atual provoca um carga de hidrocarbonetos em excesso lançados na natureza. No Brasil, desde o início da extração foram relatados mais de 50 grandes vazamentos (BREHM; RICHTER, 2013).

Por não serem muito divulgados na mídia, os acidentes relacionados a postos de combustíveis não são de conhecimento de muitos, porém postos em situação irregular apresentam em grande parte uma contaminação silenciosa e quando descobertos já causaram um dano ambiental gigantesco (ALLEBRANDT, 2015). Os vazamentos em postos de combustíveis, podem ser causados por fatores variados, no entanto se destacam a corrosão e idade dos tanques de armazenamento. Tanques superiores a 20 anos de instalação, podem

apresentar vazamentos relacionados à corrosão, porém se o tanque não possui proteção, a vida útil pode cair para 10 anos (ALMEIDA; SOUZA; LUIZ, 2007).

Os derramamentos recorrentes registrados em solos brasileiros estimulam o desenvolvimento de técnicas que se destinam a descontaminação desses locais, devido a isso, alguns processos físicos, químicos e biológicos, têm sido propagados para a remoção ou degradação *in situ* ou *ex situ* de petróleo e/ou derivados para diminuição de seus respectivos efeitos sobre o ecossistema (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

Em geral, não há regras que determinem qual a melhor técnica de remediação de uma área contaminada. Os casos devem ser investigados individualmente, levando em consideração suas particularidades. Para remoção de hidrocarbonetos do solo e de água subterrânea, diferentes tratamentos podem ser empregados, por exemplo, extração de vapor do solo, bombeamento e biorremediação (MARIANO, 2006)

A biorremediação é uma técnica que utiliza agentes biológicos aptos à degradar ou modificar poluentes alvos com a finalidade de tratar locais contaminados. Ela pode ser realizada impulsionando o crescimento da microbiota nativa do local, por meio da bioestimulação, pela inserção de microrganismos com habilidades catabólicas superiores, através da bioaugmentação ou pela atenuação natural, onde utiliza-se apenas os microrganismos do próprio local (autóctones) sem qualquer interferência. (MARIANO, 2006; SARKAR et al., 2017). Alguns autores trazem outras tecnologias como biorremediadoras, tais como fitorremediação, *landfarming*, compostagem, biopilha e biorreatores.

O uso desse método de remediação harmoniza processos biológicos naturais, com conhecimento de microbiologia, bioquímica, fisiologia vegetal (no caso de fitorremediação), e engenharia voltados a geração de um ambiente favorável para imobilização, mineralização ou extração do contaminante no solo ou água (OLIVEIRA, 2015).

Perante ao descrito, o presente trabalho objetivou verificar a capacidade de degradação de derivados de petróleo (diesel comercial S10/S500, e gasolina de aviação) assim como biocombustível (etanol), por bactérias isoladas de uma caixa separadora de gorduras em uma lavagem automotiva na cidade de Santo Ângelo/RS, bem como investigar a produção de biosurfactantes pelos microrganismos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de isolados bacterianos provenientes de caixa separadora de água e óleo de lavagem de veículos em degradar combustíveis derivados de petróleo e biocombustível.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obter culturas puras de bactérias, a partir da cultura mista;
- Investigar o potencial de degradação de diesel S10, diesel S500, gasolina de aviação e etanol, em meio mineral líquido, por espécies de bactérias não identificadas;
- Avaliar a produção de biossurfactantes pelos microrganismos isolados;
- Investigar a hidrofobicidade celular dos isolados bacterianos;

1.2 JUSTIFICATIVA

Os hidrocarbonetos derivados de petróleo evidenciam-se nas últimas décadas por serem um dos principais contaminantes dos solos e das águas, especialmente pela periodicidade dos eventos de contaminações e da magnitude com que isso afeta o meio ambiente (MENEGHETTI, 2007).

No estado de São Paulo os grupos de contaminantes predominantes descobertos nas áreas de contaminação cadastradas, mostram a influência da revenda de combustíveis, entre eles, destacam-se: solventes aromáticos (representados pelo benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), combustíveis automotivos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH). Logo sobressaem-se os metais e solventes halogenados (CETESB, 2018).

Segundo a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) até o ano de 2018 há 4384 áreas cadastradas no estado de São Paulo, cuja contaminação se deu por atividade de postos de combustíveis. De acordo com a Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler (FEPAM) foram registrados no estado do Rio Grande do Sul entre 2000 e 2019, 615 acidentes de transporte de produtos e resíduos perigosos atendidos

pela divisão de emergências ambientais, dentre esses produtos estão os derivados de petróleo e outros combustíveis (como biodiesel).

Possivelmente a presença de áreas contaminadas irá causar problemas à saúde humana, redução da qualidade dos recursos hídricos, limitações ao uso do solo, prejuízos ao patrimônio público e privado, desvalorização das propriedades e danos ao meio ambiente (MENEGETTI, 2007).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PETRÓLEO E DERIVADOS

De acordo com a ANP, o petróleo é uma substância fóssil, oleosa e inflamável, de elevado valor energético, normalmente menos denso do que a água, possui cheiro característico e coloração que varia de incolor até preto. Devido ao seu grande valor energético e por ser uma fonte não renovável, o mesmo tornou-se um produto tático para o desenvolvimento das nações no mundo, tendo alta influência nas políticas internas e nas relações internacionais tanto para os países que detêm reservas como para os que não as têm.

Hidrocarbonetos de petróleo são baseados em múltiplas ligações de carbono, que desenvolvem estruturas complexas quando se ligam a outras moléculas características, portanto, os hidrocarbonetos mais recentes têm variedade de formas e consistem em alifáticos curtos, médios e longos, aromáticos e policíclicos aromáticos (SHAHI et al., 2016).

2.1.1 Óleo diesel

A partir do petróleo surgem outros produtos e dentre os seus derivados está o óleo diesel, que é um combustível líquido, composto por hidrocarbonetos com cadeias de 8 a 16 carbonos, e em menor quantidade, nitrogênio, enxofre e oxigênio. Especialmente é utilizado nos motores ciclo Diesel, de combustão interna e ignição por compressão, em veículos rodoviários, ferroviários e marítimos, e em geradores de energia elétrica (ANP, 2017).

De acordo com a ANP (2019) para suprir as aplicações do produto, diversos tipos de óleo diesel são encontrados no Brasil:

a) S10 e S500 de uso rodoviário: utilizados em veículos automotivos, máquinas agrícolas, máquinas de construção e industriais;

b) S1800 de uso não rodoviário: empregado em mineração a céu aberto, transporte ferroviário, geração de energia elétrica (outorgado pela ANEEL);

c) Marítimo DMA/DMB: usado em embarcações.

O diesel S500 tem 500 ppm de teor máximo de enxofre e é utilizado em motores a diesel fabricados até 2012, conhecido nos postos de combustíveis como diesel comum. É um óleo mais simples, não recebe nenhum aditivo, apresenta coloração de incolor a amarelada, podendo alterar para alaranjada e marrom por causa da cor do biodiesel, se comercializado como diesel S500 possui coloração vermelha (PETROBRAS, 2019).

Enquanto que, o diesel S10 possui teor máximo de enxofre de 10 ppm, é propício para motores a diesel fabricados a partir de 2012, com o intuito de controle nas emissões, ele pode reduzir a emissão de material particulado e de óxidos de nitrogênio em até 80 e 98 %, respectivamente (PETROBRAS, 2019).

No Brasil, por lei é obrigatório a introdução de biodiesel no diesel fóssil. Em 2008 entrou em a mistura legalmente obrigatória de 2 % (B2), em todo território nacional (ANP, 2019). A Tabela 1 apresenta a evolução do percentual de teor de biodiesel introduzida no diesel fóssil no país.

Tabela 1 – Percentagem de biodiesel presente no diesel fóssil no Brasil.

Período	Percentagem
2003	Facultativo
Jan/2008	2 %
Jul/2008	3 %
Jul/2009	4 %
Jan/2010	5 %
Ago/2014	6 %
Nov/2014	7 %
Mar/2018	10 %

Fonte: Adaptado de ANP, 2019.

No Quadro 1 são apresentadas certas propriedades do óleo diesel, as mesmas são comuns para o diesel S10 e S500.

Quadro 1 – Propriedades do óleo diesel (S10 e S500).

Propriedade	Limites
Aspecto	Líquido límpido
Ponto de ebulição	150 – 471 °C
Ponto de fusão	-40 – 6 °C

Fonte: Adaptado de FISPQ PETROBRAS, 2019.

2.1.2 Gasolina de aviação

A gasolina de aviação é um derivado do petróleo que possui cadeias de 5 a 8 carbonos, adquiridas por meio de processos de refino. Essa substância é utilizada exclusivamente em aviões de pequeno porte, que contém motores de ignição por centelha. Difere do querosene de aviação que possui cadeias de 11 a 12 carbonos e é usado em motores movido a turbina. (ANP, 2019).

Entende-se por aviões de pequeno porte os empregados “na aviação particular, na agricultura, em treinamento de pilotos, na aviação comercial de menor porte e nos aviões experimentais e esportivos” (PETROBRAS, 2019).

De acordo com o mesmo autor, a gasolina de aviação (GAV) contém características especiais monitoradas em testes rigorosos em laboratório. Para que se garanta a o alto padrão de qualidade, esteja de acordo com as especificações, e em consequência o bom desempenho nos motores. Esse combustível não deve ser usado em automóveis.

Algumas especificações da GAV estão apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Especificações da gasolina de aviação (GAV)

Característica	Limites
Aspecto	Claro, límpido, isento de água e material sólido
Cor	Azul
Ponto final de ebulição, máx	170 °C
Ponto de congelamento, máx	-58 °C
Chumbo tetraetila, máx	0,56 g/L

Fonte: Adaptado de Resolução ANP n° 5/09.

É um produto altamente tóxico para os organismos aquáticos, apresenta potencial bioacumulativo nesses organismos, devido a presença do chumbo tetraetila. Em relação a mobilidade no solo, a GAV é altamente volátil (FISPQ PETROBRAS, 2019).

O chumbo tetraetila é utilizado na GAV como melhorador da octanagem. A GAV regulamentada pela ANP para o mercado brasileiro é do tipo GAV 100 LL, ou seja, “*low lead*”, que significa baixo teor de chumbo (PETROBRAS, 2014).

2.2 BIOCOMBUSTÍVEIS

Os biocombustíveis têm origem de biomassa renovável, os quais podem substituir, de forma parcial ou total, os derivados do petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outros modos de geração energética. No Brasil, os principais biocombustíveis são o etanol, que é produzido a partir da cana-de-açúcar, e o biodiesel, obtido a partir de óleos vegetais ou gordura animal, o mesmo é adicionado ao óleo diesel em proporções variáveis, como mostra a Tabela 1 (ANP).

De acordo com a ANP “cerca de 45 % da energia e 18 % dos combustíveis consumidos no Brasil são renováveis. No resto do mundo, 86 % da energia vêm de fontes energéticas não renováveis.” O Brasil é o pioneiro no uso de biocombustíveis, e chegou a uma posição desejada por muitos países que procuram desenvolver fontes renováveis de energia como alternativas estratégicas ao petróleo.

2.2.1 Etanol

O etanol é um biocombustível utilizado em motores a combustão interna por meio de ignição por centelha, substituindo principalmente a gasolina. Possui fórmula molecular C_2H_6O , produzido especialmente por meio da fermentação de açúcares.

Desde o final da década de 70, o Brasil é pioneiro no uso em larga escala do etanol combustível. Hoje em dia, é um dos países que mais utiliza essa substância e o segundo maior produtor mundial (ANP, 2018).

O produto pode ser utilizado de duas formas: como etanol anidro, composto da mistura na produção da gasolina; ou na forma de etanol hidratado, que é o combustível acabado, comercializado em todo o país (ANP, 2018).

Algumas propriedades do etanol são apresentadas no Quadro 3.

Quadro 3 – Propriedades físicas e químicas do etanol.

Propriedade	Limites	Propriedade	Limites
Aspecto	Líquido límpido	Ponto de ebulição inicial	77 °C
Cor	Incolor	Ponto de fusão	-117 °C
pH	6,0 - 8,0		

Fonte: Adaptado de FISPQ PETROBRAS, 2019.

2.3 CONTAMINAÇÃO DO SOLO E ÁGUAS SUBTERRÂNEAS

Atualmente, o mundo depende cada vez mais do petróleo e seus derivados para suas atividades industriais, ao longo da exploração, do refino e do armazenamento do mesmo e seus derivados, há possibilidade de ocorrência de derramamentos, que contaminam os solos e águas, o qual vem se tornando um dos principais problemas ao meio ambiente, visto que a contaminação pode alcançar os mananciais de águas subterrâneas (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

Durante o armazenamento em postos de combustíveis, podem ocorrer dois tipos de contaminação, a superficial, devido a derrames nas bombas e bocais de preenchimento dos reservatórios e a subterrânea, que é causada por vazamentos em tanques de armazenamento subterrâneos (TAS) (OLIVEIRA, 2015). O segundo tipo de contaminação ocorre, geralmente, pela ausência de monitoramento causada pela complexidade de acesso aos tanques e também ao tempo de vida útil deles, que gera em torno de vinte anos (TRAMONTINI, 2013).

Além da contaminação dos solos, a propagação dos contaminantes em águas subterrâneas é um fator muito preocupante, pois a mesma acontece invisível e silenciosamente, e se dá em especial, pelos derrames de combustíveis nos postos. E ainda, grande parte dos poços perfurados para captação de água não estão cadastrados, tal fato torna mais difícil a fiscalização e controle quando há contaminação desses mananciais (GUIMARÃES, 2011).

