Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologias e Ciências
Instituto de Química

Roberta Carvalho Ciannella

Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por diesel B5

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Roberta Carvalho Ciannella

Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por diesel B5

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química Ambiental.

Orientadora: Prof[a] Dr[a]. Denise Celeste Godoy de Andrade Rodrigues
Co-orientadora: Prof[a] Dr[a]. Marcia Marques Gomes

Rio de Janeiro
2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

C566 Ciannella, Roberta Carvalho.
Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por diesel B5. / Roberta Carvalho Ciannella. - 2010.
182 f.

Orientador: Denise Celeste Godoy de Andrade Rodrigues.
Co-orientador: Marcia Marques Gomes.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Biorremediação - Teses. 2. Solos - Contaminação – Teses. 3. Hidrocarbonetos - Teses. I. Rodrigues, Denise Celeste Godoy de Andrade. II. Gomes, Marcia Marques. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU628.5

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

_____ _____

Assinatura Data

Roberta Carvalho Ciannella

Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por diesel B5

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química Ambiental.

Aprovado em _____

Banca Examinadora:

_____
Prof[a]. Dr[a]. Denise Celeste Godoy de Andrade Rodrigues (Orientadora)
Faculdade de Tecnologia de Resende da UERJ

_____
Prof[a]. Dr[a]. Marcia Marques Gomes (Co-orientadora)
Faculdade de Engenharia da UERJ

_____
Prof. Dr. Fábio Merçon
Instituto de Química da UERJ

_____
Dr[a]. Simone Lorena Quiterio de Souza
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ

_____
Dr. Gandhi Giordano
Faculdade de Engenharia da UERJ

Rio de Janeiro
2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Nice, pelo seu apoio incondicional. Meu imenso amor, respeito e admiração pelos seus dois grandes papéis na minha vida: mãe e pai. Ao Rodrigo, meu noivo, pelos momentos de paciência e companheirismo durante essa jornada de dois anos, e acima de tudo, pelas inúmeras vezes em que acreditou muito mais em mim do que eu mesma.

AGRADECIMENTOS

A orientadora Denise Celeste Godoy de Andrade Rodrigues, pela oportunidade de aprendizado e crescimento intelectual.

A co-orientadora Marcia Marques Gomes, não apenas pela oportunidade de aprendizado e crescimento intelectual, mas também pela confiança depositada em mim e disponibilização do laboratório LABIFI, que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, por viabilizar a realização do projeto de pesquisa coordenado pela co-orientadora, (Processo 577176/2008-0, Edital MCT/CNPq/CT-Agro/CT-Hidro/MAPA-SDC-SPAE nº 44/2008 - Recuperação de Áreas Degradadas), ao qual a presente dissertação está vinculada e pela bolsa de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial (DTI-2) a mim conferida.

A Empresa Korin – Preservação e Recuperação do Meio Ambiente Ltda, pelo apoio financeiro sob forma de bolsa de estágio e pelo fornecimento do consórcio de microorganismos para os experimentos.

A Pesagro-Rio, pelo acesso e obtenção do solo utilizado no estudo.

A Embrapa Solos, especialmente ao Dr. Daniel Vidal Pérez, pela realização das análises de caracterização do solo, e ao colega Mário Aglio, pela elaboração do mapa de distribuição de planossolos no Brasil e no Estado do Rio de Janeiro.

Ao laboratório Analytical Solutions-RJ, em especial, a Bárbara Prestes, pelas análises cromatográficas das amostras de solo, caracterização do óleo diesel e do biodiesel B5, e por todas as dúvidas analíticas esclarecidas.

Ao Prof. Sérgio Machado Corrêa, da FAT, UERJ-Resende, pela doação do óleo diesel e do biodiesel de soja utilizados no estudo.

Ao Departamento de Geociências do CENPES, em especial, a Fátima, “Fatinha” para os amigos, pelas análises de carbono orgânico. Fatinha, meus sinceros agradecimentos não apenas pelas análises, mas também pela nossa sincera e profunda amizade.

A minha grande amiga Cristiane Chafim ou simplesmente “Cris”, por toda ajuda dispensada no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo carinho, pela amizade sincera, pelos dias em que chegou às 6 h no laboratório para ajudar nas extrações, pelos e-mails e telefonemas carinhosos, pelas risadas no laboratório, enfim, por tudo que você já sabe e que não caberia somente nesta folha.

A outra grande amiga Graciane pela ajuda na coleta do solo e discussões durante a condução dos experimentos. Meus sinceros agradecimentos pela sua amizade, presteza e companheirismo. Acredito que aprendemos muitas coisas juntas sobre biorremediação.

A aluna de iniciação científica Érica Queiros, pela ajuda na condução dos experimentos e ao amigo Rodrigo Muniz, pela ajuda na coleta do solo de estudo.

A Francielle Bucker, da UFRGS, e ao Dr. Adriano Pinto Mariano, USP, pela disponibilização de algumas referências bibliográficas e trocas de informações a respeito dos testes de biodegradabilidade.

E por último, porém não menos importante, ao Rodrigo, meu noivo, não apenas pelo companheirismo, mas também pela ajuda nas análises estatísticas dos dados experimentais.

A terra não pode ser vista nem como um ecossistema a ser preservado inalterado nem como um canteiro para ser explorado por razões egoístas e econômicas de curto prazo, mas sim como um jardim a ser cultivado para o desenvolvimento das próprias potencialidades da aventura humana.

René Dubos (1901-1982), bacteriologista.

RESUMO

CIANNELLA, Roberta Carvalho. Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por diesel B5. 182 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

No Brasil, a contaminação do solo por derramamentos de combustíveis representa um dos mais graves problemas ambientais e o impacto da introdução de novas misturas como diesel/biodiesel na matriz energética requer investigação quanto a tecnologias apropriadas de remediação. O presente estudo teve por objetivo avaliar diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado experimentalmente com óleo diesel B5. Foram conduzidos três experimentos. No primeiro, quatro microcosmos em duplicata, contendo 500 g de solo e 5% (p/p) de óleo diesel B5, todos suplementados com oxigênio através de revolvimento manual e com ajuste de umidade, tiveram como tratamentos: bioestímulo com ajuste de pH (BE_1); bioestímulo com ajuste de pH e nutrientes (BE_2); bioaumento com ajuste de pH, nutrientes e adição de consórcio microbiano comercial KMA (BAM) e; controle abiótico, com ajuste de pH e solo esterilizado em autoclave (PA). Paralelamente, foi conduzido tratamento por bioaumento com ajuste de pH e nutrientes, suplementação de oxigênio e consórcio KMA, em solo contaminado apenas por diesel a 5% (BAD). A população microbiana foi monitorada através da contagem de UFC e os tratamentos, avaliados pela remoção de carbono orgânico e de hidrocarbonetos de petróleo (n-alcanos C_{10}-C_{36}). No segundo experimento, o metabolismo microbiano aeróbio foi avaliado através da produção de CO_2 em respirômetros de Bartha (triplicatas), em solo contaminado com 5% (p/p) de óleo diesel B5, ajustado para pH e umidade, nas seguintes condições: solo com adição do consórcio KMA; solo com adição de cultura microbiana obtida a partir de outro solo proveniente de um posto de combustível com histórico de vazamento de tanques (RES) e; solo esterilizado por adição de azida de sódio a 0,3% (p/p). Como controle, solo sem contaminação, com sua população microbiana autóctone. No terceiro experimento, a capacidade da microbiota autóctone (EX), assim como do consórcio KMA e da cultura RES, em biodegradar óleo diesel B5, diesel e biodiesel de soja foi testada através do uso de indicadores de oxirredução DCPIP e TTC. Os experimentos em microcosmos indicam que houve uma complementaridade metabólica entre a população nativa e o consórcio comercial de microorganismos KMA, cuja presença promoveu um decaimento mais rápido de n-alcanos nas primeiras semanas do experimento. No entanto, após 63 dias de experimento, os tratamentos BAM, BAD e BE_2 apresentaram, respectivamente, em média, 92,7%, 89,4% e 81,7% de remoção dos hidrocarbonetos n-alcanos C_{10}-C_{36}, sendo tais diferenças, sem significância estatística. Nos respirômetros, o bioaumento com cultura microbiana RES apresentou a maior produção de CO_2 e a maior remoção de hidrocarbonetos (46,2%) após 29 dias. Tanto nos ensaios em microcosmos quanto nos respirométricos, não foi possível estimar a contribuição dos processos abióticos, tendo em vista evidências da existência de atividade microbiana no solo esterilizado térmica ou quimicamente. Os ensaios com os dois indicadores redox mostraram que apenas a microbiota nativa do solo em estudo e a cultura microbiana RES apresentaram potencial para degradar óleo diesel B5, biodiesel de soja ou diesel, quando colocadas em meio mineral contendo tais combustíveis como única fonte de carbono.

Palavras-chave: biorremediação, hidrocarbonetos de petróleo; mistura de diesel e biodiesel, bioaumento; indicadores redox.