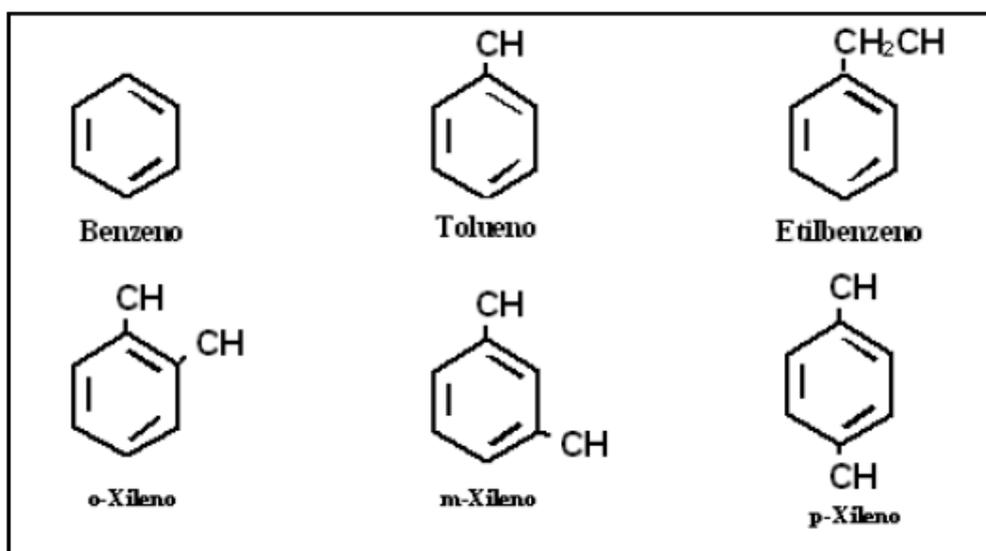
Os compostos orgânicos, são um problema que necessita de atenção geral ao redor do mundo, uma infinidade de locais contaminados podem ser encontrados no mundo todo. Problemas ambientais desta categoria, acontecem até mesmo em regiões frias, tal como Ártica e Antártica devido aos combustíveis utilizados como fonte de energia nestas áreas (ÁLVAREZ et al., 2017).

Do ponto de vista biológico, o solo é uma matriz complexa, principalmente estes contaminados com compostos orgânicos. Nesses solos, carbono natural e fontes de energia coexistem com diversos tipos de xenobióticos (substâncias estranhas), cada um com sua estrutura química, concentrações individuais e efeitos tóxicos para a biota local (ÁLVAREZ et al., 2017).

A transferência de compostos orgânicos para a cadeia alimentar se torna uma grande ameaça à saúde humana, remover esses contaminantes requer muita energia e complexos processos de engenharia (AZHDARPOOR; ROSTAMI, 2019).

Hidrocarbonetos monoaromáticos, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, conhecidos como compostos BTEX, são os mais graves, devido a serem de três a cinco vezes mais solúveis que os de cadeia aberta, desta forma eles têm maior mobilidade em água (GUIMARÃES, 2011). Na Figura 1 apresenta-se a estrutura destes compostos.

Figura 1 – Fórmulas estruturas de hidrocarbonetos monoaromáticos do petróleo.



Fonte: VIEIRA, 2004.

Os BTEX são poluentes altamente tóxicos e carcinogênicos, que quando acumulados, estes compostos trazem riscos para o meio ambiente, assim como para sua fauna e flora (DANGI; SHARMA; SHUKLA, 2018).

Hidrocarbonetos que possuem dois ou mais anéis aromáticos são designados como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), classificados também como poluentes orgânicos persistentes (POPs) (ALLEBRANDT, 2015). Estes compostos são eminentemente

nocivos aos seres vivos e são denominados bioacumulativos, pois concentram-se nos microrganismos, plantas, e animais, incluindo o ser humano (GREENPEACE).

Nos estudos ambientais esses contaminantes são conceituados como prioritários, os mesmos podem ser causa de mutações e tumores em sistemas biológicos. Os PAHs são transportados, principalmente, por meio de material particulado fino ou através da água, devido a isso atingem regiões afastadas de sua origem (AZEREDO; MEIRE; TORRES, 2007).

Já os hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs) são caracterizados como a quantidade de hidrocarbonetos de petróleo presentes no meio ambiente, as quais podem ser coletadas em água, solo ou sedimentos. De outra forma, essa análise pode ser denominada de análise de óleos e graxas, análise de óleos minerais, análise de hidrocarbonetos extraíveis do petróleo (PEREIRA, 2012).

Derramamentos de álcool combustível também são preocupantes, principalmente quando ocorrem em corpos de água utilizada para abastecimento público, o etanol puro se torna-se nocivo pela sua rápida mobilidade em água e difícil detecção (MARTINS, 2004).

2.4 BIODEGRADAÇÃO E BIORREMEDIAÇÃO

O processo de biodegradação é a transformação de compostos orgânicos naturais ou xenobióticos por microrganismos. O carbono orgânico do composto biodegradável é convertido, em partes, em CO_2 e H_2O , se a degradação for completa em condições aeróbias, ou em uma mistura de CO_2 e CH_4 quando ocorrer em condições anaeróbias, e parcialmente em biomassa. Mas parte do carbono também pode permanecer na forma de metabólitos ou não ser convertido (ARMAS, 2017; BRIASSOULIS; MISTRITIS, 2018)

A degradação microbiana é um processo importante para determinar o destino de substâncias antropogênicas no meio ambiente. Ela pode transformar potencialmente químicos perigosos em produtos menos ou mais nocivos (ACHARYA et al., 2019).

Biorremediação é um método de tratamento de solos contaminados, especialmente, por compostos químicos orgânicos utilizando microrganismos que realizam a degradação dessas substâncias. Essa técnica pode proporcionar a reutilização apropriada do solo tratado e reduzir a disposição de resíduos de solo em aterros sanitários (EPA, 2005).

As populações microbianas precisam de condições adequadas para a biodegradação do contaminante, se estas não forem atendidas, os microrganismos entrarão em latência até que sejam proporcionadas condições ideais (SEABRA, 2008). Essa biotecnologia pode sofrer

interferência tanto de fatores bióticos, quanto de fatores abióticos, dentre eles estão os microrganismos (biomassa, diversidade populacional, atividades enzimáticas); aspectos físicos e químicos do local contaminado e as propriedades do substrato (ANDRADE et al., 2010; BOOPATHY, 2000). Pode-se citar como os principais:

a) Concentração do contaminante: a taxa de biodegradação de um contaminante orgânico, geralmente varia de acordo com a sua concentração, porém altas concentrações podem ser prejudiciais aos microrganismos (SEABRA, 2005). Dibble e Bartha (1979 apud SEABRA, 2005) apresentaram que quando aumenta-se a concentração de hidrocarbonetos na faixa de 1,25 a 5% em relação a massa de solo seco, isso provoca um aumento da evolução de CO₂. Mas para 10% de hidrocarbonetos ocorreu um decréscimo de CO₂. Murshid et al. (2018) demonstraram que concentrações de lodo oleoso maiores que 1 % causaram diminuição no OD, assim como redução da atividade enzimática e produção de biossurfactantes. Os pesquisadores concluíram que isso pode ser devido a toxicidade da bora de óleo em alta concentração.

b) Temperatura: é um dos fatores mais relevantes no monitoramento da atividade microbiana e dos índices de biodegradação do contaminante. A temperatura afeta as reações bioquímicas e as taxas de muitas delas dobram a cada 10 °C de aumento, até se atingir uma certa temperatura, onde há morte celular, que fica em torno de 40 °C (KENSA, 2011; SEABRA, 2005). Murshid et al. (2018) apresentaram que os isolados microbianos tem eficácia na produção de biossurfactantes e enzimas em temperaturas entre 30 e 40 °C. Kensa (2011) apresentou que entre 15 e 45 °C há condições para a atividade microbiana, porém a degradação ótima ocorre no intervalo de 20 – 30 °C.

c) Umidade: a água disponível é essencial para todos os organismos vivos e a irrigação é necessária para atingir a umidade ideal (KENSA, 2011). É necessário que o solo tenha umidade satisfatória para o crescimento dos microrganismos aptos a degradar hidrocarbonetos, mas não pode haver muita umidade, pois irá diminuir a permeabilidade do solo. Além do crescimento microbiano a água contribui para a difusão dos nutrientes, eliminação de excretas e influencia na volatilização (SEABRA, 2005). Segundo Kensa (2011) a umidade ótima fica entre 30 e 90 % da capacidade de campo, e na faixa de 25 – 28 % ainda há atividade microbiana. Baptista, Cammarota e Freire obtiveram umidade em uma faixa de 52 a 55 %, verificou-se que a mesma era alta, com possível interferência nos ensaios de biodegradabilidade, impedindo a boa aeração do solo.

d) Nutrientes: a disponibilidade de nutrientes no meio é indispensável para que a descontaminação seja potencializada pelos microrganismos, pois o crescimento de micróbios

heterotróficos depende de uma quantidade ideal de nutrientes, como nitrogênio, fósforo e potássio (AGU et al, 2017; SAMPAIO et al., 2019). E servem como suplementos para biodegradação (DEVI et al., 2011). A própria matéria orgânica é fonte de macronutrientes como nitrogênio, fosforo e enxofre (BOOPATHY, 2000). Sampaio e colaboradores (2019) realizaram tratamentos com isolados bacterianos em meio Bushnell-Haas com 1 % de petróleo bruto e NPK. Os pesquisadores demonstraram que os tratamentos com NPK por 15 e 28 dias apresentaram remoção de naftaleno de aproximadamente 20 % e 40 %, respectivamente. Os estudos de Agu, Ibiene e Okpokwasili (2017) revelaram que a combinação de CoSO_4 , MnSO_4 e NPK foi eficiente na degradação de fenol em águas residuais de refinaria de petróleo.

e) Oxigênio: a maioria dos hidrocarbonetos do petróleo são degradados em condições aeróbias (MARIANO, 2006). Embora várias substâncias sejam degradadas pelo processo anaeróbio, as técnicas onde o oxigênio encontra-se como aceptor de elétrons são mais rápidas (SEABRA, 2005). O oxigênio interfere na taxa de degradação, e pode ser adicionado ao meio através do processo de bioestimulação (SAMPALIO et al., 2019). Microrganismos aeróbios, frequentemente tem sido utilizados para degradar pesticidas e hidrocarbonetos, muitas bactérias usam o contaminante como a única fonte de carbono e energia. Micróbios anaeróbios não são tão utilizados quanto os aeróbios, mas há um crescente interesse em bactérias anaeróbias para biorremediação de bifenilos policlorados em sedimentos fluviais, descloração do solvente tricloroetileno e clorofórmio (KENSA, 2011). A biodegradação de hidrocarbonetos pelo processo anaeróbio é muito estudada, mas pobremente compreendida (CRUZ, 2009). Em sua pesquisa, Cruz (2009) verificou que a vulnerabilidade de biodegradação para as classes de biomarcadores utilizados difere em condições aeróbias e anaeróbias, e também, através da observação do Índice de Preferência por Carbono (IPC) que isolados aeróbios degradam prioritariamente n-alcenos com número par de carbonos, em comparação aos de número ímpar, o contrário ocorre com isolados anaeróbios que preferem n-alcenos com número ímpar de carbonos.

f) pH: o pH do ambiente está diretamente relacionado à atividade metabólica dos microrganismos, a tolerância a esse fator depende de cada espécie microbiana. De acordo com Tsai et al. (1992 apud MUTECA, 2012) com relação ao pH, os micróbios podem ser classificados como:

- Indiferentes: desenvolvem-se em uma ampla faixa de pH. Incluindo muitas bactérias, que crescem em uma faixa de 6,0 a 9,0 e para fungos os valores divergem entre 2,0 e 8,0;

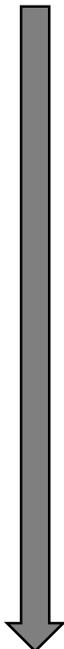
- Neutrófilos: crescem em pH neutro até levemente alcalino. Geralmente, as cianobactérias e algumas diatomáceas preferem essas condições;
- Acidófilos: preferem faixas de pH ácido;
- Basófilos: não toleram valores de pH menores que 8,0.

Kensa (2011) apresenta que em um solo com pH entre 5,5 e 8,8 há atividade microbiana, porém os valores ótimos para a degradação do petróleo ficam em torno de 6,5 – 8,0. Se o solo estiver muito ácido é possível aumentar o pH com adição de calcário. A maioria dos pesquisadores, incluindo Sampaio et al. (2019) e Muteca (2012) fixaram o pH do meio caldo nutriente em 7,0 para o cultivo das bactérias.

g) Capacidade de degradação: microrganismos capazes de degradar derivados do petróleo estão presentes em quase todos os ambientes subterrâneos. Porém é importante em algumas situações, analisar amostras de solo com a finalidade de confirmar a existência de degradantes de hidrocarbonetos e a ausência de níveis tóxicos do contaminante que podem inibir a eficácia da comunidade microbiana (EPA, 2017). Esses microrganismos tem a habilidade de se adaptar às fontes de carbono e energia presentes no meio, desde açúcares de fácil metabolização até compostos complexos, como os BTEX. Em circunstância onde se constata a presença de poluentes persistentes, é necessário o uso de microrganismos específicos ou geneticamente modificados (MENEGHETTI, 2007). Mohan et al. (2011) avaliaram biorremediação anaeróbia de lodo oleoso de petróleo em um reator com aplicação de diferentes técnicas, bioaugmentação, bioestimulação e inclusão de co-substrato (esgoto doméstico) e obtiveram bom padrão de biodegradação para PAHs, onde o naftaleno obteve maior taxa de degradação (97,8%). Nesse estudo, em todos os reatores, os hidrocarbonetos de menor peso molecular obtiveram maior degradação comparado aos de alto peso.

A EPA 510/95 apresenta a ordem de biodegradação dos constituintes do petróleo, e seus respectivos derivados, conforme é mostrado no Quadro 4.

Quadro 4 – Biodegradabilidade de constituintes do petróleo

Biodegradabilidade	Constituintes	Derivados onde os constituintes são habitualmente encontrados
Mais biodegradável  Menos biodegradável	N-butano, n-pentano, n-octano	Gasolina
	Nonano	Óleo diesel
	Metilbutano, dimetilpentenos, metiloctanos	Gasolina
	Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos	Gasolina
	Propilbenzenos	Óleo diesel, querosene
	Decanos	Óleo diesel
	Dodecanos	Querosene
	Tridecanos	Óleos combustíveis para aquecimento
	Tetradecanos	Óleos lubrificantes
	Naftalenos	Óleo diesel
	Fluorantenos	Querosene
	Pirenos	Óleos combustíveis para aquecimento
Acenaftenos	Óleos lubrificantes	

Fonte: Adaptado de EPA, 1995.

De acordo com a EPA 589/05 existem dois tipos de biorremediação: *in situ*, ou seja, tratar no local, podendo ser realizado em solos e águas subterrâneas, e *ex situ*, que consiste em remover a massa contaminada e tratar fora do local.

2.4.1 Biorremediação *in situ*

Segundo Leo et al., 2014 a biorremediação *in situ* é segmentada em intrínseca e com intervenção. O método intrínseco, denominado também como atenuação natural, ocorre sem intervenção humana, onde faz-se apenas um monitoramento regular, por isso é considerada uma forma passiva de remediação que envolve vários processos naturais. Apesar de não haver nenhuma adequação das condições ambientais e nem acréscimo de nutrientes ou organismos, a diminuição da concentração do contaminante é capaz de acontecer de forma contínua. Porém isso não implica que esses processos serão eficazes em todos os locais para atender aos objetivos de remediação dentro de um prazo razoável (EPA, 2017; LEO et al., 2014).

A biorremediação com intervenção é realizada quando as condições naturais do local a ser remediado não são adequadas para o desenvolvimento microbiano, os processos são melhorados através de intervenções artificiais planejadas. Os microrganismos nativos podem ser estimulados pela suplementação com fonte de carbono, nutrientes ou aceptores de elétrons. Também há possibilidade de introduzir-se micróbios pré-selecionados. Quando as incorporações são feitas diretamente na zona saturada (abaixo do lençol freático) a estratégia é conhecida como *biosparging* (LEO et al., 2014).

2.4.2 Biorremediação *ex situ*

Por ser realizado fora do local contaminado, em instalações adequadas para receber o contaminante, o processo *ex situ* possibilita um maior controle e manuseio das técnicas, pois é possível utilizar mais recursos do que no tratamento *in situ* (LEO et al., 2014).

As técnicas *ex situ* podem ser dirigidas nas fases líquida, lamosa ou sólida. *Landfarming*, biopilha e compostagem são estratégias de destaque em fase sólida. Já os biorreatores são conduzidos em fase líquida ou lamosa (LEO et al., 2014; MARIANO, 2006).

Landfarming: comumente utilizado para degradação de hidrocarbonetos de petróleo em refinarias. Neste processo o solo contaminado é escavado e distribuído em um substrato devidamente preparado, que normalmente conta com a adição de nutrientes, irrigação e revolvimento mecanizado (LEO et al., 2014). A técnica reduz a concentração de hidrocarbonetos de petróleo, principalmente pela ação das bactérias, embora a volatilização, processos abióticos e biodegradação mediada por fungos também possam ocorrer (BROWN et al., 2016).

Compostagem: processo de biodegradação aeróbia, em que o material contaminante é misturado com um agente de volume, como esterco ou resíduos agrícolas não perigosos, e pode ser realizada em leiras estáticas ou aeradas (BOOPATHY, 2000; LEO et al., 2014). A compostagem é utilizada para o tratamento de resíduos orgânicos, tendo como produto final, o composto, que é utilizado como fertilizante. Esta técnica reduz os impactos ambientais da má disposição destes resíduos e propicia um modelo de desenvolvimento sustentável (EMBRAPA, 2010).

Biopilha: usualmente utilizado no tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, é um sistema misto de *landfarming* e compostagem. Apresenta-se como uma versão mais aprimorada do *landfarming* que busca o controle de perdas físicas por lixiviação e volatilização pelo isolamento do solo contaminado ao longo do tratamento

(LEO et al., 2014). Esse sistema é usado em tratamentos de curta duração (3 a 6 meses), em condições otimizadas (SEABRA, 2005).

Biorreatores: a biodegradação é feita em contêiner ou reator, pode ser usada para tratamento de líquidos ou lodo (BOOPATHY, 2000). Quando a população de microrganismos existentes nos resíduos não for suficiente, novos micróbios podem ser adicionados ao sistema (LEO et al., 2014). Segundo Seabra (2008), no final do processo o lodo é desidratado, e quando for preciso, o mesmo poderá passar por tratamento adicional (biopilha ou *landfarming*).

2.5 TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação pode ser realizada através técnicas como biodegradação natural (biorremediação intrínseca), ou por meio de melhoramento na biodegradação natural, realizando-se a inserção de micróbios, inclusão de nutrientes (como nitrogênio e fósforo), doadores de elétrons (como metanol ou ácido láctico em processos anaeróbios), aceptores de elétrons (como oxigênio em processos aeróbios). As tecnologias de melhoramento podem ser realizadas *in situ* ou *ex situ* (EPA, 2001).

2.5.1 Atenuação Natural Monitorada

A atenuação natural consiste na degradação do contaminante sem intervenção, onde utiliza-se a habilidade de recuperação dos microrganismos do próprio local juntamente com processos físicos e químicos naturais (PERELO, 2010). Nesse processo não há adequação das condições ambientais, a degradação acontece pela adaptação da microbiota indígena à presença do contaminante. A população microbiana passa a utilizar o composto orgânico poluente como fonte de carbono, reduzindo a sua concentração ao longo do tempo (BEZERRA et al., 2009).

O termo monitorada refere-se a confiabilidade do processo de atenuação natural em atingir os objetivos de descontaminação do local em um tempo razoável, comparando-se a outros método mais ativos, no contexto de limpeza do local cuidadosamente controlada e monitorada. O monitoramento de desempenho do processo é essencial para esse método, por isso a ênfase no monitoramento no termo de “atenuação natural monitorada” (EPA, 2017).

Segundo a EPA 510/17 outros termos são encontrados na literatura, se referindo também a atenuação natural, tais como: “remediação intrínseca”, “biorremediação intrínseca”, “biorremediação passiva”, “recuperação natural” e “assimilação natural”.

Lv et al. (2018) avaliaram a eficácia e o mecanismo de atenuação natural em um local contaminado com hidrocarboneto de petróleo. Os resultados desse estudo apresentaram que com a atenuação natural, a pluma de contaminação reduziu 60 % em quatro anos.

Agnello et al. (2016) demonstraram que pelo processo de atenuação natural houve redução de 37 % de TPH, após 90 dias de experimento, deste modo os microrganismos nativos do solo pareceram adaptados para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

Serrano et al. (2008), em seu estudo simularam um derramamento de óleo diesel, e monitoraram a atenuação natural de hidrocarbonetos alifáticos em um período de 400 dias posteriores ao derramamento, decorrido esse tempo, a concentração dos contaminantes encontrou-se abaixo do valor inicial. Nos primeiros 18 dias, a queda nas concentrações se deu principalmente pela volatilização, posteriormente a microbiota do solo utilizou os hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia, o que foi comprovado pelas taxas de degradação encontradas por eles. Aproximadamente 200 dias após a contaminação, os indicadores de qualidade do solo, biomassa microbiana e atividade de desidrogenase retomaram seus níveis originais.

2.5.2 Bioaugmentação

Bioaugmentar consiste na adição de microrganismos que tem habilidade de utilizar os contaminantes existentes no meio como fonte de carbono e/ou energia, ou que possam tornar o contaminante mais biodisponível, por meio da produção de certas substâncias (LEO et al., 2014). Tratando-se de derivados do petróleo são introduzidos microrganismos oleofílicos, isto é, que tem afinidade com óleos (MARANHO; SILVA, 2019).

A bioaugmentação pode ocorrer de formas distintas, as quais dependem da origem dos microrganismos a serem inseridos: espécies alóctones, ou seja, vindos de outra região biogeográfica; culturas isoladas do próprio local a ser remediado que posteriormente serão reintroduzidas; ou a inserção de organismos geneticamente modificados (OGM), capazes de codificar enzimas responsáveis pela degradação do contaminante. A adição destes micróbios é feita através de culturas bacterianas puras ou por consórcios microbianos (LEO et al., 2014; MARANHO; SILVA, 2019).

Se a capacidade de degradação for confirmada, seja ela realizada por um microrganismo específico ou através de consórcios microbianos, é necessário que estudos em microcosmos sejam feitos para averiguar o potencial de adaptação em relação a microbiota nativa do local a ser remediado (LEO et al., 2014).

Essa técnica é necessária quando um local contaminado não possui os requisitos necessários para que o processo de degradação ocorra. Assim, esse processo tem como objetivo acelerar a biodegradação por meio da intensificação do crescimento microbiano, (MARIANO, 2006). A utilização da mesma é explicada por dois motivos principais: a exigência de uma rápida degradação das substâncias contaminantes e a redução do tempo de adaptação, por serem microrganismos pré-selecionados, que geralmente antecede a degradação realizada pelos micróbios do local (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

Estudos realizados por Di Gregorio et al. (2016) utilizaram diferentes espécies de *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas* spp. Os resultados apresentaram que após 6 dias de incubação, os isolados bacterianos foram capazes de degradar entre 78,81 a 100 % de n-alcenos de 12 a 30 carbonos.

Na pesquisa de Deon et al. (2012), a bioaugmentação apresentou-se mais eficiente para remoção de óleo lubrificante quando comparada a atenuação natural. Já para a biorremediação do óleo diesel não ocorreram diferenças significativas entre as duas técnicas, sendo que o diesel demonstrou as menores taxas de remoção.

Agnello et al. (2016) obtiveram eficiência de 59 %, após 90 dias, com aplicação da técnica de bioaugmentação com a espécie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa*.

2.5.3 Bioestimulação

A bioestimulação é uma técnica, usualmente utilizada, com o intuito de estimular a atividade microbiana nativa do solo no local de aplicação pela inserção de sais, aceptores de elétrons (como oxigênio, nitrato, sulfato e dióxido de carbono), enzimas extracelulares, surfactantes, da mesma maneira que otimização de alguns fatores, tais como monitoramento e correção da a umidade e pH, dentre outras alternativas. Para se ter maior eficiência no processo a adição de suplementos específicos é mais indicada, a qual necessita de um estudo preliminar da microbiota autóctone (LEO e al., 2014).

Considerando um solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo, no processo de bioestimulação, os microrganismos nativos podem ou não preferir os hidrocarbonetos como fonte de alimento (SARKAR et al., 2005). No entanto condições adequadas aumentam o

crescimento e o metabolismo dos microrganismos autóctones, assim eles utilizarão o contaminante como fonte de carbono e energia, ocorrendo uma degradação mais rápida e com melhor percentual (MARANHO; SILVA, 2019).

Na bioestimulação a suplementação de nutrientes para degradação dos hidrocarbonetos, são focados na adição de nitrogênio e fósforo, orgânico ou inorgânico. Como o carbono é o principal constituinte dos derivados de petróleo, ele tem sido usado para determinar as quantidade de N e P que devem ser adicionadas para obter uma ótima relação C:N:P (SARKAR et al., 2005). A falta destes nutrientes essenciais, assim como de aceptores de elétrons, são fatores críticos para o desempenho da bioestimulação (ROY et al., 2018).

Andreolli et al. (2015) realizaram experimentos em um solo queimado de floresta contaminado com hidrocarbonetos tóxicos, a partir dos ensaios de campo, alcançou-se após 60 dias, aproximadamente 70 % de redução de hidrocarbonetos com aplicação da bioestimulação.

Fan, Gong e Qin (2013) obtiveram resultados significativos para bioestimulação por adição de nutriente em um solo contaminado com petróleo. A técnica aplicada por eles provocou uma rápida redução de TPH em 60 dias, logo uma diminuição na degradação até 180 dias. No final do processo obteve-se 61,2 % de eficiência para remoção de TPH.

ROY et al. (2018) demonstraram que a maior biodegradação de TPH foi obtida após 120 dias, pela técnica de bioestimulação com N e P incrementada com bioaugmentação, a qual obteve percentual de degradação aproximado em 75 %.

2.6 SUBSTÂNCIAS PASSÍVEIS A BIORREMEDIAÇÃO

Conforme a EPA 589/05, a biorremediação é uma técnica de tratamento adequada para diversos compostos orgânicos, compreendendo: compostos orgânicos voláteis; benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX); compostos fenólicos; hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), particularmente os compostos aromáticos simples; hidrocarbonetos de petróleo; compostos nitroaromáticos.

Essa técnica, normalmente, não é adequada para solos contendo: metais; PAHs complexos (alto peso molecular); hidrocarbonetos clorados.

2.7 VANTAGENS E DESVANTAGENS DA BIORREMEDIAÇÃO

Por ser um método natural de remediação, a biorremediação é vista pelo público como um processo aceitável de tratamento para locais contaminados, como o solo. No entanto ela é limitada a compostos que são biodegradáveis (KENSA, 2011).

Visando alcançar uma biorremediação bem sucedida, os métodos de biorremediação necessitam ter os micróbios certos no local correto, com os fatores ambientais adequados para que a degradação aconteça (BOOPATHY, 2000).

Da mesma forma que as outras técnicas de tratamento, a biorremediação também traz seus benefícios e limitações.