ABSTRACT

In Brazil, the contamination of soils due to spill of fuels is one of the most serious environmental problems. The impact of introducing new fuel mixtures in the energy matrix, such as diesel/biodiesel requires investigation regarding appropriate remediation technologies. The objective of this study was to assess different bioremediation strategies for treatment of soil spiked with diesel B5 (diesel plus 5% of biodiesel w/w). Three experiments were carried out. In the first, four microcosms (in duplicate), with 500g of soil and 5% (w/w) of diesel B5 each, being all of them supplied with oxygen by manual stirring and with moisture, performed the following treatments: bio-stimulation with pH adjustment (BE_1); bio-stimulation with pH and nutrients (N, P) adjustment (BE_2); bio-augmentation with pH and nutrients adjustment and addition of a commercial consortium of microorganisms KMA (BAM); abiotic processes control with pH adjustment and soil that underwent thermal sterilization (PA). As a control of the effect of biodiesel, a bio-augmentation treatment was carried out with pH and nutrients adjustment, oxygen supply and addition of KMA consortium, in soil contaminated only with diesel at 5% (w/w) (BAD). The microorganism's populations were monitored through colony-forming units CFU, and the treatment efficiency was estimated based on removal of total organic carbon (TOC) and petroleum hydrocarbon (n-alkanes C_{10}-C_{36}). In the second experiment, the microorganism's aerobic metabolism was assessed through measurement of the CO_2 production in Bartha's respirometers in triplicates, pH and moisture adjustment, under the following conditions: Contaminated soil inoculated with KMA consortium; contaminated soil inoculated with a microorganism's culture obtained from another soil excavated from a gas station with leaking from the tanks (RES); contaminated soil sterilized with sodium azide 0.3% (w/w) (PA). As a control, soil with no contamination and its indigenous microbiota was monitored. In the third experiment, the capacity of the indigenous microbiota (EX), as well as the consortia KMA and RES in biodegrading diesel B5 and pure biodiesel from soil-beans were assessed by using the oxi-reduction indicators DCPIP and TTC. The experiments in microcosms showed a higher percentage of decay in n-alkanes C_{10}-C_{36} during the first weeks, in those microcosms where commercial consortium KMA was added, suggesting metabolic complementation between the indigenous and the KMA microbiota. However, after 63 days, the treatments BAM, BAD and BE_2 showed respectively the average removal of 92.7%, 89.4% and 81.7% of n-alkanes C_{10}-C_{36}, been the differences statistically not significant. In both experiments (microcosms and Bartha respirometers) it was not possible to estimate the contribution of the abiotic processes alone, due to clear indication of microbiological activity in the soils that underwent thermal or chemical sterilization. In the Bartha respirometers, bio-augmentation with the RES culture presented higher CO_2 production and the highest hydrocarbons removal (46.2%) after 29 days. The assays with the redox indicators showed that both the native microbiota of the soil and the RES microbial culture presented potential to degrade diesel B5, biodiesel and diesel, when placed in mineral media with these fuels as the only carbon source.

Keywords: bioremediation; petroleum hydrocarbons; mixture of diesel and biodiesel; bioaugmentation; redox indicators.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química e toxicologia de alguns hidrocarbonetos mono e policíclicos aromáticos 24
Figura 2 - Representação esquemática do comportamento dos hidrocarbonetos no solo 27
Figura 3 - Reação de transesterificação de um triglicerídeo 31
Figura 4 - Transformação de contaminantes orgânicos no solo pelos micro-organismos..... 40
Figura 5 - Fatores que influenciam a biodegradação de hidrocarbonetos no solo 41
Quadro 1 - Gêneros microbianos degradadores de hidrocarbonetos no solo 47
Figura 6 - Via metabólica de biodegradação de um n-alcano 48
Figura 7 - Via metabólica de degradação do ciclohexano 48
Figura 8 - Rotas metabólicas utilizadas pelos micro-organismos na degradação de HPAs ... 49
Quadro 2 - Principais técnicas de biorremediação de solos contaminados 51
Figura 9 - Foto por satélite do local de coleta do solo de estudo 61
Figura 10 - Representação esquemática da montagem dos microcosmos de bancada 66
Figura 11 - Processo de aclimatação do consórcio KMA e da cultura microbiana RES 73
Figura 12 - Esquema do respirômetro de Bartha preconizado na NBR 14283 74
Figura 13 - Respirômetro de Bartha utilizado no experimento de biodegradação 74
Figura 14 - Representação esquemática da montagem dos respirômetros de Bartha..... 76
Figura 15 - Mudança da coloração dos indicadores durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos..... 80
Figura 16 - Método das diluições seriais sucessivas para contagem microbiana..... 85
Figura 17 - Mapa da distribuição de planossolos no Brasil e no Estado do Rio de Janeiro..... 91
Figura 18 - Curva de neutralização pH x $Ca(OH)_2$ (g)..... 94
Figura 19 - Perfil da população microbiana (Log UFC g^{-1} de solo) nos diferentes tratamentos, no decorrer do 1º experimento de biodegradação (microcosmos) 99
Figura 20 - Crescimento microbiano observado entre o 14º dia e o 63º dia (microcosmos de bancada)..... 103
Figura 20 - Variação da temperatura ambiente do laboratório ao longo do período de 63 dias 104
Figura 22 - Teores médios de n-alcanos ($\sum C_{10}$-C_{36}) em mg kg^{-1}, nos diferentes tratamentos ao longo dos 63 dias de experimento 105
Figura 23 - Razões *n*-C_{17}/pristano nos tratamentos adotados ao longo dos 63 dias de experimento 110

Figura 24 - Razões *n*-C_{18}/fitano nos tratamentos adotados ao longo dos 63 dias de experimento 111
Figura 25 - Porcentagem dos n-alcanos ($\sum C_{10}$-C_{36}) remanescente nos tratamentos adotados ao longo do experimento 113
Figura 26 - Teores médios de COT (g kg^{-1}) no início e final do 1º experimento de biodegradação 115
Figura 27 - Variação da temperatura de incubação ao longo dos 29 dias de respirometria ... 118
Figura 28 - Produção diária de CO_2 durante os 29 dias de incubação..... 123
Figura 29 - Quantidade acumulada de CO_2 produzida por biodegradação durante os 29 dias de incubação 123
Figura 30 - Teste de biodegradabilidade do óleo diesel B5 na presença de TTC após 14 dias de incubação 130
Figura 31 - Teste de biodegradabilidade do óleo diesel B5 na presença de DCPIP após 14 dias de incubação 130
Figura 32 - Teste de biodegradabilidade do óleo diesel puro na presença de TTC após 14 dias de incubação 131
Figura 33 - Teste de biodegradabilidade do biodiesel de soja na presença de TTC após 14 dias de incubação 132
Figura 34 - Placas contendo meio sólido Agar-melaço evidenciando o crescimento da cultura microbiana RES após cultivo em meio líquido BH..... 166
Figura 35 - Placas contendo meio sólido Agar-melaço evidenciando o crescimento do consórcio comercial KMA após cultivo em meio líquido BH 166
Figura 36 - Comparação dos teores médios de COT entre os instantes zero e 63º dia, nos diferentes tratamentos adotados (microcosmos de bancada)..... 178
Figura 37 - Cromatogramas dos n-alcanos referentes aos tratamentos PA e BE_1..... 180
Figura 38 - Cromatogramas dos n-alcanos referentes aos tratamentos BE_2 e BAD..... 181
Figura 39 - Cromatogramas dos n-alcanos referentes ao tratamento BAM 182

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas de alguns hidrocarbonetos de petróleo..... 26
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do óleo diesel e biodiesel de diferentes origens..... 30
Tabela 3 - Custo estimado de algumas tecnologias de remediação de solo contaminado..... 34
Tabela 4 - Distribuição dos micro-organismos em diferentes profundidades do solo 38
Tabela 5 - Composição do meio de cultivo usado na ativação do consórcio KMA..... 64
Tabela 6 - Tratamentos utilizados nos ensaios de biodegradação com consórcio comercial KMA 65
Tabela 7 - Descrição das condições experimentais adotadas nos ensaios respiromêtricos de Bartha..... 75
Tabela 8 - Protocolo experimental dos testes de biodegradabilidade com óleo diesel B5, diesel puro e biodiesel de soja 81
Tabela 9 - Composição do meio Agar-melaço 86
Tabela 10 - Caracterização físico-química e microbiológica dos solos *in natura* utilizados nos experimentos de biodegradação..... 92
Tabela 11 - Caracterização do solo *in natura* quanto à presença de hidrocarbonetos de petróleo 95
Tabela 12 - Caracterização do solo *in natura* usado no preparo da cultura microbiana RES quanto à presença de hidrocarbonetos de petróleo 96
Tabela 13 - Caracterização química do óleo diesel puro e do diesel B5 quanto os hidrocarbonetos de petróleo..... 97
Tabela 14 - População microbiana heterotrófica total nos intervalos 0, 7, 14, 28, 42 e 63 dias98
Tabela 15 - Teores médios dos n-alcanos em mg kg^{-1} de solo, nos diferentes tratamentos adotados (microcosmos de bancada), nos períodos amostrais: 0, 7 e 14 dias 106
Tabela 16 - Teores médios dos n-alcanos em mg kg^{-1} de solo, nos diferentes tratamentos adotados (microcosmos de bancada), nos períodos amostrais: 28, 42 e 63 dias . 107
Tabela 17 - Valores médios de pH e umidade das amostras de solo no início e final da respirometria 117
Tabela 18 - Tores médios de COT e quantificação da população microbiana heterotrófica total nos ensaios de respirometria..... 119
Tabela 19 - Teores médios dos n-alcanos (ΣC_{10}-C_{36}) em mg Kg^{-1} de solo, no início e final dos ensaios respirométricos..... 121
Tabela 20 - Quantidade diária de CO_2 produzida durante os 29 dias de incubação..... 122