2.7.1 Vantagens

Em comparação com métodos convencionais de tratamento, como incineração, aterro, lavagem de solos, entre outros, a biorremediação: é geralmente mais econômica; apresenta boa aceitação pública; há incentivo das agências reguladoras ambientais a respeito de sua utilização e; pode ser associada à outros processos químicos ou físicos de tratamento (SEABRA, 2008).

Conforme o exposto por Kensa (2011):

- Em teoria, a biorremediação é utilizada para completa destruição de uma variedade de contaminantes;
- Muitos compostos considerados perigosos são convertidos em produtos inofensivos (como água e dióxido de carbono), isso elimina a futura responsabilidade associada a tratamento e disposição de materiais contaminados;
- Não transfere contaminantes de um meio para outro, como do solo para água ou ar, pois é possível a total destruição dos mesmos;
- Quando é realizada “*in situ*”, não há necessidade de transporte de resíduos, e acaba com as possíveis ameaças à saúde humana e ao meio ambiente que podem ocorrer durante o transporte.

2.7.2 Desvantagens

Há várias limitações para o uso de microrganismos como forma remediadora. Muitas substâncias não são passíveis a biodegradação, e em alguns casos, a degradação do contaminante pode gerar metabólitos tóxicos (SEABRA, 2008).

Kensa (2011) apresentou algumas limitações do processo:

- Nem todos os compostos são suscetíveis à degradação rápida e completa;
- Processos biológicos tendem a ser altamente específicos, por isso fatores importantes do local são necessários para a eficiência do processo, como os microrganismos com habilidade degradadora, condições ambientais apropriadas para os crescimento dos micróbios, e níveis adequados de nutrientes e contaminantes;
 - É difícil extrapolar os estudos em escala piloto para operação em grande escala;
 - Necessita-se de pesquisa para desenvolver e projetar as tecnologias de biorremediação que são adequadas para os locais com misturas complexas de contaminantes que não são uniformemente dispersos no ambiente. Contaminantes como sólidos, líquidos e gases podem estar presentes.

2.8 BIOSSURFACTANTES

Substâncias que apresentam características emulsificantes ou surfactantes, são produzidas por inúmeros organismos vivos, desde plantas (saponinas), microrganismos (glicolipídios), até estruturas animais mais complexas como o corpo humano (sais biliares e surfactante pulmonar). Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana que apresentam alta atividade de superfície e emulsificante, no entanto existem muitas moléculas biológicas com ação surfactante (BENTO; CAMARGO, GAYLARDE, 2008). Essas moléculas podem ser parte da membrana celular dos microrganismos ou serem liberadas extracelularmente (SHARMA; SINGH; VERMA, 2018).

Por definição, um surfactante é uma molécula anfipática, ou seja, é composto por uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. A diminuição da tensão superficial ocorre através da característica anfipática (porção polar/apolar) da molécula, que pode reduzir a energia livre do sistema por meio do deslocamento de moléculas com alta energia do interior da solução para a interface (BENTO; CAMARGO, GAYLARDE, 2008).

Os biossurfactantes são produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras ao longo do crescimento em diversas fontes de carbono, começando em substâncias hidrofílicas,

como a glicose, até compostos hidrofóbicos, como é o caso dos hidrocarbonetos (BENTO; CAMARGO, GAYLARDE, 2008).

São reconhecidos industrialmente e possuem várias aplicações biotecnológicas, no entanto eles ainda representam um desafio quanto ao conhecimento de novas espécies produtoras, métodos de análise, extração, purificação e otimização da produção. Sendo assim, essas substâncias devem ser investigadas, mobilizando diversos setores industriais (BENTO; CAMARGO, GAYLARDE, 2008).

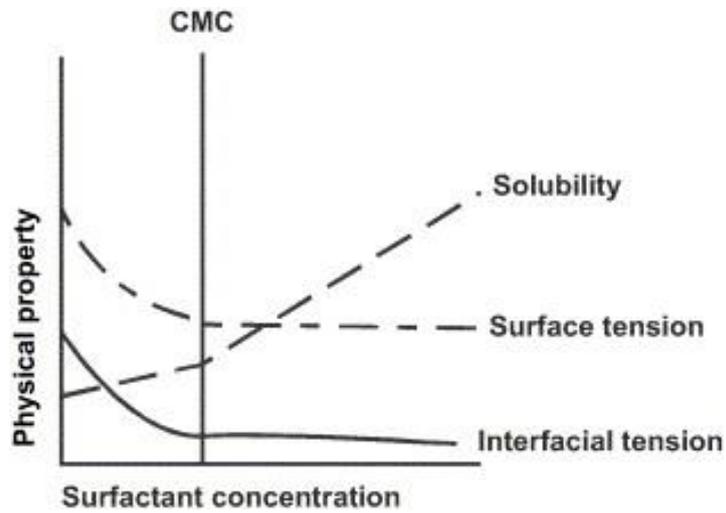
A utilização desses compostos pelas indústrias tem caráter promissor devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e capacidade de otimização da biodegradação e solubilização de compostos pouco solúveis, porém há necessidade de informações específicas para prever e modelar o desempenho dos mesmos (MULLIGAN, 2005).

Biossurfactantes apresentam melhora na biorremediação de hidrocarbonetos através de dois mecanismos: aumento da disponibilidade do substrato para os micróbios; e interação com a superfície celular, o que amplia a hidrofobicidade celular, possibilitando que compostos hidrofóbicos se liguem com mais facilidade às células. Os surfactantes biológicos apresentam vantagens em relação aos sintéticos, pois possuem uma diversidade mais ampla de tipos, estabilidade a temperaturas extremas, níveis de pH e salinidade, bem como habilidade de produção através da fermentação de matérias-primas renováveis (BEZZA; BEUKES; CHIRWA, 2015).

Além do uso na biorremediação de hidrocarbonetos, essas substâncias biológicas apresentam utilidade nas indústrias agrícola, cosmética, farmacêutica, alimentícia, têxtil, de papel, detergentes e tintas. Pesquisas revelam o efeito de surfactantes biológicos para o melhoramento da biorremediação por microrganismos autóctones de solos contaminados com petróleo bruto (BEZZA; BEUKES; CHIRWA, 2015), por exemplo, Xia et al (2014) demonstraram que o lipopeptídeos produzidos por *Pseudomonas* sp. possuem 92,46 % de eficiência para remoção de óleo pesado.

Pode-se observar na Figura 2 que quanto maior a concentração de surfactante no meio, maior é a solubilidade da fase apolar, já a tensão superficial e a tensão interfacial são inversamente proporcionais a concentração do surfactante. Sendo assim a presença do surfactante reduz as tensões no meio e aumenta a solubilidade.

Figura 2 – Interferência da concentração de surfactante na tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade.



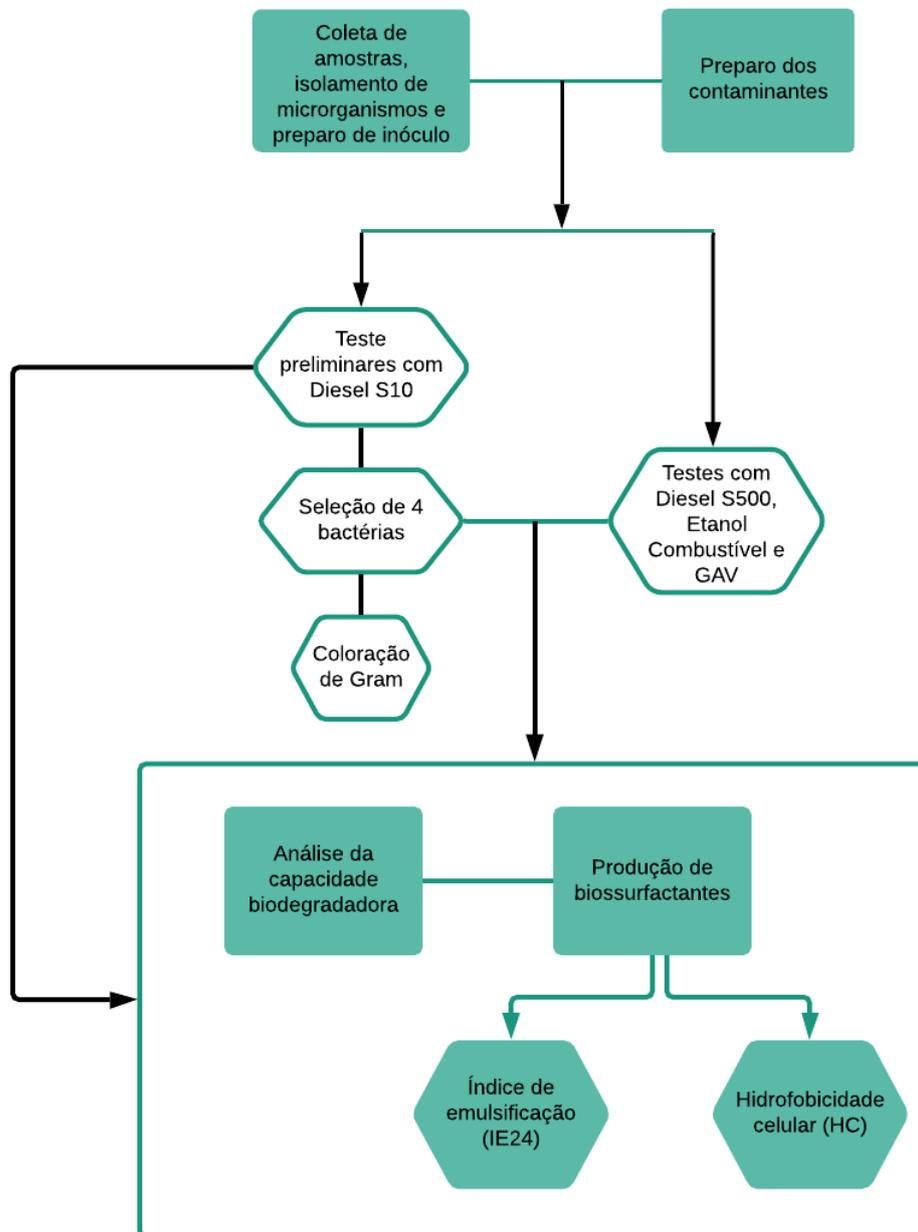
Fonte: MULLIGAN, 2005.

Nota: CMC = concentração crítica de micelas; alguns parâmetros variam de acordo com a concentração de surfactantes (“surfactante concentration”), como solubilidade (“solubility”), tensão superficial (“surface tension”), tensão interfacial (“interfacial tension”).

3 METODOLOGIA

Na Figura 3 está apresentado o fluxograma da metodologia proposta para este estudo.

Figura 3 – Fluxograma da abordagem metodológica conforme ordem das etapas de execução.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

3.1 COLETA DE AMOSTRAS, ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS E PREPARO DO INÓCULO

3.1.1 Coleta da amostra de água residuária

As cepas utilizadas para este estudo foram isoladas a partir de uma amostra de água residuária coletada em uma caixa separadora de gordura de uma lavagem de veículos em Santo Ângelo/ RS. A amostragem desse resíduo em específico foi sugerida por se tratar de um ambiente com a presença de diversos hidrocarbonetos, utilizados como combustíveis ou como lubrificantes de veículos, a presença visual de óleos e graxas foi constatada no momento da amostragem.

Foram coletadas três amostras de água, uma na superfície do líquido, outra no meio da coluna d'água e uma próxima ao fundo da caixa separadora de gordura. Para a coleta foram utilizados tubos de ensaio estéreis com tampa de rosca. As amostras foram mantidas refrigeradas (4 °C) até análises posteriores.

3.1.2 Isolamento dos microrganismos

O crescimento dos microrganismos foi feito através da técnica de diluições decimais, onde 1 mL de cada amostra foi diluída em 9 mL de solução salina (0,85 g L⁻¹ NaCl) estéril (diluição 10⁻¹). A segunda diluição (10⁻²) foi realizada transferindo-se 1 mL da diluição 10⁻¹ para tubo de ensaio contendo 9 mL de salina, e assim sucessivamente até a diluição 10⁻³. Cada diluição foi aplicada (100 µL), pela técnica de espalhamento, na superfície de placas de *Petri* contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA) e mantidas em incubação a 30 °C por até 5 dias.

Após realizou-se a repicagem dos microrganismos, para obtenção de culturas puras, utilizando o método de esgotamento em placa, onde uma alça estéril foi mergulhada em uma cultura mista, e semeada em estrias em PCA e mantidas a 30 °C por 48 h, desta forma as bactérias cresceram em colônias isoladas (CASE; FUNKE; TORTORA, 2017). Desse processo resultaram 11 cepas que foram usadas para os testes seguintes.

3.1.3 Inóculos bacterianos

Preparou-se os inóculos bacterianos a partir dos isolados contidos nas placas de PCA. Com a intenção de obter uma suspensão de cada cepa isolada, a biomassa bacteriana coletada das placas foi adicionada ao meio mineral BH (*Bushnell-Haas*) que consiste em (g L^{-1}): MgSO_4 , 0,2; CaCl_2 , 0,02; KH_2PO_4 , 1,0; K_2HPO_4 , 1,0; NH_4NO_3 ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0; e FeCl_3 , 0,05. O meio foi ajustado para pH 7,0 a 7,2 com diluição de NaOH (BUSHNELL; HAAS, 1941).

A densidade óptica (OD) da suspensão bacteriana foi ajustada para 0,1 – 0,4 abs (unidades de absorbância) em $\lambda = 600 \text{ nm}$ no espectrofotômetro (CERQUEIRA et al., 2012). Para realização dos experimentos utilizou-se as suspensões preparadas.