Tabela 21 - Eficiência de biodegradação (EB) e porcentagem de remoção dos n-alcanos nos diferentes tratamentos, ao final do período de 29 dias 127
Tabela 22 - Teste de biodegradabilidade do óleo diesel B5 usando os indicadores DCPIP e TTC 129
Tabela 23 - Teste de biodegradabilidade com diesel puro e biodiesel de soja na presença do indicador TTC 131
Tabela 24 - Crescimento microbiano (UFC mL^{-1}) do consórcio comercial KMA observado nos diferentes meios de cultivo testados 165
Tabela 25 - Comparação das médias de UFC entre os tratamentos nos instantes zero (0) e 7 dias 167
Tabela 26 - Comparação das médias de UFC entre os tratamentos nos instantes 14 dias e 28 dias 168
Tabela 27 - Comparação das médias de UFC entre os tratamentos nos instantes 42 dias e 63 dias 169
Tabela 28 - Comparação das médias de UFC entre os diferentes instantes de tempo no tratamento PA 170
Tabela 29 - Comparação das médias de UFC entre os diferentes instantes de tempo no tratamento BE_1 171
Tabela 30 - Comparação das médias de UFC entre os diferentes instantes de tempo no tratamento BE_2 172
Tabela 31 - Comparação das médias de UFC entre os diferentes instantes de tempo no tratamento BAD 173
Tabela 32 - Comparação das médias de UFC entre os diferentes instantes de tempo no tratamento BAM 174
Tabela 33 - Comparação dos teores de n-alcanos entre os diferentes tratamentos nos instantes zero (0) e 7 dias 175
Tabela 34 - Comparação dos teores n-alcanos entre os diferentes tratamentos nos instantes 14 dias e 28 dias 176
Tabela 35 - Comparação dos teores n-alcanos entre os diferentes tratamentos nos instantes 14 dias e 28 dias 177
Tabela 36 - Intervalos de confiança de 95% obtidos para as médias acumuladas de CO_2 através do método *Bootstrap* 179

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 18
1 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 22
1.1 **Problemática da contaminação do solo por óleo diesel** 22
1.1.1 Aspectos gerais do combustível 22
1.1.2 Comportamento do diesel após vazamento ou derramamento no solo 25
1.2 **Biodiesel: combustível substituto do petrodiesel** 28
1.2.1 Breve histórico do biodiesel como combustível 28
1.2.2 Aspectos gerais do biodiesel 30
1.3 **Biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos** 33
1.3.1 Aspectos gerais e fatores relevantes ao uso da tecnologia 33
1.3.2 Biodegradação e biorremediação microbiana 36
1.3.2.1 Micro-organismos do solo e o seu papel no processo de biodegradação 38
1.3.3 Fatores limitantes à biodegradação e à biorremediação 41
1.3.4 Biodegradabilidade dos hidrocarbonetos: mecanismos bioquímicos envolvidos 46
1.3.5 Técnicas e estratégias da biorremediação microbiana 50
1.3.5.1 Consórcios microbianos 56
1.3.6 Avaliação da biorremediação em laboratório 58
2 **MATERIAL E MÉTODOS** 60
2.1 **Solo de estudo: seleção e obtenção** 60
2.2 **Diesel B5 usado nos experimentos** 62
2.3 **Ensaios de biodegradação com consórcio comercial de micro-organismos eficazes da korin Meio Ambiente (*Embiotic Line*)** 63
2.3.1 Consórcio comercial KMA:preparo do inóculo 64
2.3.2 Montagem dos microcosmos: tratamentos adotados 65
2.3.3 Monitoramento dos tratamentos 68
2.3.4 Tratamento estatístico dos dados experimentais 70
2.4 **Ensaios de biodegradação em respirômetros de Bartha** 70
2.4.1 Obtenção da cultura microbiana RES 70
2.4.2 Consórcio comercial KMA 72
2.4.3 Aclimatação do consórcio comercial KMA e da cultura microbiana RES 72
2.4.4 Descrição dos respirômetros de Bartha 73
2.4.5 Montagem dos respirômetros: tratamentos adotados 75

2.4.6 Monitoramento dos ensaios respirométricos 77
2.4.7 Tratamento estatístico dos dados experimentais 78
2.5 **Teste de biodegradabilidade: indicadores redox DCPIP e TTC** 79
2.5.1 Preparo dos inóculos microbianos (culturas) para os testes de biodegradabilidade 80
2.5.2 Condução e monitoramento dos testes 81
2.6 **Metodologias analíticas** 82
2.6.1 Limpeza das vidrarias 82
2.6.2 Verificação e ajuste de pH 83
2.6.3 Determinação do teor de umidade 83
2.6.4 Capacidade de campo 84
2.6.4.1 Ensaios em microcosmos: 1º experimento 84
2.6.4.2 Ensaios de respirometria: 2º experimento 84
2.6.5 Quantificação microbiana heterotrófica total 85
2.6.6 Extração dos hidrocarbonetos de petróleo 87
2.6.7 Quantificação dos hidrocarbonetos: condições analíticas 87
2.6.8 Quantificação da produção de CO_2 88
2.6.9 Quantificação da produção de CO_2 por biodegradação 89
2.6.10 Quantidade de carbono biodegradado 89
2.6.11 Eficiência da biodegradação pela evolução de CO_2 90
3 **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 91
3.1 **Caracterização e ajuste do solo de estudo** 91
3.2 **Caracterização do solo usado no preparo da cultura microbiana RES** 96
3.3 **Caracterização analítica do óleo diesel puro e diesel B5** 96
3.4 **Ensaios de biodegradação com consórcio de micro-organismos eficazes KMA (*Embiotic Line*)** 97
3.4.1 Contagem microbiana: comportamento dos micro-organismos heterotróficos totais ao longo do experimento 97
3.4.2 Eficiência dos tratamentos 104
3.4.2.1 Remoção dos hidrocarbonetos 104
3.4.2.2 Remoção do carbono orgânico total (COT) 114
3.5 **Ensaios de biodegradação em respirômetros de Bartha** 117
3.5.1 pH, umidade e temperatura 117
3.5.2 COT e quantificação microbiana heterotrófica total 118
3.5.3 Decaimento dos hidrocarbonetos (n-alcanos C_{10}-C_{36}) e produção de CO_2 120

3.6 **Teste de biodegradabilidade: indicadores redox DCPIP e TTC** 129
4 **CONCLUSÕES E SUGESTÕES** 138
REFERÊNCIAS 141
APÊNDICE A - Avaliação preliminar da capacidade de crescimento do consórcio comercial KMA em meio de cultivo líquido 165
APÊNDICE B - Avaliação preliminar da capacidade de crescimento da cultura microbiana RES e do consórcio comercial KMA em meio de cultivo líquido .. 166
APÊNDICE C - Teste *Tukey*: comparação das médias de UFC entre os diferentes tratamentos através do tempo 167
APÊNDICE D - Teste *Tukey*: comparação das UFC entre os diferentes tempos por tratamento 170
APÊNDICE E - Teste *Tukey*: comparação dos teores de n-alcanos entre os diferentes tratamentos através do tempo 175
APÊNDICE F - Teste-*t*: comparação do COT entre os instantes zero e 63º dia para os tratamentos adotados 178
APÊNDICE G - *Bootstrap*: intervalos de confiança para as médias acumuladas de CO_2 em função do tempo..... 179
ANEXO A - Cromatogramas dos n-alcanos: início e final do experimento em microcosmos de bancada 180

INTRODUÇÃO

A crescente demanda mundial por derivados de petróleo, os efeitos ambientais de seu uso, principalmente, no setor de transporte e as perspectivas de esgotamento futuro das reservas petrolíferas, têm promovido uma verdadeira revolução no desenvolvimento e uso de fontes alternativas de energia (RATHMANN; BENEDETTI; PADULA, 2006; MELLO; PAULILLO; VIAN, 2007).

Dentro do segmento de combustíveis automotivos, o emprego de biocombustíveis obtidos de fontes renováveis como substitutos ou aditivos dos combustíveis fósseis é hoje meta ambiental de vários países, sendo uma das medidas necessárias para dar cumprimento ao protocolo de Quioto assinado em 1997 e em vigor desde 2005, no qual ficou acordada a redução das emissões dos gases causadores do efeito estufa (KHALIL, 2006; FERREIRA et al., 2008).

Recentemente, o foco de governos, empresas e pesquisadores acerca dos biocombustíveis não está mais restrito ao etanol, já utilizado por vários países, como Brasil e Estados Unidos. Atenções também se voltaram para o biodiesel, nome genérico dado a mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos a partir da transformação de óleos vegetais, e que devido a sua compatibilidade com o petrodiesel, pode substituí-lo nos motores do ciclo diesel sem qualquer necessidade de investimentos tecnológicos no desenvolvimento desses motores (DEMIRBAS, 2009). A utilização desse biocombustível no setor de transporte rodoviário e urbano tem se mostrado bastante vantajosa no que diz respeito à diminuição da poluição atmosférica gerada pela combustão do óleo diesel nos motores automotivos. O biodiesel, além de não possuir enxofre em sua composição, é um combustível oxigenado com elevado número de octano. Tais características favorecem não só a redução das emissões de óxidos de enxofre, mas também a qualidade da combustão, fato que, por sua vez, contribui para a redução das emissões de material particulado, monóxido de carbono e hidrocarbonetos não queimados (CORONADO et al., 2009; DEMIRBAS, 2009).

Atualmente, diversos países da União Européia, como Alemanha, França, Itália e Áustria, além dos Estados Unidos, produzem biodiesel comercialmente, através de unidades de produção com diferentes capacidades. Outros países, como Canadá, Japão, Argentina e Índia vêm investindo significativamente em programas de desenvolvimento, produção e viabilização comercial do mesmo (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005; MELLO; PAULILLO; VIAN, 2007).

O Brasil também acompanhou o movimento mundial e dirigiu sua atenção para projetos destinados ao desenvolvimento do biodiesel. Em dezembro de 2004 foi criado o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, que teve como principal ação a introdução do biodiesel derivado de óleos vegetais na matriz energética nacional através da promulgação da Lei Federal n° 11.097 de janeiro de 2005. (POUSA; SANTOS; SUAREZ, 2007; SUAREZ; MENEGHETTI, 2007). Essa lei não só estabeleceu o biodiesel como uma nova fonte energética, como também tornou obrigatória a adição de um percentual de 2% do mesmo (em volume) ao diesel automotivo comercializado a partir de janeiro 2008, com elevação para 5% em 2013. No entanto, desde janeiro de 2010, com a elevada capacidade produtiva e disponibilidade de matérias-primas, o óleo diesel automotivo comercializado em todo o território nacional passou a conter 5% de biodiesel, de acordo com a Resolução n° 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE, 2009; SUAREZ; MENEGHETTI, 2007). Desta forma, o Brasil, juntamente com a produção e uso do etanol em motores automotivos, vem contribuindo para a qualidade do ar atmosférico.

Além da preocupação mundial com a qualidade do ar, a preservação dos solos também se tornou uma questão estratégica dentro da política ambiental de diversas nações do mundo, dada a sua importância para o homem e os diversos episódios críticos de contaminação que tem causado a degradação da sua qualidade (NUNES; CORSEUIL, 2007; MARQUES, 2007).

No Brasil, especificamente, a contaminação do solo por combustíveis derivados do petróleo vem se tornando um dos mais graves problemas ambientais dos grandes centros urbanos. Em 2007, um levantamento realizado pela Secretaria Municipal de Meio Ambiente do Rio de Janeiro revelou que dos 1108 postos de revenda de combustíveis da cidade, 67% deles apresentavam perfil de contaminação no solo e subsolo (BARROS et al., 2008). Em 2010, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2010) reportou que os vazamentos de combustíveis em postos de revenda foram responsáveis por 79% dos casos de áreas contaminadas registradas no estado no ano de 2009.

Em função da elevada toxicidade de alguns compostos constituintes dos combustíveis, a contaminação do solo por esses produtos representa uma grande ameaça não apenas à sua qualidade, mas também a das águas subterrâneas, uma vez que ambos estão intimamente interligados. Além disso, esse tipo de contaminação pode resultar de forma imediata (ou não) em graves danos à vida e à saúde da população (FINOTTI; CAICEDO, 2001; GOUVEIA; NARDOCCI, 2007). Desta forma, a introdução de novos combustíveis ou de aditivos aos mesmos também podem configurar uma possível ameaça a qualidade dessas matrizes ambientais.

Para remediar solos e águas subterrâneas impactadas por petroderivados como o diesel, uma variedade de tecnologias e procedimentos tem sido utilizados atualmente, e um grande número de novas tecnologias tem se mostrado bastante atrativas e promissoras; dentre elas a biorremediação microbiana (BENTO et al., 2005; CHAGAS-SPINELLI, 2007). Tal tecnologia abrange um grupo de técnicas, que associadas a diferentes estratégias de tratamento, exploram a diversidade genética e a versatilidade metabólica de micro-organismos para transformar contaminantes ambientais em produtos finais mais estáveis e inócuos, os quais podem ser integrados aos ciclos biogeoquímicos (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005; SEPÚLVEDA; TREJO, 2002). Dentre as estratégias de biorremediação, o bioestímulo (ou bioestimulação), que envolve a adição de agentes estimulantes à atividade microbiana, como nutrientes e oxigênio, e o bioaumento que consiste na inoculação de culturas puras de micro-organismos ou consórcios microbianos com potencial para degradar o contaminante alvo, têm sido as mais reportadas na literatura atual (BENTO et al., 2005; DIAS, 2007; JACCQUES et al., 2007).

Recentemente, o interesse em se utilizar o bioaumento tem crescido substancialmente devido ao fato de que a inoculação de micro-organismos com habilidade de degradar determinado contaminante pode reduzir o tempo de tratamento. Dentro desse contexto, a utilização de consórcios microbianos tem sido preferida em oposição ao uso de um único micro-organismo em particular, pelo fato dos consórcios demonstrarem um potencial maior em metabolizar compostos orgânicos mais complexos (JACCQUES et al., 2008; MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2010).

De acordo com Melo e Azevedo (2008) a aplicabilidade e o sucesso de um programa de biorremediação de solos contaminados dependerão, em parte, de um bom planejamento inicial sobre isolamento e seleção de micro-organismos eficientes na degradação do contaminante em estudo. Logo, estudos acerca da biodegradação do contaminante são cruciais para a predição da taxa de remoção do mesmo, servindo de base não só para ampliação das possibilidades de aplicação dessa tecnologia de remediação, como também para o desenvolvimento de outras.

Tendo em vista a nova especificidade do diesel brasileiro, é de suma importância que estudos acerca de tecnologias para remediação de áreas contaminadas por esse produto em particular sejam conduzidos. Portanto, o presente trabalho, teve como objetivo principal avaliar, em escala laboratorial, diferentes estratégias de biorremediação de solo contaminado por óleo diesel B5, com ênfase no uso de consórcios e/ou culturas microbianas. Como objetivos específicos destacam-se:

- Investigar o efeito do bioaumento com consórcio comercial de micro-organismos eficazes da Empresa Korin - Preservação e Recuperação do Meio Ambiente Ltda, na remoção de hidrocarbonetos de petróleo em solo arenoso contaminado experimentalmente com óleo diesel B5, comparando-o à estratégias de bioestímulo (ajuste de pH e/ou adição de nutrientes);
- Avaliar o efeito da presença do biodisel na remoção dos hidrocarbonetos de petróleo associado ao bioaumento com consórcio comercial da Korin;
- Avaliar a atividade microbiana aeróbia através do método respirométrico de Bartha, padronizado pela norma brasileira NBR 14283 (ABNT, 1999), como parâmetro indicador da biodegradação do óleo diesel B5 no solo, em diferentes condições de bioaumento;
- Avaliar a influência da aclimatação de culturas microbianas na remoção de hidrocarbonetos de petróleo;
- Testar o potencial degradador do consórcio comercial de micro-organismos eficazes e outras culturas microbianas em biodegradar óleo diesel B5, diesel puro e biodiesel de soja, pelo uso dos indicadores de oxirredução DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol) e TTC (2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio).

Após esse capítulo introdutório, segue-se o capítulo 1 que apresenta uma revisão bibliográfica abrangendo: (i) a problemática da contaminação do solo por óleo diesel; (ii) a introdução do biodiesel como alternativa energética e suas principais características; (iii) os aspectos relevantes da biorremediação na remediação de solos contaminados, ressaltando as principais técnicas envolvidas e o uso de consórcios microbianos. No capítulo 2 apresentam-se as etapas desenvolvidas na avaliação das estratégias de biorremediação e as metodologias analíticas empregadas nos ensaios físico-químicos e microbiológicos para monitorar a eficiência dos processos de tratamento testados. No Capítulo 3 são apresentados os resultados da caracterização físico-química e microbiológica do solo, assim como os resultados dos ensaios de biodegradação. A discussão sobre os mesmos também se encontram apresentadas neste capítulo.

As conclusões e sugestões estão apresentadas no Capítulo 4. Ao término deste, estão listadas as referências utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. Ao final das referências, encontram-se os apêndices e anexos que complementam o trabalho.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica foi focada, principalmente, na problemática de solos contaminados por óleo diesel e nos principais aspectos relevantes à biorremediação como estratégia de remediação de solos impactados por combustíveis. Maior ênfase foi dada aos efeitos tóxicos e a biodegradabilidade dos hidrocarbonetos constituintes do diesel. No entanto, em função da nova especificidade do diesel brasileiro, aspectos importantes acerca da composição química e biodegradabilidade do biodiesel também foram brevemente discutidos.