3.2 PREPARO DOS CONTAMINANTES

O óleo diesel S500 e o etanol foram adquiridos em um posto de combustível no município de Cerro Largo/RS, já a GAV foi adquirida em um posto de abastecimento de aviões de pequeno porte do município de Santo Ângelo. Os mesmos foram levados ao laboratório de Microbiologia e esterilizados através de filtração por membranas de $0,22 \mu\text{m}$. Posteriormente, foram acondicionados à temperatura ambiente, em frascos de vidro esterilizados, envoltos com papel alumínio para prevenir foto-oxidação (DELLA-FLORA; WELTER, 2018).

3.3 TESTES PRELIMINARES

Testes preliminares da capacidade biodegradadora e da produção de biossurfactantes (itens 3.4 e 3.5) foram realizados com 11 bactérias distintas, utilizando diesel comercial S10 como contaminante, o qual foi adquirido em um posto de combustível em Cerro Largo/RS. Os isolados bacterianos foram denominados UFFS.

A metodologia para realização desses procedimentos foi a mesma utilizada nos testes definitivos, exceto para a produção de biossurfactantes onde utilizou-se diesel S10 ao invés de tolueno como fase orgânica. Ao final desses testes selecionou-se quatro culturas bacterianas que obtiveram melhores resultados para serem submetidas aos testes com os demais combustíveis (Diesel S500, Etanol Combustível e GAV).

3.4 ANÁLISE DA CAPACIDADE BIODEGRADADORA

Para esta análise utilizou-se o aceptor artificial de elétrons 2,3,5 – cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), como indicador redox. O TTC é reduzido por quase todos os microrganismos a trifenil formazan (TPF) que pode ser estimado colorimetricamente (ALEF, 1995; BENTO et al., 2005). A redução do TTC a TPF foi visualizada pelo surgimento de cor rosada, tendo algumas variações de acordo com a coloração do combustível. Portanto a redução do TTC prevê a habilidade dos microrganismos em utilizar os combustíveis como substrato (CERQUEIRA et al., 2012), ou seja, degradá-los.

Os testes foram realizados em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços, que possuem volume útil máximo de 300 µL em cada poço (CERQUEIRA et al., 2012; SOUZA et al., 2016). Adicionou-se às microplacas 15 µL de inóculo (5 % do volume útil do poço); 30 µL de combustível (na concentração de 10 %); 255 µL de meio mineral BH estéril com TTC para preencher o poço. Deste modo, o combustível era a única fonte de carbono e energia para as bactérias.

Os experimentos foram realizados em triplicata para cada um dos combustíveis, sendo que as placas foram incubadas por 15 dias a 30 °C e cobertas com alumínio, para evitar foto-oxidação. A cada 5 dias foi avaliada a mudança de coloração, definindo “positivo” para mudança de cor e “negativo” quando não houve alteração da mesma.

3.5 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

A produção de biossurfactantes foi determinada através do índice de emulsificação, e dos resultados para o nível de hidrofobicidade celular (CERQUEIRA, 2012). Para esses testes utilizou-se, inicialmente, tubos de ensaio com tampa onde a partir do volume útil (10 mL) adicionou-se 1 mL de combustível (representando 10 % de concentração), 8,5 mL do meio mineral e 500 µL de inóculo bacteriano. Os tubos foram montados em triplicata para cada um dos combustíveis, e incubados a 30 °C com agitação de 150 rpm por até 20 dias, sendo que alíquotas foram coletadas para realização dos experimentos a seguir.

3.5.1 Índice de emulsificação (IE₂₄)

A atividade emulsificante foi avaliada na ausência e presença de células, após 15 dias de incubação com os combustíveis em estudo. Posteriormente o conteúdo dos tubos passou

por centrifugação (10000 g durante 15 min). A suspensão líquida foi utilizada para os testes na ausência de células e o precipitado foi ressuspensão em 10 mL de BH para a análise na presença de células. Adicionou-se 2 mL das suspensões dos cultivos (com e sem células) juntamente com 2 mL de tolueno a tubos de ensaio de fundo chato. Agitou-se os tubos em vórtex por 2 min em rotação máxima (3800 rpm) e deixou-os em repouso em estufa durante 24h a 30°C. Passado esse período, mensurou-se a altura total da coluna líquida (mm), assim como a altura da coluna emulsificada (mm), para o cálculo do índice de emulsificação (IE₂₄) de acordo com Cooper e Goldenberg (1987):

$$IE_{24} = \frac{\text{Altura da coluna emulsificada}}{\text{Altura total da coluna líquida}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

3.5.2 Hidrofobicidade celular (HC)

O grau de hidrofobicidade celular foi avaliado pelo método de Adesão Bacteriana a Hidrocarbonetos (BATH), é um método simples e rápido para esta finalidade, cujo foi proposto por Rosenberg (1984).

Com o intuito de se obter maior biomassa celular as células foram incubadas durante 20 dias. Passado esse período as células cultivadas em meio mineral com os diferentes combustíveis foram centrifugadas (10000 g por 15 min), e então coletou-se a biomassa celular que foi lavada com tampão PUM (contendo em g·L⁻¹: K₂HPO₄·3H₂O, 22,2; KH₂PO₄, 7,26; MgSO₄·7H₂O, 0,2; e ureia, 1,8), o pH da solução foi ajustado em 7,1. Posteriormente a biomassa bacteriana foi ressuspensa no mesmo tampão até atingir OD entre 0,60,8 unidades de absorvância a $\lambda = 600$ nm.

Em tubos de vidro adicionou-se um alíquota de 2,4 mL da suspensão celular e 0,4 mL de tolueno, que foram agitados em vórtex por 2 min a 3800 rpm. Manteve-se os tubos em repouso durante 30 min, em seguida a OD da fase aquosa foi mensurada em espectrofotômetro ($\lambda = 600$ nm), em unidades de absorvância. Conforme Cerqueira et al. (2012), a hidrofobicidade [HC (%)] foi expressa como a percentagem de aderência das células aos combustíveis, calculada por:

$$HC(\%) = \left[1 - \left(\frac{\text{OD da fase aquosa}}{\text{OD da suspensão celular inicial}} \right) \right] \cdot 100 \quad (\text{Equação 2})$$

3.6 COLORAÇÃO DE GRAM

Esse método tintorial foi desenvolvido pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram. É uma das técnicas de coloração mais úteis, dividindo as bactérias em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas (CASE; FUNKE; TORTORA, 2017).

Conforme Case; Funke e Tortora (2017), na coloração de Gram são realizadas as seguintes etapas (Figura 3):

1. Corante básico púrpura (normalmente cristal violeta) é adicionado a um esfregaço fixado em calor. A coloração púrpura colore todas as células e é denominada coloração primária;

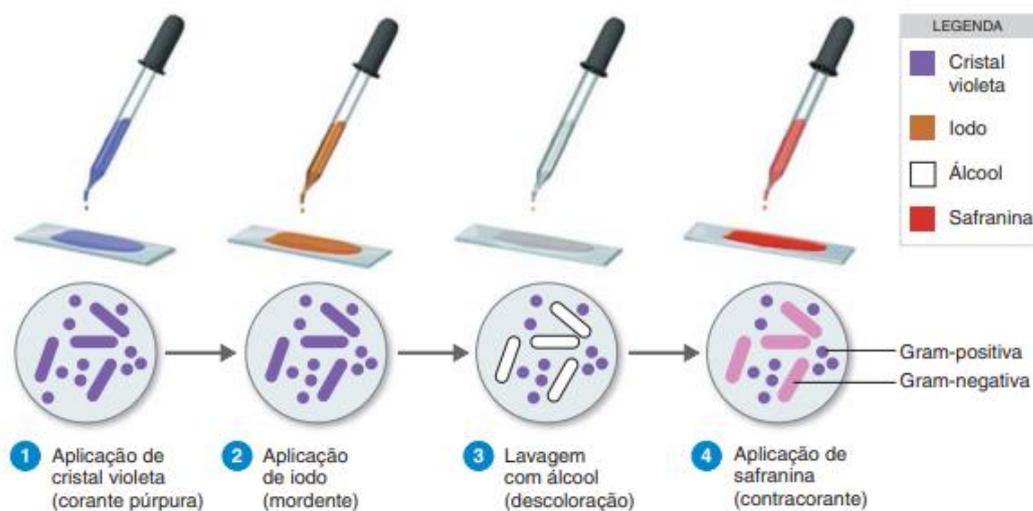
2. Posterior a um curto período de tempo, o corante púrpura é lavado, e o esfregaço é recoberto com iodo (lugol), um mordente. Quando o lugol é lavado, tanto as bactérias gram-positivas quanto as gram-negativas aparecem na cor violeta escura ou púrpura;

3. Logo, a lâmina é lavada com álcool ou com solução de álcool-acetona, que é um agente descorante, removendo a coloração púrpura das células apenas de algumas espécies;

4. Após o álcool é retirado e a lâmina é então corada com safranina ou fucsina, um corante básico vermelho. Por fim, o esfregaço é lavado, seco com papel e avaliado microscopicamente.

Na Figura 4 está apresentado graficamente as etapas da coloração de Gram.

Figura 4 – Etapas da Coloração de Gram.



Fonte: CASE; FUNKE; TORTORA, 2017.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTOS UTILIZANDO ÓLEO DIESEL S10

Inicialmente, 11 isolados bacterianos com morfologia colonial distinta foram obtidos a partir da amostra da caixa separadora óleo/água. Todos os 11 isolados foram submetidos às avaliações biodegradabilidade usando óleo diesel S10, com a finalidade de selecionar as bactérias que apresentassem os melhores potenciais em relação à biodegradação.

4.1.1 Avaliação da habilidade de degradação

Técnicas que utilizam indicadores redox, como o TTC, baseiam-se na atividade metabólica dos microrganismos. Caso o contaminante (doador de elétrons) seja oxidado pelos microrganismos, o TTC atua como um aceptor artificial de elétrons, sendo, portanto, reduzido e originando modificação de sua coloração. Isso indica que o microrganismo foi capaz de degradar constituintes do combustível (CERQUEIRA et al., 2012).

Os resultados desta avaliação são apresentados na Tabela 2. Durante os 15 dias de incubação em meio contendo o indicador TTC e apenas o óleo diesel S10 (5 %, 10 % e 15 %) como fonte de carbono orgânico e energia, oito isolados apresentaram potencial de biodegradação nas três concentrações testadas. O isolado UFFS 1 apenas apresentou capacidade de biodegradação na presença de 5 % e 10 % do combustível, enquanto que os isolados UFFS 4 e UFFS 10 não foram capazes de biodegradar constituintes do óleo diesel S10.

Tabela 2 – Avaliação da degradação de óleo diesel S10 por isolados bacterianos em meio líquido contendo TTC nas diferentes concentrações.

Isolado	Concentração de óleo diesel S10		
	5 %	10 %	15 %
UFFS 1	+++	+	-
UFFS 2	+++	+++	+++
UFFS 3	+++	+++	+++
UFFS 4	-	-	-
UFFS 5	++	+++	++

Isolado	Concentração de óleo diesel S10		
	5 %	10 %	15 %
UFFS 6	+++	+++	+++
UFFS 7	+++	+++	+++
UFFS 8	+++	+++	+++
UFFS 9	+++	+++	+++
UFFS 10	-	-	-
UFFS 11	+++	+++	+++

Fonte: Elaborado pela autora, 2019

Nota: +++: mudança de cor até o 5° dia; ++: mudança de cor do 6° ao 10° dia; +: mudança de cor do 11° ao 15° dia; -: sem mudança.

Usando indicador redox, Kumar e Manjunatha (2015) reportaram que, de 45 isolados bacterianos obtidos a partir de solos contaminados, 23 foram capazes de degradar óleo diesel (0,1 % v/v). Habib e Yasid (2017) indicaram que duas, dentre nove linhagens bacterianas isoladas de solo, foram capazes de reduzir indicador redox em meio mineral contendo óleo diesel (0,5 %). A partir de 148 bactérias isoladas de solos, 128 demonstraram a habilidade de degradar óleo diesel usando indicador redox (NAKAMURA; GERMANO; TSAI, 2014).

Em avaliação com 69 isolados bacterianos em meio mineral e usando indicador redox, 15 foram capazes de degradar petróleo bruto (SUNITA et al., 2013). Allebrandt (2015) segregou 34 microrganismos de solo contaminado de postos de combustível, que foram submetidos ao teste com indicador redox TTC, sendo que 24 isolados apresentaram resultados positivos para degradação de hidrocarbonetos. Souza et al. (2016) selecionaram uma bactéria (de 164 microrganismos) degradadora de diesel e biodiesel que causou mudança de coloração de indicadores redox dentro de 24 h.

4.1.2 Produção de biossurfactantes e hidrofobicidade celular

Denomina-se emulsão, a mistura estável de dois líquidos, criando uma dispersão coloidal de gotículas de um líquido em outro. Os bioemulsificantes são vistos também como uma subclasse de biossurfactantes que tornam estável a dispersão de um líquido em outro, como óleo em água. Misturas de água e óleo configuram fases separadas, porém se o conjunto dos líquidos for agitado, o óleo irá se espalhar na fase aquosa, separando as fases novamente quando essa agitação cessar. Entretanto quando há adição de um surfactante, obtém-se uma mistura estável ou uma emulsão (BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008).

Os biossurfactantes podem ser classificados em duas amplas categorias devido ao seu peso molecular. Os de baixo peso molecular possuem propriedades que diminuem a tensão superficial em meio aquoso. Os de alto peso molecular, denominados bioemulsificantes, formam e estabilizam emulsões; no entanto, quando não apresentam composição anfipática (porção hidrofílica e hidrofóbica), não promovem a redução da tensão superficial (BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008). Pelo índice de emulsificação a produção dessa emulsão é avaliada. Considerando que os constituintes do diesel S10 são majoritariamente hidrofóbicos, a produção de surfactantes pode auxiliar as bactérias no incremento da solubilidade e, com isso, da acessibilidade destes compostos à biodegradação (CERQUEIRA et al., 2012).

A produção de biossurfactantes e a hidrofobicidade celular foram avaliadas para os isolados UFFS 1 – 3, 5 – 9 e 11. Após 15 dias de incubação em meio mineral na presença de diesel S10 (10%), submeteu-se os sobrenadantes dos cultivos e suspensões de biomassa celular à determinação do potencial de emulsificação usando o próprio diesel S10 como fase orgânica. Os resultados para o índice de emulsificação (IE₂₄) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Índice de emulsificação (IE₂₄) na presença e ausência de células utilizando diesel comercial S10.

Isolado	IE ₂₄ (%)	
	<i>Sem células</i>	<i>Com células</i>
UFFS 1	-	-
UFFS 2	-	-
UFFS 3	2,34	-
UFFS 5	-	0,94
UFFS 6	-	1,86
UFFS 7	-	-
UFFS 8	-	0,94
UFFS 9	8,18	10,14
UFFS 11	4,69	4,69
Branco	-	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Emulsões produzidas por este método são denominadas de estáveis em valores de IE₂₄ superiores a 50 % (BADZINSKI, 2018). Verifica-se, portanto, que os isolados UFFS não foram capazes de produzir emulsões estáveis. Os isolados UFFS 9 e UFFS 11 apresentaram

os melhores resultados, tanto na presença quanto na ausência de células. Os isolados UFFS 5, UFFS 6 e UFFS 8 produziram atividade emulsificante associada às células, enquanto que apenas os sobrenadantes dos cultivos do isolado UFFS 3 demonstraram IE₂₄ mensurável.

Della Flora (2018) demonstrou que, para nove isolados bacterianos obtidos de solo contaminado artificialmente com diesel S10, e cultivados em meio mineral contendo diesel S10 (10 %), o IE₂₄ variou de 15 a 63,2 % na presença de células, e de 5 a 67,5 % na ausência de células, usando óleo diesel como fase orgânica. O IE₂₄ em óleo diesel, usando cultivos de seis linhagens bacterianas, variou de < 10 % a ~ 75 % (MORALES-GUZMÁN et al., 2017), enquanto Khan et al. (2017) observaram IE₂₄ entre 34,3 % e 48,5 % para sobrenadantes de cultivo de quatro linhagens bacterianas. Após sete dias de crescimento de um isolado bacteriano em meio contendo óleo diesel, o IE₂₄ do meio de cultura (contendo células) foi de 72,7 % usando óleo diesel como fase orgânica (MORAIS et al., 2015). Lopes et al. (2014), em avaliação de um isolado bacteriano, indicaram IE₂₄ de 34,1 % na ausência de células, enquanto que o meio de cultura contendo células não foi capaz de formar emulsões com óleo diesel.

A hidrofobicidade celular foi avaliada indiretamente através da adesão bacteriana a hidrocarbonetos, ou seja, este ensaio mensura o grau de hidrofobicidade da superfície celular por meio da porcentagem de células aderidas a compostos hidrofóbicos. Células oriundas de cultivos realizados (15 dias) foram submetidas a este teste usando óleo diesel S10 como fase orgânica. Por meio das medidas de OD inicial e final calculou-se a hidrofobicidade celular. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Adesão das células bacterianas à fase apolar (diesel S10).

Inóculo	HC (%)
UFFS 1	55,63
UFFS 2	13,45
UFFS 3	-
UFFS 5	23,23
UFFS 6	33,84
UFFS 7	-
UFFS 8	12,23
UFFS 9	57,96
UFFS 11	13,79
Branco	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

O isolado UFFS 9 foi o que demonstrou a maior adesão ao diesel (57,96 %), seguido do isolado UFFS 1 (55,63 %). Já os isolados UFFS 3 e UFFS 7 não apresentaram valores detectáveis de hidrofobicidade celular usando óleo diesel S10 como fase orgânica. Níveis de hidrofobicidade celular podem ser considerados elevados quando superiores a 40 % (CERQUEIRA et al., 2012). Comparativamente, a adesão a óleo diesel variou de 7 % a 100 % para seis isolados bacterianos (MORALES-GUZMÁN et al., 2017). A hidrofobicidade celular de uma linhagem bacteriana investigada por Ramasamy; Mathiyalagan; Chandran (2014) foi de 57 % usando óleo diesel como fase orgânica.

Hidrofobicidades celulares na faixa de 10 % a 83 % foram reportados para seis bactérias isoladas de solos contaminados por hidrocarbonetos (NIAZY; HASSANSHAHIAN; ATAEI, 2016). Na pesquisa de Khan et al. (2017), quatro linhagens bacterianas isoladas de solo contaminado com petróleo e cultivadas na presença de diesel demonstraram percentual de adesão ao óleo diesel entre 83 e 87 %. Maiores hidrofobicidades podem apresentar relevância no processo de degradação pois atuam aumentando, potencialmente, o contato entre bactéria e hidrocarboneto e, com isso, a taxa de difusão do contaminante para o interior da célula, elevando o crescimento bacteriano e taxas de biodegradação (BADZINSKI, 2018).

A hidrofobicidade celular é um fator importante na adesão inicial dos microrganismos entre a fase aquosa e a fase hidrofóbica (hidrocarbonetos). Determinadas espécies de bactérias conseguem degradar hidrocarbonetos líquidos após a aderência à superfície dos combustíveis, pois o contato direto entre a célula bacteriana e o contaminante alvo pode causar o aumento da taxa de difusão das células, aumentando a dissolução dos hidrocarbonetos (CERQUEIRA et al., 2012).

4.2 EXPERIMENTOS UTILIZANDO DIESEL S500, GAV E ETANOL

A partir dos testes anteriores (IE₂₄ e HC), os isolados UFFS 6, UFFS 8, UFFS 9 e UFFS 11 foram selecionados para realização dos testes subsequentes. Pelo protocolo de coloração de Gram, foi possível verificar, microscopicamente, a morfologia bacteriana e seu perfil tintorial. As bactérias Gram-positivas (G⁺) foram identificadas pela sua coloração violeta/púrpura e as Gram-negativas (G⁻) pela coloração rosada. Apenas o isolado UFFS 11 foi identificado como Gram-positivo. A caracterização destas bactérias é exposta na Tabela 5.

Tabela 5 – Caracterização dos microrganismos utilizados no processo.

Bactéria	Morfologia	Gram
UFFS 6	Bastonete	-
UFFS 8	Bastonete	-
UFFS 9	Coco	-
UFFS 11	Bastonete	+

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A principal diferença entre bactérias G^+ e G^- está na estrutura da parede celular. Enquanto que a parede celular das G^+ possui muitas camadas de peptidoglicano, o que constitui uma estrutura rígida e espessa, aquela das G^- consiste em uma ou poucas camadas de peptidoglicano e uma membrana lipídica externa (CASE; FUNKE; TORTORA, 2017).

Investigações demonstram a maior tolerância de bactérias G^- aos efeitos nocivos dos hidrocarbonetos (LĂZĂROAIE, 2010), bem como uma atuação superior quanto à degradação de hidrocarbonetos em relação a bactérias G^+ (MEHDI; GITI, 2008; GEETHA; JOSHI; KATHROTIYA, 2013). Neste sentido, estudos indicam a predominância de bactérias G^- em ambientes impactados por hidrocarbonetos e sua essencial participação em processos de degradação destes contaminantes (MARGESIN; HÄMMERLE; TSCHERKO, 2007; PÉREZ-DE-MORA; ENGEL; SCHLOTTER, 2011; CASTRO-GUTIÉRREZ et al., 2012).

4.2.1 Análise da capacidade degradadora

Os quatro isolados pré-selecionados foram utilizados nos testes de biodegradação com diferentes combustíveis (diesel S500, GAV e etanol), na concentração de 10% (v/v). Na presença de diesel S500, todos os isolados apresentaram mudança de coloração nos primeiros 5 dias de ensaio, ou seja, têm capacidade de degradar constituintes deste combustível (Tabela 6), corroborando com a degradação de constituintes do óleo diesel S10 (Tabela 2).

Tabela 6 – Avaliação da degradação de óleo diesel S500, gasolina de aviação (GAV) e etanol por quatro isolados bacterianos, em meio líquido contendo o indicador redox TTC.

Isolado	Combustível (10 % v/v)		
	<i>Diesel S500</i>	<i>GAV</i>	<i>Etanol</i>
UFFS 6	+++	–	–
UFFS 8	+++	–	–
UFFS 9	+++	–	–
UFFS 11	+++	–	–
Branco	–	–	–

Fonte: Elaborado pela autora, 2019

Nota: +++: mudança de cor até o 5º dia; ++: mudança de cor do 6º ao 10º dia; +: mudança de cor do 11º ao 15º dia; –: sem mudança.

No entanto, para os demais combustíveis, GAV e etanol, nenhum isolado causou mudança de coloração (Tabela 6). Sendo assim os isolados bacterianos não apresentaram habilidade de degradar esses contaminantes. A partir de solo de *landfarming* com histórico de contaminação por borra oleosa, Oliveira et al. (2011) isolaram 17 microrganismos, dos quais 14 apresentaram capacidade de redução do TTC em meio mineral contendo 1 % de gasolina comercial (com 24% de etanol). Cerqueira et al. (2012) reportaram que, em meio mineral com o indicador TTC, a gasolina sem etanol (1 e 3 %, v/v) foi mais prontamente utilizada pelos microrganismos testados do que o óleo diesel. Segundo estes autores, os hidrocarbonetos da gasolina possuem menor número de carbonos (C4-C12), levando a uma degradação mais rápida quando comparada àquela do diesel (C15-C30).

A indicação da não degradação da GAV pelos isolados, em comparação à degradação do óleo diesel, pode indicar a ausência de sistemas enzimáticos capazes de oxidar alcanos de cadeia curta (gasolina) em relação àqueles de cadeia longa (diesel). É importante mencionar que a composição da GAV tem como base alcanos ramificados (PETROBRÁS, 2014). Neste sentido, diversos componentes da gasolina, como os hidrocarbonetos alifáticos ramificados e cicloalcanos, geralmente apresentam menor biodegradabilidade em comparação aos hidrocarbonetos alifáticos e lineares predominantes no óleo diesel (HALECKY et al., 2015). Segundo Brzeszcz e Kaszycki (2018), n-alcanos são biodegradados mais facilmente, seguidos de alcanos ramificados, hidrocarbonetos monoaromáticos, alcanos cíclicos e então os PAHs.

De forma distinta ao destacado por Cerqueira et al. (2012), alcanos de cadeia curta (< C9) são, usualmente, degradados menos eficientemente do que aqueles de cadeias mais extensas (C10-C20). Embora teoricamente mais biodisponíveis à degradação microbiana, em

parte devido à sua maior solubilidade em água quando comparados a hidrocarbonetos de cadeias maiores, alcanos de cadeia curta estão associados a efeitos tóxicos sobre os microrganismos, ocasionados majoritariamente pela sua atuação na dissolução da membrana plasmática (NZILA, 2018). Também cabe destacar a presença de chumbo na GAV ($\leq 0,56$ g Pb/L), que pode ser tóxico para microrganismos (KONOPKA; ZAKHAROVA, 1999; MUÑOZ et al., 2012; MATHEW; KRISHNAMURTHY, 2018).

A própria habilidade de biodegradação das bactérias, observada nos cultivos com diesel S10 (Tabela 2) e S500 (Tabela 6), pode depender da composição do óleo diesel. A obrigatoriedade de adição de biodiesel (10 %) ao diesel comercializado no Brasil pode afetar a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo. O biodiesel apresenta maior suscetibilidade ao ataque microbiano do que os hidrocarbonetos. Della Flora (2018) observou, para um consórcio microbiano, que os ésteres metílicos do biodiesel foram degradados preferencialmente em relação aos hidrocarbonetos. Em experimentos realizados por sete dias, Owsianiak et al. (2009) indicaram que a adição de 10 % de biodiesel ao diesel reduziu a degradação do diesel, embora o biodiesel tenha sido completamente degradado neste período.

No entanto, a maior biodegradabilidade do biodiesel pode incrementar a biodegradação dos hidrocarbonetos (BÜCKER et al., 2018). Neste cenário, o uso do biodiesel como fonte mais acessível de carbono e energia para os microrganismos pode ocasionar aumentos nas populações microbianas e na produção de enzimas, contribuindo então para a degradação de frações mais recalcitrantes do diesel (MEYER et al., 2012). Ambas as possibilidades, inibição ou estímulo ao uso de hidrocarbonetos pela presença do biodiesel, surgem como perspectivas para investigações futuras.

O etanol é usualmente mais rapidamente biodegradado do que hidrocarbonetos de petróleo, como observado para a gasolina automotiva, que contém etanol (COSTA; NUNES; CORSEUIL, 2009; STEINER et al., 2018). O etanol, molécula solúvel em água e de curta cadeia de carbonos, é facilmente degradado tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias por sistemas enzimáticos centrais do metabolismo microbiano (OLIVEIRA et al., 2011).

Contudo, concentrações elevadas de etanol podem ser tóxicas aos microrganismos, especialmente por seus efeitos sobre a polaridade do meio aquoso e sua atuação como solvente sobre a membrana plasmática. Geralmente, concentrações acima de 15 % resultam na inativação imediata da maioria dos microrganismos. Dependendo da bactéria, a inibição do crescimento pode ocorrer entre 1 % e 10 % de etanol, sendo que poucas crescem acima de 10% (INGRAM; BUTTKE, 1984). Neste contexto, Nelson; Lapara; Novak (2010) indicaram que o crescimento microbiano foi completamente inibido em níveis de etanol superiores a

6 %. Assim, a toxicidade do etanol (10 %) pode justificar a ausência de biodegradação deste combustível nos experimentos realizados (Tabela 6).