1.1 Problemática da contaminação do solo por óleo diesel

1.1.1 Aspectos gerais do combustível

O óleo diesel convencional (ou petrodiesel) é um combustível líquido obtido do processo de refino do petróleo usado, principalmente, em motores que geram energia para veículos de elevada potência, como ônibus, caminhões, tratores, máquinas para mineração e drenagem, entre outros (BRAUN; APPEL; SCHMAL, 2003). No Brasil, esse petroderivado é considerado o propulsor do refino de petróleo por ser o insumo básico do transporte rodoviário, que, hoje é responsável pela maior parte do transporte de carga e de passageiros no país, consumindo cerca de 96% do total de óleo produzido (CNT, 2010; KOSERSKI; HESS; 2006). Em 2008, o volume comercializado desse combustível atingiu o patamar de 44,8 milhões m^3, correspondendo a 48,3% do total do mercado de vendas de derivados de petróleo (ANP, 2009a).

A composição comercial do óleo diesel é bastante complexa e variável, uma vez que esse petroderivado é formulado a partir da mistura de diversas frações intermediárias do refino do petróleo, denominadas óleo diesel leve e óleo diesel pesado, as quais também podem ser incorporadas outras frações como a nafta, querosene e gasóleo leve de vácuo, dependendo da demanda do derivado pelo mercado consumidor (PETROBRÁS, 2009). A origem do petróleo usado como matéria-prima e os aditivos a ele adicionados, tais como inibidores de corrosão, surfactantes e outros para melhorar a estabilidade e a ignição, também influenciam a composição comercial desse combustível (BRAUN; APPEL; SCHMAL, 2003).

Quimicamente, o óleo diesel é constituído por uma mistura de diversos hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos, que são os principais componentes do

petróleo cru (CARRETEIRO; BELMIRO, 2006). De acordo com Marchal et al (2003) a composição do óleo diesel pode conter de 2.000 a 4.000 hidrocarbonetos, sendo os parafínicos (n-alcanos e isoalcanos) e naftênicos (cicloalcanos) encontrados em maior abundância, cerca de 80% do total, e os aromáticos em menor proporção, cerca de 20%. Normalmente, os n-alcanos de 9 a 28 átomos de carbono na cadeia são predominantes (BRAUN; APPEL; SCHMAL, 2003; CHAGAS-SPINELLI, 2007).

Uma das principais características das frações do diesel combustível é o seu alto teor de enxofre que, segundo Baird (2002) está associada, dentre outros fatores, ao seu processo de produção. Em geral, o teor de enxofre das frações do petróleo aumenta com o ponto de ebulição. Como o diesel é destilado em uma faixa de temperatura superior a de outros combustíveis como, por exemplo, a gasolina, o mesmo, normalmente, apresenta maior porcentagem desse elemento. A presença elevada de enxofre, no entanto, representa um dos principais problemas ambientais relacionados à exaustão dos motores a diesel. Isso porque a combustão do combustível no motor promove a oxidação do enxofre presente, convertendo-o em óxidos de enxofre (SO_x) e sulfato, os quais contribuem não só para a formação de chuvas ácidas como também para a contaminação fotoquímica, mais conhecida como efeito *smog* (BAIRD, 2002; BRAUN; APPEL; SCHMAL, 2003).

No Brasil, o diesel comercializado atualmente possui um teor de enxofre superior ao que circula na Europa, que, em geral, contém cerca de 10 mg L^{-1} desse elemento. Nas regiões metropolitanas do país, o diesel contém 500 mg L^{-1} de enxofre. Em algumas capitais como São Paulo e Rio de Janeiro, há diesel com 50 mg L^{-1} desse elemento. No entanto, em cidades afastadas do perímetro das capitais, o diesel vendido chega a ter 1800 mg de enxofre por litro de óleo (PAGGETTO, 2009).

Apesar da importância do diesel como fonte energética, particularmente, no setor de transporte, o mesmo se configura como um dos principais contaminantes de solos e águas subterrâneas (MARCHAL et al., 2003). A contaminação dessas matrizes, pode ser resultante tanto do processo de refino, como também do transporte e comercialização desse petroderivado. No Brasil, os acidentes que ocorrem durante o transporte rodoviário de combustíveis são as principais fontes de contaminação do solo por esses poluentes (CETESB, 2008; IBAMA, 2008). No entanto, estima-se que nos grandes centros urbanos, a atividade varejista de combustível praticado pelos postos de revenda seja a principal fonte de contaminação, em função do crescente número de casos de vazamentos decorrentes da corrosão e instalação inadequada de tanques subterrâneos de armazenamento, e também dos constantes e sucessivos extravasamentos junto às bombas e locais de enchimento (FAVERO;

MUNIZ; SANTOS, 2007; GOUVEIA, 2004). De acordo com a Divisão de Tecnologias de Riscos da CETESB (2009), nos últimos 25 anos, o diesel foi responsável por 17, 4% dos casos de vazamentos ocorridos em postos de serviços do Estado de São Paulo, sendo o segundo produto mais envolvido nos atendimentos emergenciais dessa natureza.

A especificidade da contaminação do solo por óleo diesel reside no fato desse combustível incluir na sua composição total de hidrocarbonetos, compostos de elevada toxicidade como os monoaromáticos, mais conhecidos pela sigla BTEX (benzeno, tolueno, etileno e xilenos), e os policíclicos aromáticos (HPAs). Muitos desses, além de serem tóxicos a plantas e animais, podem também reagir com moléculas biológicas, tornando-se potenciais agentes carcinogênicos e eficientes mutagênicos. Ressalta-se que, embora a presença de BTEX seja mais relevante na gasolina, estudos recentes a cerca do derramamento de óleo diesel no país, mostram a presença de monoaromáticos neste combustível (KAIPPER; 2003; MAZZUCO, 2004; PALUDO, 2007).

Os hidrocarbonetos aromáticos são caracterizados pela presença de um ou mais anéis benzênicos, arranjados de forma linear, angular ou em grupos, conforme mostrado na Figura 1. Em função da possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições que estes podem assumir entre si existem mais de 100 diferentes tipos de policíclicos aromáticos. Contudo, apenas 16 desses compostos são considerados poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S.EPA) (FRONZA, 2006).

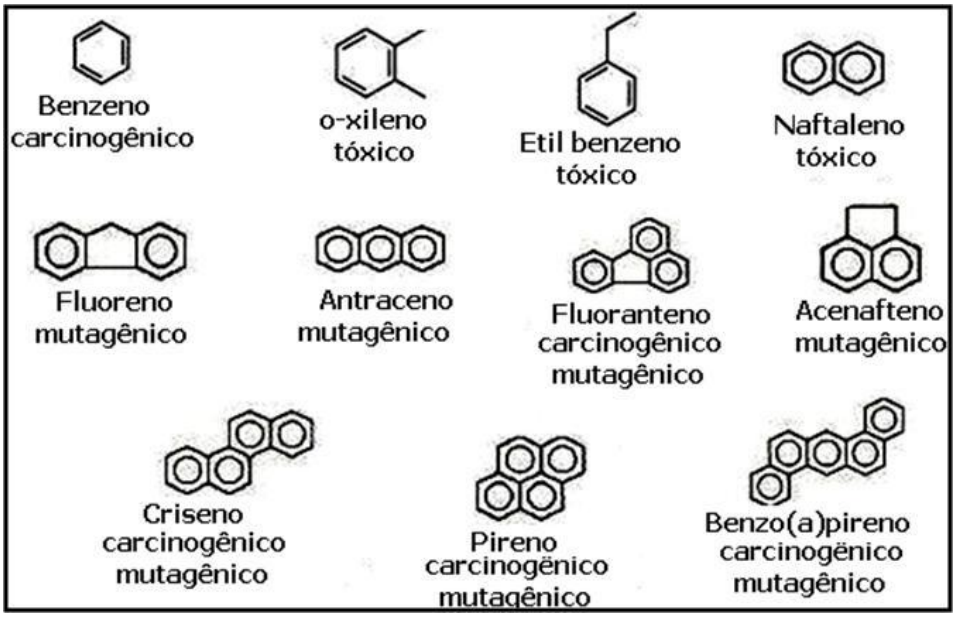


Figura 1 - Estrutura química e toxicologia de alguns hidrocarbonetos mono e policíclicos aromáticos. Adaptado de Aguiar (2006) e Kaipper (2003).

Todos os BTEX são depressores do sistema nervoso central, sendo o benzeno o mais tóxico deles e capaz de causar leucemia mesmo se absorvido em baixas concentrações durante períodos não muito prolongados. No ambiente, esses compostos podem ser absorvidos pelos organismos por inalação, ingestão ou absorção dérmica, ligando-se as moléculas protéicas e/ou tecido gorduroso dos mesmos, e a partir daí, levar ao aparecimento de tumores, alterações genéticas e leucemias (MAZZUCO, 2004; TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004). Quanto aos HPAs, maior preocupação deve-se a possibilidade desses compostos reagirem diretamente ou após transformações metabólicas (ativações) com o DNA, tornando-se mutagênicos e carcinogênicos ao homem e animais. Esses compostos por serem lipossolúveis, são prontamente absorvidos pelos organismos, via inalação, exposição oral e dermal, com posterior acúmulo no tecido adiposo (JACCQUES, 2005; JACCQUES et al., 2007).

1.1.2 Comportamento do diesel após vazamento ou derramamento no solo

De modo geral, os hidrocarbonetos que constituem o óleo diesel são compostos de baixa densidade e a maioria dos seus componentes consiste de uma fase não solúvel em água, denominada fase líquida não aquosa (*NAPL*). Quando esses compostos são menos densos que a água são denominados *LNAPL*; quando são mais densos são designados *DNAPL*. Dentre os *LNAPL* presentes no diesel incluem-se os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno). Já entre os *DNAPL* destacam-se os HPAs (AZAMBUJA; CANCELIER; NANNI, 2000; SCHMIDT, 2004).

Os *LNAPL* e *DNAPL* comportam-se de maneira diferenciada no solo, uma vez que a migração e distribuição dos mesmos são controladas por uma combinação de fatores que incluem tanto as propriedades físico-químicas dos compostos quanto as propriedades do solo. Contudo, as propriedades de cada composto influenciam de forma significativa na direção e extensão da contaminação, assim como na persistência dos mesmos no ambiente. Os *LNAPL* do grupo BTEX, por exemplo, embora apresentem baixa solubilidade em água, são considerados os mais solúveis dentre os compostos orgânicos nesse solvente, sendo os primeiros a serem dissolvidos e atingirem o lençol freático, no caso de um vazamento (SCHMIDT, 2004; TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004). Algumas propriedades físico-químicas de importância na mobilidade e persistência dos hidrocarbonetos de petróleo no solo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas de alguns hidrocarbonetos de petróleo.

Composto	Peso molecular (g mol^{-1})	S_w (mg L^{-1})	Pressão de vapor (mm Hg)	Log K_{ow}	Log K_{oc}	Tempo de meia vida no solo
Alifáticos						
$C_8 – C_{10}$	130	0,43	6,3 x10^{-3}	-	4,5	-
$C_{10} – C_{12}$	200	0,034	6,3 x10^{-4}	-	5,4	-
$C_{12} – C_{16}$	160	0,00076	4,8 x10^{-5}	-	6,7	-
$C_{16} – C_{21}$	270	1,3 x10^{-6}	1,1 x10^{-6}	-	8,8	-
Aromáticos						
Benzeno	78,10	1780	1,2 x10^{-1}	2,13	1,69	-
Tolueno	92,10	515	3,7 x10^{-2}	2,69	2,53	-
Etilbenzeno	106,20	152	1,2 x10^{-2}	3,13	3,10	-
p-Xileno	106,20	198	8,9 x10^{-3}	3,15	-	-
Naftaleno	128,17	32	3,0 x 10^{-4}	3,35	3,11	<125d
Acenafteno	154,21	3,4	4,4 x 10^{-3}	3,92	3,66	-
Fluoreno	166,22	1,9	3,2 x10^{-2}	4,18	3,86	32d
Antraceno	178,23	0,045	1,7 x 10^{-5}	4,54	4,15	50d – 1, a
Fluoranteno	202,25	0,013	5,0 x 10^{-6}	5,22	4,58	-
Pireno	202,25	0,013	2,5 x 10^{-6}	5,18	4,58	210d - 5,2a
Criseno	228,29	0,00006	6,3 x 10^{-7}	5,91	5,3	-
Benzo(a)antraceno	228,29	0,011	2,2 x 10^{-8}	5,91	5,3	1100
Benzo(a)pireno	252,30	0,0038	5,6 x 10^{-9}	5,91	6,74	269d - 8,2a

Fonte: Fronza (2006); Netto et al (2000); Silva (2008). Notas: S_w = solubilidade em água; Log k_{ow} = coeficiente de partição octanol-água; K_{oc} = coeficiente de sorção; d = dias; a = anos.

Observa-se na Tabela 1, que os BTEX, comparados aos HPAs e aos hidrocarbonetos alifáticos, por apresentarem os maiores valores de solubilidade e os menores coeficientes de sorção (K_{oc}), são os compostos mais hidrofílicos, ou seja, com maior afinidade pela água. Logo, apresentam menor tendência de sorção ao solo e transporte preferencial via água no sistema solo-água (MAZZUCO, 2004; SILVA et al., 2002). Os HPAs, ao contrário, apresentam baixos valores de solubilidade e maiores coeficientes de sorção, sendo mais hidrofóbicos e, por isso, menos móveis no solo. Resumidamente, o K_{oc} é uma medida do potencial de sorção, enquanto que o K_{ow} é uma mediada do potencial de solubilização. Ambos estão relacionados a mobilidade de um dado composto no ambiente em relação ao sistema solo-água (KAIPPER, 2003).

Após o vazamento do combustível no solo, forças gravitacionais e capilares atuam direcionando o fluxo verticalmente para as porções mais profundas do mesmo. Inicialmente, a massa líquida de combustível migra como uma frente contínua ou fase livre móvel através da coluna do solo em direção ao aqüífero subterrâneo. Contudo, uma vez que os compostos apresentam diferentes propriedades de sorção, pressão de vapor, solubilidade, densidade, entre outras, ao migrarem pela zona insaturada do solo, os mesmos podem se separar em fases distintas, tais como: fase líquida residual, fase de vapor e fase dissolvida, mostradas na

Figura 2 (MARIANO, 2006; SCHMIDT, 2004). A transição desses compostos de uma fase para outra pode, portanto, comprometer não somente a qualidade do solo, mas também do ar e das águas subterrâneas e superficiais.

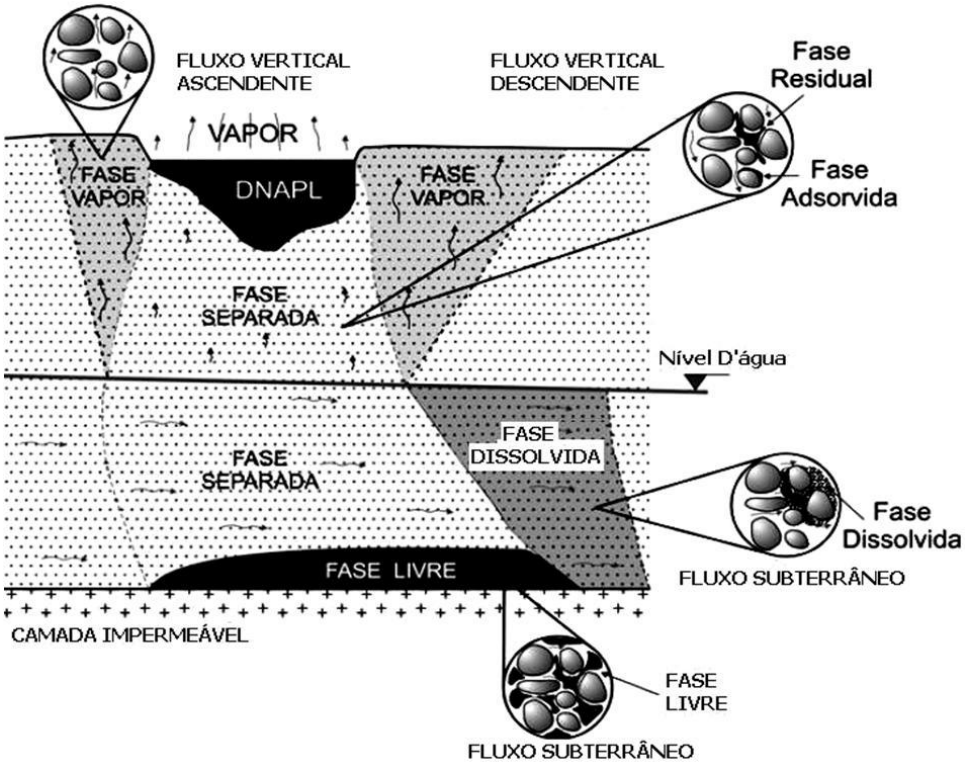


Figura 2 - Representação esquemática do comportamento dos hidrocarbonetos no solo. Fonte: Adaptado de Borges et al (2006).

A fase residual representa uma pequena fração dos componentes da massa líquida que ficou relativamente imóvel, sorvida ou retida entre os poros do solo devido a forças geradas por tensões interfaciais. Essa fase, por ser de difícil remoção e localização, pode permanecer no solo por anos, mantendo-se como uma fonte contínua de contaminação (ATSDR; 1999; REID; JONES; SEMPLE, 2000). A fase líquida livre que não ficou retida no solo pode atingir o nível d'água subterrâneo. Neste caso, os compostos menos densos, como os *LNAPLs*, passam a flutuar sobre o mesmo, formando uma pluma de contaminação que se espalha horizontalmente e, geralmente, em direção ao fluxo das águas subterrâneas. Os compostos mais solúveis, por sua vez, tendem a se dissolver dando origem à fase dissolvida. A fase dissolvida também compreende os compostos que se encontram dissolvidos na solução do solo (MARIANO, 2006; U.S.EPA, 1996). Os compostos mais densos, (*DNAPLs*), diferentemente dos *LNAPLs*, tendem a continuar sua migração verticalmente até serem retidos

em zonas de baixa permeabilidade, onde permanecem sob a forma de piscinas (*pools*). (MOREIRA; DOURADO, 2005; SCHMIDT, 2004).