4.4.1 Índice de emulsificação e hidrofobicidade celular

Para a detecção da produção de bioemulsificantes, os quatro isolados bacterianos foram cultivados por 15 dias na presença de óleo diesel S500 (10 %). Após este período, cultivos foram centrifugados para obtenção do sobrenadante e da biomassa bacteriana para avaliação do IE₂₄ na ausência e presença de células, respectivamente, utilizando tolueno como fase orgânica. Os resultados são expressos na Tabela 7.

Todos os quatro isolados apresentaram capacidade emulsificante na presença e ausência de células. Na ausência de células, as emulsões com tolueno foram estáveis (> 50 %) para todos os isolados; na presença de células, emulsões estáveis foram formadas pelos isolados UFFS 8, 9 e 11 (Tabela 7). A análise destes resultados indica a capacidade dos isolados em produzir bioemulsificantes solúveis e associados às células.

Tabela 7 – Índice de emulsificação (IE₂₄), avaliado em tolueno, para cultivos bacterianos realizados com óleo diesel S500 (10 % v/v) por 15 dias.

Isolado	IE ₂₄ (%)	
	Com células	Sem células
UFFS 6	24,00	54,64
UFFS 8	71,47	56,52
UFFS 9	54,09	53,33
UFFS 11	70,26	52,85
Branco	0	0

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Para 12 isolados bacterianos cultivados em óleo diesel, o IE₂₄ em tolueno variou de 0 % a 55 % na ausência de células, e de 45 % a 71,4 % na presença de células (WELTER, 2018). Testes realizados com uma linhagem bacteriana degradadora de óleo diesel demonstraram ausência de capacidade emulsificante para os sobrenadantes dos cultivos, enquanto que o IE₂₄ de avaliações com células atingiu 60 % (BICCA; FLECK; AYUB, 1999). Avaliação realizada com tolueno, usando os sobrenadantes de cultivos de 11 isolados

bacterianos, indicou IE₂₄ de 14,3 % a 65,7 % (PHAN; ABU; HAMZAH, 2013). Sobrenadantes de cultivo de *Paenibacillus* sp. #510, realizados em meio mineral contendo hidrocarbonetos, demonstraram IE₂₄ de 61,6 % usando tolueno (GUDIÑA et al., 2015). IE₂₄ entre 30 % e 75 % foram observados para sobrenadantes de cultivos de seis isolados bacterianos (NIAZY; HASSANSHAHIAN; ATAEI, 2016).

Em investigação com duas linhagens bacterianas (L26 e L30) degradadoras de óleo diesel, os sobrenadantes de cultivos foram avaliados quanto ao IE₂₄ usando tolueno ou óleo diesel como fases orgânicas. Embora os sobrenadantes tenham apresentado IE₂₄ de 14,3 % e 51,4 % nos experimentos com tolueno, não demonstraram atividade emulsificante quando o quando óleo diesel foi usado como fase orgânica (LIMA et al., 2019). De forma similar, o IE₂₄ usando S10 como fase orgânica foram inferiores (Tabela 3) em comparação com o uso de tolueno (Tabela 7). Segundo Lima et al. (2019), a natureza complexa do óleo diesel, contendo centenas de componentes distintos, pode ter influenciado estes resultados.

Analisando os índices de emulsificação para os ensaios com diesel comum (Tabela 7), nota-se que, em sua maioria, os resultados na presença e ausência de células foram semelhantes. Isso indica que moléculas solúveis foram secretadas pelos microrganismos.

Após 20 dias de incubação em meio contendo diesel S500, as células bacterianas foram preparadas para realização dos ensaios de hidrofobicidade celular utilizando tolueno. Para os quatro isolados, hidrofobicidades celulares maiores que 80 % foram detectadas (Tabela 8).

Tabela 8 – Percentual de adesão das células bacterianas ao tolueno.

Isolado	HC (%)
UFFS 6	80,90
UFFS 8	81,68
UFFS 9	88,22
UFFS 11	89,26
Branco	—

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Em avaliação de 23 isolados bacterianos obtidos de solos contaminados artificialmente com diesel ou biodiesel, Badzinski (2018) observou hidrofobicidades celulares que variaram

de 6% a 78% usando tolueno como fase orgânica. Também usando tolueno como fase orgânica, a hidrofobicidade celular de 12 isolados bacterianos foi de 28 % a 87 % (WELTER, 2018). As linhagens bacterianas BPB13 e BPB7 demonstraram hidrofobicidade celular de 3,8 % e 1,8 %, respectivamente (NISHANTHI et al., 2010). Em testes usando tolueno, os isolados BP-20 e CZORL-1B demonstraram hidrofobicidade de 0 % e 53 %, respectivamente (PLAZA; ULFIG; BRIGMON, 2005).

Os resultados de IE24 (Tabela 7) e hidrofobicidade celular (Tabela 8) usando tolueno contrastam com aqueles realizados usando diesel S10 como fase orgânica (Tabelas 3 e 4). Mesmo considerando que os microrganismos foram cultivados em diesel S10 (Tabela 4) ou S500 (Tabela 8), sugere-se que as variações observadas tenham sido provocadas, majoritariamente, pelas diferentes fases orgânicas usadas nestes testes. De fato, tais variações são amplamente reportadas na literatura, dependendo das características das fases orgânicas testadas (BICCA; FLECK; AYUB, 1999; PLAZA; ULFIG; BRIGMON, 2005; PHAN; ABU; HAMZAH, 2013). Especificamente, Cerqueira et al. (2012) em estudo com 20 isolados de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo, apresentaram hidrofobicidades celulares que variaram de 5,6 a 46,5 % usando querosene como fase orgânica, e de 9,4 a 34,8 % para ensaios usando octano.

De acordo com Grogg et al. (2010) as linhagens podem ser classificadas como: $HC \geq 70\%$, altamente hidrofóbicas; $50\% \leq HC < 70\%$, hidrofóbicas moderadas e $HC < 50\%$, pouco hidrofóbicas. Nesse mesmo estudo eles obtiveram índices de hidrofobicidade celular em torno de 60 a 80 % para ensaios com n-octano e 3 espécies bacterianas. Na pesquisa de Khan e colaboradores (2017), quatro linhagens bacterianas isoladas de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo e cultivadas na presença de diesel obtiveram percentual de adesão ao óleo diesel entre 80 e 90 %.

5 CONCLUSÃO

A avaliação linhagens bacterianas, isoladas a partir de amostra obtida de uma caixa separadora óleo/água de uma lavagem automotiva, indicou que nove dentre 11 isolados apresentaram potencial para utilização de constituintes do óleo diesel S10, em concentrações de 5 % e 10 % (v/v), como fontes de carbono e energia.

Quatro isolados bacterianos selecionados também foram capazes de degradar constituintes do óleo diesel S500 (10 %), embora não tenham apresentado capacidade de degradação de GAV e etanol.

Os resultados obtidos quanto à produção de bioemulsificantes e à hidrofobicidade celular indicam que estes podem ser mecanismos associados à capacidade degradadora, facilitando o acesso dos isolados bacterianos a componentes do óleo diesel.

Os isolados bacterianos do presente estudo demonstraram serem candidatos potenciais para utilização em processos de biorremediação para locais contaminados com óleo diesel, sendo necessário um estudo específico do local e da tecnologia a ser utilizada (bioaugmentação, ou bioaugmentação e bioestimulação).

Pela capacidade apresentada especialmente pelos quatro isolados selecionados, surgem como perspectivas investigações acerca da suplementação de meios de cultura com nutrientes (como N e P) e seu efeito sobre a biodegradação do óleo diesel, bem como testes em escala laboratorial visando averiguar o efeito da bioaugmentação com os isolados bacterianos (individualmente e em consórcio) para a degradação de óleo diesel em solos e águas

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K. et al. A quantitative structure-biodegradation relationship (QSBR) approach to predict biodegradation rates of aromatic chemicals. **Water Research**, v. 157, p. 181-190, 2019.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Biocombustíveis**. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis> >. Acesso em 22 set. 2019.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Biodiesel**. 2019. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel> >. Acesso em 18 abr. 2019.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Combustíveis de aviação**. 2019. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/petroleo-derivados/155-combustiveis/1856-combustiveis-de-aviacao> >. Acesso em 17 set. 2019.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Dados estatísticos**. 2019. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/dados-estatisticos>>. Acesso em 24 abr. 2019.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Etanol**. 2018. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/etanol>>. Acesso em 22 set. 2019.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Lubrificantes**. 2019. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/petroleo-e-derivados2/lubrificantes>>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Óleo Diesel**. 2019. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/petroleo-derivados/155-combustiveis/1857-oleo-diesel> >. Acesso em: 18 mai. 2019.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Óleo Diesel**. 2017. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/petroleo-derivados/155-combustiveis/1857-oleo-diesel>>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Petróleo e Derivados**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/petroleo-e-derivados2>>. Acesso em: 19 fev. 2019.
- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Resolução ANP n° 5**. Fevereiro de 2009.
- AGNELLO, A. C. et al. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. **Science of the Total Environment**, v. 563-564, p. 693-703, 2016.
- AGU, I.V.; IBIENE, A.A.; OKPOKWASILI, G.C. Effect of micronutrients and macronutrients on the biodegradation of phenol in biological treatment of refinery effluent. **Microbiology Research Journal International**, v. 18, n. 3, p. 1-12, 2017

ALEF, K. Estimation of microbial activities. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Org). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Academic Press, 1995, p. 193-270.

ALLEBRANDT, S. R. **Aplicação de microrganismos para remediação de áreas contaminados com hidrocarbonetos**. 2015. 76 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

ALMEIDA, F. M; SOUZA, D. M; LUIZ, J. G. Contaminação por hidrocarbonetos em postos de serviços em Abaetetuba – PA: um estudo com georadar. **4º PDPETRO**, Campinas, p. 21-24, 2007.

ÁLVAREZ, M. et al. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions: Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in Antarctica. **Science of Total Environment**, v. 590-591, p. 194-203, 2017.

ALVEZ, A. K.; ALVEZ, B.; MARTINS, L. O petróleo e os impactos do seu derramamento no ecossistema de uma região. **Bolsista de Valor**, Campos dos Goytacazes-RJ, v. 3, 2013.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

ANDREOLLI, M. et al. Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons: A comparative study. **Journal of Environmental Management**, v. 153, p. 121-131, 2015.

ARMAS, E. D. **Biodegradação: aspectos teóricos e aplicação**. Universidade de São Paulo. 2017. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4131960/mod_resource/content/0/Biodegradacao_aulas1e2_2spp.pdf>. Acesso em: 30 mai. 2019.

AZEREDO, A.; MEIRE, Rodrigo O.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 188-201, 2007.

AZHARPOOR, A.; ROSTAMI, S. The application of plant growth regulators to improve phytoremediation of contaminated soils: A review. **Chemosphere**, v. 220, p. 818-827, 2019.

BADZINSKI, C. **Potencial de atenuação natural de diesel (B8) e biodiesel (B100) em latossolo vermelho sem histórico de contaminação**. 2018. 141 p. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis) – Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2018.

BANAT, I. M; PLAZA, G. A; ZJAWIONY, I. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v.50, n.1, p. 71-77, 2006.

- BAPTISTA, S. J.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. D. C. Avaliação da bioestimulação em solos argilosos contaminados com petróleo. **2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo & Gás**. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- BENTO, Douglas Mayer. **Análise química da degradação dos hidrocarbonetos de óleo diesel no estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS**. 2005. 112 p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) - Curso de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2005.
- BENTO, F. M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. de O.; GAYLARDE, C. C. Biosurfactantes. In: MELO, I. S.; AZEVEDO J. L. (Org). **Microbiologia ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008, cap. 7, p. 151-184.
- BEZZA F. A.; BEUKES M.; CHIRWA E. M. N. Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1911-1922, 2015.
- BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactante by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 231-236, 1999.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation Technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 63-67, 2000.
- BREHM, F. de A.; RICHTER, L. **Avaliação da contaminação de sedimentos do rio Iguaçu e Barigui por derivados do petróleo**. 2013. 68 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Bacharelado e Licenciatura em Química Tecnológica com Ênfase Ambiental) - Departamento acadêmico de química e biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- BRIASSOULIS, D.; MISTRITIS A. Key parameters in testing biodegradation of bio-based materials in soil. **Chemosphere**, 2018.
- BROWN et al. Comparison of *landfarming* amendments to improve bioremediation of petroleum hydrocarbons in Niger Delta soils. **Science of the Environment**, v. 596-597, p. 284-292, 2017.
- BRZESZEZ, J.; KASZYCKI, P. Aerobic bacteria degrading both *n*-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility. **Biodegradation**, v. 29, p. 359-407, 2018.
- BÜCKER, F. et al. Evaluation of the detritogenic microbial community using qPCR, *n*-alkanes and FAMES biodegradation in diesel, biodiesel and blends (B5, B10, and B50) during storage. **Fuel**, v. 233, p. 911-917, 2018.

BUSHNELL, L.D.; HAAS H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41, n.5, p. 653-673, 1941.

CASE C. L.; FUNKE B. R.; TORTORA G. J. Anatomia funcional de células procarióticas e eucarióticas. In: **Microbiologia**. 12 ed. Porto Alegre: Artemed, 2017. cap. 4, p. 72-106.

CASE C. L.; FUNKE B. R.; TORTORA G. J. Crescimento microbiano. In: **Microbiologia**. 12 ed. Porto Alegre: Artemed, 2017. cap. 6, p. 149-175.

CASE C. L.; FUNKE B. R.; TORTORA G. J. Observando microrganismos no microscópio. In: **Microbiologia**. 12 ed. Porto Alegre: Artemed, 2017. cap. 3, p. 51-71.

CASTRO-GUTIÉRREZ, V. M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; VARGAS-AZOFEIFA, I. Hydrocarbon degrading microflora in a tropical fuel-contaminated aquifer: Assessing the feasibility of PAH bioremediation. **International Journal of Environmental Research**, v. 6, n. 1, p. 345-352, 2012.