Os hidrocarbonetos mais leves, de menor peso molecular e maior pressão de vapor, presentes tanto na fase residual como na fase livre, volatilizam-se e dissolvem-se, parcialmente, para se tornarem componentes da fase de vapor do solo e das águas subterrâneas, respectivamente. Quando estão na fase de vapor, esses compostos são mais móveis, podendo migrar relativamente a grandes distâncias, através de trajetos preferenciais de fluxos tais como fissuras e camada de areia. A acumulação de vapores em estruturas confinadas como, por exemplo, redes de águas prediais, podem, eventualmente, causar incêndios e explosões (U.S.EPA, 1996).

A quantidade de combustível derramado no meio, no entanto, influencia o transporte dos contaminantes pela coluna do solo. Quando a quantidade liberada é relativamente pequena e inferior a capacidade de retenção do solo, todo o produto tende a se tornar resíduo de saturação, dificilmente atingindo as águas subterrâneas. Entretanto, se o volume de combustível liberado for superior a capacidade de retenção do solo entre a fonte de contaminação e o nível freático, ou se houver infiltração de águas da chuva, as águas subterrâneas podem ser atingidas (U.S.EPA, 1996). Segundo Mariano (2006) um fornecimento contínuo de hidrocarbonetos para a zona não saturada do solo, favorece a acumulação dos mesmos.

1.2 Biodiesel: combustível substituto do petrodiesel

1.2.1 Breve histórico do biodiesel como combustível

Embora os programas de incentivo à produção e comercialização do biodiesel no mundo sejam relativamente recentes, as primeiras experiências acerca do uso desse combustível para fins energéticos ocorreram na Europa, em 1937, a partir da concessão da primeira patente relatando a conversão de óleos vegetais, principalmente, o óleo de palma, em uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos para uso em motores de combustão interna (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009; KNOTHE, 2001).

Posteriormente a essa patente, depositada pelo pesquisador belga Charles G. Chavanne, foi registrada em 1938 a rodagem do primeiro ônibus movido a ésteres alquílicos derivados de óleos vegetais na linha comercial de passageiros entre as cidades de Louvain e

Bruxelas, na Bélgica (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009; KNOTHE, 2001). Diversos outros testes em larga escala também foram realizados, inclusive com caminhões usando mistura de ésteres obtidos da transesterificação de óleo de dendê com etanol (SUAREZ; MENEGHETTI, 2007). No entanto, a estabilização do preço do petróleo e a alta oferta dos seus derivados, na época, provocaram o desinteresse pelo biodiesel.

Foi somente depois da metade da década de 90, por motivos econômicos, geopolíticos e ambientais, que o biodiesel ressurgiu como fonte alternativa de energia, e avanços significativos quanto à sua produção e viabilização comercial começaram a ocorrer (SUAREZ; MENEGHETTI, 2007). As primeiras experiências nesse sentido surgiram na União Européia, especialmente na Áustria, promovidas pela Diretiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 8 de maio 2003, relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis no setor de transporte. Hoje, a União Européia é o principal mercado produtor e consumidor de biodiesel, estando metade da sua capacidade produtiva na Alemanha, que além de possuir a maior produção também apresenta o maior consumo de biodiesel no mundo, utilizando como principal matéria-prima a canola. Atualmente, o país possui uma frota significativa de veículos leves, coletivos e de carga, que utilizam biodiesel puro (B100) e também comercializado em mistura ao óleo diesel, como aditivo (MELLO; PAULILLO; VIAN, 2007; RAMOS et al., 2003). Depois da Alemanha, se destacam no mercado produtor, respectivamente, a França, a Itália e os Estados Unidos (MARQUES, 2006; MELLO; PAULILLO; VIAN, 2007).

O Brasil teve suas primeiras experiências sobre aproveitamento energético a partir de óleos e gorduras em motores a combustão interna na década de 20 através de pesquisas desenvolvidas pelo Instituto Nacional de Tecnologia (INT). Entre as décadas de 70 e 80, em resposta ao desabastecimento do petróleo, o governo federal criou o Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Carburantes (PRÓ-ÓLEO). No entanto, com a queda do preço do petróleo o plano foi abandonado em 1986, mas as pesquisas continuaram sendo realizadas. Foi somente no final dos anos 90 que o governo brasileiro voltou novamente suas atenções para o biodiesel, através da realização de vários estudos por comissões interministeriais em parceria com universidades e centros de pesquisa. Em 2000 foi instalada a primeira indústria de ésteres de ácidos graxos no Estado do Mato Grosso. A partir daí, foi criado, em 2002, o Programa de Substituição do Diesel de Petróleo (PROBIODIESEL), e em 2005 o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), o qual marcou a entrada desse biocombustível no país e seu uso inicial como aditivo do diesel de petróleo (POUSA; SANTOS; SUARES, 2007; SUAREZ; MENEGHETTI, 2007). Atualmente, de acordo com a

Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2010a) o Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2009, de 1,6 bilhões de litros e uma capacidade instalada, em janeiro de 2010, para cerca de 4,7 bilhões de litros.

1.2.2 Aspectos gerais do biodiesel

Biodiesel é o termo usado para designar o produto obtido de óleos vegetais e/ou gorduras animais, através de diferentes processos químicos, para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão (motores do ciclo diesel). Sua utilização como combustível substituto ou aditivo ao diesel convencional deve-se ao fato de suas propriedades físico-químicas serem muito similares aos deste e propiciarem uma dinâmica aceitável para o processo de combustão, não sendo necessários investimentos tecnológicos nos motores a diesel existentes (RAMOS et al., 2003; RINALDI et al., 2007). Na Tabela 2 são apresentadas as principais propriedades do óleo diesel e do biodiesel de diferentes origens vegetais.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do óleo diesel e biodiesel de diferentes origens.

	Origem biodiesel				
Propriedades	**Palma**	**Algodão**	**Piqui**	**Babaçu**	**Óleo diesel**
Poder calorífico (Kcal Kg^{-1})	9530	9520	9590	9440	10824
Ponto de névoa (^oC)	6	nd	8	-6	1
Índice de cetano	nd	57,5	60	65	45,80
Densidade a 20º C (g cm^{-3})	0,8597	0,8750	0,8650	0,8865	0,8497
Viscosidade a 37,8º (cSt)	6,4	6,0	5,2	3,9	3,04
Ponto de fluidez (^oC)	nd	-3	5	nd	nd
Teor de enxofre (%)	nd	0	0	nd	0,24

Fonte: Neto et al (2000). Notas:(*) = óleo diesel tipo C; nd = não determinado.

Segundo Parente (2006) a viscosidade e a densidade são as propriedades fluidodinâmicas mais importantes no que diz respeito ao funcionamento dos motores do ciclo diesel. Na Tabela 2, observa-se que as densidades dos quatro tipos biodiesel são muito semelhantes à do óleo diesel. A viscosidade, ao contrário, varia de espécie para espécie, sendo, geralmente, um pouco maior que a do óleo diesel convencional. No entanto, esse mesmo autor ressalta que, a faixa de viscosidade do biodiesel, independente da sua origem, enquadra-se na faixa de viscosidade da maioria dos óleos diesel oferecidos no mercado, estando dentro do limite recomendado pela ANP. Pode-se observar na Tabela 2, que o índice

de cetano do biodiesel também é maior, razão pela qual esse combustível queima muito melhor no motor diesel que o próprio óleo mineral.

Dentre os diferentes processos químicos de obtenção do biodiesel a transesterificação é o método tradicionalmente empregado, sendo também o método estimulado pelo governo brasileiro. Esse método consiste na reação dos triglicerídeos do óleo vegetal ou gordura animal com um álcool primário, como o metanol e etanol, na presença de um catalisador (ácido, básico ou enzimático). Através dessa reação ocorre a quebra dos triglicerídeos, ou seja, dos ésteres de ácidos graxos e glicerina, e a substituição do grupo éster do glicerol pelo grupo etanol ou metanol. O produto final consiste em glicerol e uma mistura de ésteres alquílicos (metílicos e/ou etílicos) de ácidos graxos denominada de biodiesel, conforme mostrado na Figura 3 (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

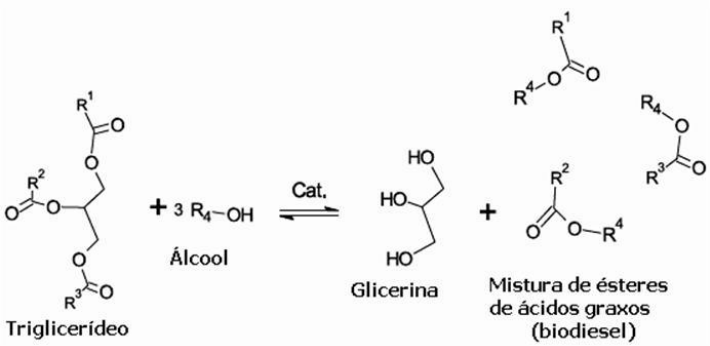


Figura 3 - Reação de transesterificação de um triglicerídeo. Fonte: Lobô, Ferreira e Cruz (2009).