CERQUEIRA, V. S. et al. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical for application in bioremediation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1203-1222, 2012.

CHEBBI, A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 122, p. 128-140, 2017.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 224-229, 1987

COSTA, A. H. R.; NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. Biorremediação de água subterrâneas impactadas por gasolina e etanol com uso de nitrato. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 2, p.2 265-274, 2009.

CRUZ, G. F. **Biodegradação aeróbia e anaeróbia de petróleo do Campo Pampo Sul, Bacia de Campos, RJ**. 2009. 345 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química, Campinas, 2009.

DANGI, A. K.; SHARMA B.; SHUKLA P. Contemporary enzyme based Technologies for bioremediation: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 2010, p. 10-22, 2018.

DELLA-FLORA, I. K. **Avaliação da biodegradação de diesel por consórcio bacteriano sob diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio em meio mineral líquido**. 2018. 77 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2018.

DEVI, M. P. et al. Effect of co-culture and nutrients supplementation on bioremediation of crude petroleum sludge. **Clean – Soil, Air, Water**, v. 39, n. 10, p. 900-907.

DEON M. C. et al. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural. **Semina: Ciências Exatas e Tecnologia**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 73-82, 2012

DI GREGORIO, S. et al. Isolation and characterization of a hydrocarbonoclastic bacterial enrichment from total petroleum hydrocarbons contaminated sediments: potential candidates for bioaugmentation in bio-based processes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 11, p. 10587-10594, 2016.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Compostagem de resíduos agrícolas em leiras estáticas**. 2010. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/solos/busca-de-solucoes-tecnicas/-/produto-servico/1420/compostagem-de-residuos-agricolas-em-leiras-estaticas>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

EPA Guidelines. Soil bioremediation. **EPA 589/05**. United States. November 2005.

FAN, M-Y.; GONG, D.; QIN, G. Bioremediation of petroleum-contaminated soil by biostimulation amended with biochar. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 150-155, 2013.

GEETHA; JOSHI, S. J; KATHROTIYA, S. Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacterial isolate from oil contaminated sites. **APCBEE Procedia**, v. 5, p. 237-241, 2013.

GREENPEACE. **Poluentes orgânicos persistentes: Poluição invisível e global**. Disponível em: <http://greenpeace.org.br/toxicos/pdf/poluentes.pdf>. Acesso em: 2 ago. 2019.

GROGA, A. B. et al. Cell surface hydrophobicity (CSH) of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus niger* and the biodegradations of Diethyl Phthalate (DEP) via Microcalorimetry. **Journal of American Science**, 2010.

GUDIÑA, Eduardo J. et al. Novel biomulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. **Microbial Cell Factories**, v. 14, 2015.

GUIMARÃES, L. B. **Identificação da presença de combustíveis em subsuperfície através de técnicas de biologia molecular**. 2011. 120 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

HABIB, S.; YASID, N. A. Screening of hydrocarbon-degrading bacterial isolates using the redox applications of 2,6-DCPIP. **Bioremediation Science and Technology Research**, v. 5, n. 2, p. 13-16, 2017.

HALECKY, M. et al. Biofiltration of gasoline and diesel aliphatic hydrocarbons. **Journal of the Air and Waste Management Association**, v. 65, n. 2, p. 133-144, 2015.

INGRAM, L. O.; BUTTKE, T. M. Effects of alcohols on micro-organisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 25, 1984.

KENSA, V. M. Bioremediation: an overview. **Jr. of Industrial Pollution Control**, v. 27, n. 2, p. 161-168, 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**, v. 104, p. 158-164, 2017.

KONOPKA, A.; ZAKHAROVA, T. Quantifications of bacterial lead resistance via activity assays. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, p. 17-22, 1999.

KUMAR, P.; MANJUNATHA. Studies on hydrocarbon degradation by the bacterial isolate *Stenotrophomonas rhizophia* (PM-1) from oil spilled regions of Western Ghats of Karnataka. **Science, Technology and Arts Research Journal**, v. 4, n. 3, p.139-144, 2015.

LÃZÃROAIE, M. M. Multiple responses of Gram-positive and Gram-negative bacteria to mixture of hydrocarbons. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 649-667, 2010.

LEO, P. et al. Processos biol3gicos: biorremedia33o. In: MAXIMIANO, A. M. de S.; MORAES, S. L.; TEIXEIRA, C. E. **Guia de elabora33o de planos de interven33o para o gerenciamento de 3reas contaminadas**. 1. ed. S3o Paulo: IPE e BNDES, 2014. cap. 8, p. 231-266.

LIMA, S. D et al. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bact3ria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 2019.

LOPES, E. M. et al. Emulsification properties of biomulsifies produced by wild-type and mutante *Bradyrhizobium elkanii* strains. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v. 5, n. 6, 2014.

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

MARANHO, L. T.; SILVA, B. M. Petroleum-contaminated sites: Decision framework for selecting remediation technologies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 378, 2019.

MARGESIN, R.; HÄMMERLE, M.; TSCHERKO, D. Micorbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: Effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 259-269, 2007.

MARIANO, A. P. **Avalia33o do potencial de biorremedia33o de solos e de 3guas subterrâneas contaminadas com 3leo diesel**. 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Geoci3ncias e Meio Ambiente) – Programa de P3s-Gradua33o em Geoci3ncias e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARTINS, B. A. D. **Avalia33o da cin3tica de biodegrada33o do etanol em concentra33es m3nimas necess3rias dos nutrientes nitrog3nio e f3sforo**. 2004. Disserta33o (Mestrado em Engenharia Ambiental na 3rea de Tecnologia em Saneamento Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florian3polis, 2004.

MATHEW, B. B.; KRISHNAMURTHY, N. B. Screening and identification of bacteria isolated from industrial area groundwater to study lead sorption: Kinetics and statistical optimization of biosorption parameters. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 7, p. 313-327, 2018.

MEHDI, H.; GITI, E. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 170-178, 2008.

MENEGHETTI, L. R.R. **Biorremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. 2007. 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2007.

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

MOHAN, S. R.V. et al. Bioremediation of petroleum sludge under anaerobic microenvironment: influence of biostimulation and bioaugmentation. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 10, n. 11, p. 1609-1616, 2011.

MORAIS, K. A. D de et al. Produção de biossurfactante por *Bacillus* sp, em meio mínimo contendo glucose. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, p. 3084-3094, 2015.

MORALES-GUZMÁN, G. et al. Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons. **Applied Soil Ecology**, v. 121, p. 127-134, 2017.

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

MUÑOZ, A. J. et al. Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption. **Chemical Engineering Journal**, v. 210, p. 325-332, 2012.

MURSHID, S. et al. Enhanced biodegradation of hydrocarbons in petroleum tank bottom oil sludge and characterization of biocatalysts and biosurfactants. **Journal of Environmental Management**, v. 220, p. 87-95, 2018.

MUTECA, F. L. L. **Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola**. 2012. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

NAKAMURA, F. M.; GERMANO, M. G.; TSAI, S. M. Capacity of aromatic compound degradation by bacteria from Amazon Dark Earth. **Diversity**, v. 6, p. 339-353, 2014.

NELSON, D. K.; LAPARA, T. M.; NOVAK P. Effects of ethanol-based fuel contamination: Microbial community changes, production of regulated compounds, and methane generation. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 12, p. 4525-530, 2010.

NIAZY, Z.; HASSANSHAHIAN, M.; ATA EI, A. Isolation and characterization of diesel-degrading *Pseudomonas* strains from diesel-contaminated soils in Iran (Fars province). **Pollution**, v. 2, n. 1, p. 67-75, 2016.

NISHANTHI, R. et al. Screening of biosurfactants from hydrocarbon degrading bacteria. **Journal of Ecobiotechnology**, v. 2, n. 5, p. 47-53, 2010.

NZILA, A. Current status of the degradation of aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons by thermophilic microbes and future perspectives. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, 2018.

OLIVEIRA, N. M. **Biorremediação de solos contaminados com gasolina pura, gasolina comercial e etanol**. 2015. 210 p. Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental do Instituto de Pesquisas Hidráulicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

OLIVEIRA, N. M. et al. Biodegradation of comercial gasoline (24% etanol added) in liquid medium by microorganisms isolated from a *landfarming* site. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 46, p. 86-96, 2011.

OWSIANIAK, M. et al. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactantes. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1497-1500, 2009.

PEREIRA, E. V. **Hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH *Finger Print*) como indicador de contaminação na água subterrânea por querosene de aviação**. 2012. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo, 2012.

PERELO, L. W. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. **Journal of Hazardous Materials**. v. 177, p. 81-89, 2010.

PÉREZ-DE-MORA, A.; ENGEL, M.; SCHLOTTER, M. Abundance and diversity of *n*-alkane-degrading bacteria in a forest soil co-contaminated with hydrocarbons and metals: A molecular study on *alkB* homologous genes. **Soil Microbiology**, v. 62, p. 959-972, 2011.

PETROBRAS - Petróleo Brasileiro S.A. **Diesel comum S10 e S500**. Disponível em: <<http://www.br.com.br/pc/produtos-e-servicos/para-seu-veiculo/oleo-diesel-veiculo/diesel+comum+s-10+e+s-500/diesel+comum+s-10+e+s-500>>. Acesso em: 18 mai. 2019.

PETROBRAS - Petróleo Brasileiro S.A. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – FISPQ**. Produto: Etanol Hidratado Combustível (EHC). 2019

PETROBRAS - Petróleo Brasileiro S.A. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – FISPQ**. Produto: GAV 100/130. 2019.

PETROBRAS - Petróleo Brasileiro S.A. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – FISPQ**. Produto: Óleo Diesel S500. 2019

PETROBRAS - Petróleo Brasileiro S.A. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico – FISPQ**. Produto: Óleo Diesel S10. 2019

PETROBRAS - Petróleo Brasileiro S.A. **Gasolina de aviação**. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/pt/produtos-e-servicos/produtos/aviacao/gasolina-de-aviacao/>>. Acesso em: 17 set. 2019.

PETROBRAS - Petróleo Brasileiro S.A. **Gasolina de aviação**: informações técnicas. 2014. v. 1.0. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/minisite/assistenciatecnica>>. Acesso em: 22 set. 2019.

PHAN, C-W.; ABU, N. F.; HAMZAH, A. A comparative study on biosurfactant activity of crude oil-degrading bacteria and its correlation to total petroleum hydrocarbon degradation. **Bioremediation Journal**, v. 17, n. 4, p. 240-251, 2013.

PLAZA, G. A.; ULFIG, K.; BRIGMON, R. L. Surface active properties of bacterial strains isolated from petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 161-167, 2005.

RAMASAMY, S.; MATHIYALAGAN, P.; CHANDRAN, P. Characterization and optimization of EPS-producing and diesel oil-degrading *Ochrobactrum anthropi* MP3 isolated from refinery wastewater. **Pet. Sci.**, v. 11, p. 439-445, 2014.

RIO GRANDE DO SUL. Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler. **Acidentes de transporte de produtos e resíduos perigosos**. 2018. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/emergencia/rel_acidentes.>. Acesso em: 8 mai. 2019.

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

ROY, A. et al. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 22-32, 2018

SÃO PAULO. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). **Relatório de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo**. Governo do Estado de São Paulo, 2018. 12 p.

SARKAR, D. et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. Department of Earth and Environmental Science. **Environmental Pollution**, v. 136, p. 187-195, 2005.

SAMPAIO, C. J. S. et al. Analysis of petroleum biodegradation by a bacterial consortium isolated from worms of the *polychaeta* class (Annelida): Implications for NPK fertilizer supplementation. **Journal of Environmental Management**, v. 246, p. 617-624, 2019.

- SARKAR, P. et al., Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentations agent for *in situ* bioremediation. **Bioresource Technology**, 2017.
- SEABRA, P. N. C. Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo. 2005. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.
- SEABRA, P. N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: MELO, I. S.; AZEVEDO J. L. (Org). **Microbiologia ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008, cap. 24, p. 547-570.
- SERRANO, A. et al. Natural attenuation of diesel aliphatic hydrocarbons in contaminated agricultural soil. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 494-502, 2008.
- SHAHI, A. et al. Evaluation of microbial and functional genes during the bioremediations of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 125, p. 153-160, 2016.
- SHARMA, R.; SINGH, J.; VERMA, N. Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 132-139, 2018
- SOUZA, M. M. de et al. Biodegradation potential of *Serratiamarcescens* for diesel/biodiesel blends. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 110, p. 141-146, 2016.
- STEINER, L. V. et al. Ethanol content in different gasohol blend spills influences the decision-making on remediation technologies. **Journal of Environmental Management**, v. 212, p. 8-16, 2018.
- SUNITA, V. et al. Isolation and screening for hydrocarbon utilizing bacteria (HUB) from petroleum samples. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 48-60, 2013.
- TRAMONTINI, L. **Microrremediação de um solo contaminado com a mistura diesel/biodiesel**. 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- U.S Environmental Protection Agency. A guide for corrective action plan reviewers. **EPA 510-B-17-003**. United States. October, 2017.
- U.S Environmental Protection Agency. A guide for corrective action plan reviewers. **EPA 510-B-95-007**. United States. May 1995.
- U.S Environmental Protection Agency. Use of Bioremediation at Superfund Sites. **EPA-542-R-01-019**. United States. September 2001.

VIEIRA, F. C. dos S. **Toxicidade de hidrocarbonetos monoaromáticos do petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlântica* (Crustácea: Mysidacea)**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

WELTER, N. **Potencial microbiano para degradação de combustíveis e investigação de métodos para biorremediação de solo contaminado com diesel comercial em microcosmos**. 2018. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2018.

XIA, W. et al. Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Hazardous Materials**, v. 276, p. 489-498, 2014.