Para ser usado como combustível, o biodiesel, no entanto, precisa passar por um processo de purificação e atender certos parâmetros de qualidade fixados por especificações técnicas, que incluem, entre outros, ponto de ebulição, viscosidade e o número de átomos de carbono na cadeia hidrocarbônica. No Brasil, a Resolução ANP 07/2008 estabelece as principais propriedades constantes de especificação do biodiesel a ser comercializado no país e a Resolução ANP 15/2006 as especificações da mistura óleo diesel/biodiesel (LOBÔ; FERREIRA; CRUZ, 2009; SOUZA et al., 2009)

Segundo Lôbo; Ferreira e Cruz (2009), a qualidade do biodiesel pode sofrer variações conforme as estruturas moleculares dos seus ésteres constituintes e a concentração dos mesmos na mistura. Dependendo do tipo de oleaginosa usada na sua produção, os ésteres resultantes podem variar no tamanho da cadeia carbônica, na quantidade e posição de insaturações ou ainda na presença de outras funções químicas. No entanto, em geral, o biodiesel é constituído por oito diferentes ácidos graxos, metil ou etil esterificados, incluindo oleato, palmiato, estearato, linoleato, ricinoleato, mirístico, laureato e linolenato

(FERREIRA et al., 2008; VIEIRA et al., 2006). No Brasil, as principais matérias-primas nacionais que vem sendo utilizadas na produção do biocombustível são: soja (75-84%), gordura bovina (10-20%), algodão (0,32-6%), palma (≅ 0,23%), amendoim (≅ 0,11%) e óleo de fritura usado (≅ 0,19%)(ANP, 2009b, 2010b).

No contexto ambiental, a menor emissão de gases poluentes é uma das principais vantagens do uso do biodiesel como combustível ou aditivo. Diversas pesquisas já mostraram que a combustão do biodiesel puro e/ou misturado ao diesel convencional gera menos gases poluentes que as emissões do petrodiesel puro (BARNWAL; SHARMA, 2005; CORONADO et al., 2009). Um estudo realizado pela U.S.EPA, por exemplo, mostrou que o biodiesel de soja pode reduzir, aproximadamente: 67% do total de hidrocarbonetos não queimados; 48% do monóxido de carbono; 47% do material particulado; 100% do sulfato; e 80% dos HPAs (DEMIRBAS, 2009). No entanto, a redução das emissões poluentes depende, particularmente, da origem e da quantidade de biodiesel presente na mistura.

Embora o biodiesel seja obtido de fontes renováveis e considerado um combustível de queima mais limpa, pouco se têm conhecimento sobre os reais impactos do mesmo e da mistura diesel-biodiesel no solo em casos de vazamento, assim como dos riscos toxicológicos associados à liberação destes no ambiente (CHIARANDA; SHAMBECK, CORSEUIL, 2009). Alguns estudos têm reportado que a adição de biodiesel ao óleo diesel pode induzir ou acelerar a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo do diesel (ZHANG et al., 1998; PASQUALINO; MONTANÉ; SALVADÓ, 2006). Outros estudos, no entanto, não têm observado tal efeito. Gomes (2008), por exemplo, em seu trabalho acerca da biodegradabilidade do biodiesel em ambientes aquáticos observou que a presença do biodiesel no diesel influenciou negativamente a degradação dos hidrocarbonetos do grupo BTEX. Para um período de incubação de 34 dias, na ausência do biodiesel, houve uma remoção de 90%, 100%, 80% e 70% dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, respectivamente. Entretanto, na presença do biodiesel as porcentagens de remoção foram de: 35% para o benzeno, 100% para o tolueno 60% para o etilbenzeno e xilenos, durante o mesmo período de incubação.

Chiaranda, Shambeck e Corseuil (2009) ressaltam também, que o biodiesel quando derramado no solo, por apresentar baixa solubilidade em água, tende a não se apresentar na fase aquosa, permanecendo na fonte, e portanto, resultando em uma fonte contínua de contaminação. Contudo, tal fato ainda está sendo investigado.

Contudo, diferentes estudos têm mostrado que os ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos do biodiesel, quando comparados aos n-alcanos e compostos aromáticos do

diesel, são, em geral, menos tóxicos e mais facilmente degradados no ambiente por micro-organismos (GOMES; LIMAS; CORSEUIL, 2007; KHAN et al., 2007; MAKAREVICIENE; JANULIS, 2003; ZHANG et al., 1998). Cabe ressaltar, porém, que a maioria deles tem sido conduzida em sistemas aquosos, que não retratam a heterogeneidade do solo.

1.3 Biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos

1.3.1 Aspectos gerais e fatores relevantes ao uso da tecnologia

Nos últimos anos, visualizando a problemática de contaminação do solo por combustíveis, e outros contaminantes, com possível consequência às águas subterrâneas, órgãos ambientais de vários países desenvolvidos como Holanda, Alemanha e Estados Unidos, criaram programas para o controle e restauração da qualidade dessas matrizes ambientais. Dentro desses programas, o emprego de valores orientadores e de tecnologias de remediação têm sido as principais ferramentas utilizadas no gerenciamento dessa problemática (CETESB, 2001a).

No Brasil, depois de três anos de tramitação no Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), foi aprovada em dezembro de 2009, a Resolução n° 420, que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo, e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental do mesmo em nível federal (MMA, 2009; AMBIENTEBRASIL, 2009). Antes dessa resolução, somente o Estado de São Paulo tinha um programa de gerenciamento de áreas contaminadas contemplando valores orientadores para solos e águas subterrâneas, por sua vez, iniciado em 1993, através de uma cooperação entre a CETESB e a entidade de cooperação técnica do governo alemão Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit. A partir dessa cooperação alguns instrumentos de gerenciamento foram desenvolvidos, dentre eles: (i) o manual de gerenciamento de áreas contaminadas, que fornece informações e metodologias tanto para investigação preliminar dessas áreas quanto para seleção das técnicas de remediação; e (ii) o relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas do Estado de São Paulo, recentemente substituído pela Decisão Diretória n° 195/2005, e que vinha sendo adotado como referência por alguns estados brasileiros (GÜNTHER, 2006).

Dentre as diversas tecnologias desenvolvidas e testadas por órgãos ambientais e centros de pesquisa para recuperação de solos e águas subterrâneas contaminados, a biorremediação tem sido considerada uma das mais promissoras na remediação de ambientes impactados, especialmente, petroderivados, não só pela sua efetividade nos custos, mas também por ser considerada ecologicamente mais adequada, uma vez que se utiliza da capacidade de organismos vivos, sobretudo micro-organismos (bactérias e fungos), para remover ou reduzir as concentrações do contaminante no ambiente impactado (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005; FERRERA-CERRATO et al., 2006). Seu principal objetivo consiste em induzir ou acelerar as reações bioquímicas que ocorrem naturalmente, de modo a se obter níveis de degradação até o limite de detecção do contaminante ou abaixo dos valores aceitáveis ou estabelecidos pelos órgãos ambientais, que não ofereçam risco à saúde humana e ao ecossistema (CUNHA et al., 2008).

Processos de biorremediação há décadas vêm sendo utilizados no tratamento biológico de efluentes líquidos orgânicos e resíduos sólidos domésticos e industriais (CETESB, 1994). No entanto, a aplicação dessa tecnologia como estratégia de tratamento de solos contaminados tem evoluído de forma acentuada pelo fato da mesma ser, em geral, mais segura, menos agressiva e menos onerosa quando comparada com alguns processos de tratamento físico-químicos (ACCIOLY; SIQUIERA, 2001; GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005; SEPÚLVEDA; TREJO, 2002; VIDALI, 2001). A Tabela 3 apresenta o custo estimado de algumas tecnologias empregadas na remediação de solos contaminados.

Tabela 3 – Custo estimado de algumas tecnologias de remediação de solo contaminado.

Custo	**Incineração**	**Remoção para aterro**	**Lavagem Físico-química do solo**	**Dessorção térmica**	**Biorremediação**
U$/tonelada	50-1200	Acima de 100	25-150	25-225	*Landfarming* 10-90 Biopilhas 15-35 *Bioventing* 15-75

Fonte: Semple et al (2001).

Segundo Aguiar (2006) acredita-se que a diferença dos custos de implantação e operação existente entre as tecnologias de tratamento físico-químicas mais convencionais e os diferentes processos de biorremediação seja justamente a força motriz para a ampliação da pesquisa e do uso dessa tecnologia. Além do custo, os processos de biorremediação também podem se apresentar mais vantajosos quando outros fatores são levados em consideração, tais

como: (i) produção de resíduos que necessitem de disposição e/ou tratamento, como as cinzas resultantes do processo de incineração e o resíduo proveniente da tecnologia de extração por solvente; (ii) possibilidade de ocorrência de impactos adicionais no ambiente através da emissão de vapores tóxicos e material particulado contaminado, a exemplo do que pode ocorrer no emprego de técnicas como a escavação de solo, seguida de tratamento ou disposição em aterros; (iii) existência de aterro previamente licenciado pelo órgão ambiental para a disposição direta do solo contaminado ou do resíduo resultante do tratamento deste; (iv) impactos sobre a estrutura e composição do solo, como pode ocorrer após um tratamento por oxidação química e/ou dessorção térmica (CETESB, 2001b; PEDROZO et al., 2002).

Atualmente, o mercado mundial de aplicação dos tratamentos denominados biorremediação segue uma rota direcionada pelas agências ambientais dos próprios países. Nos últimos anos, os Estados Unidos têm apresentado um papel de destaque quanto ao emprego da biorremediação. Segundo dados do 12º relatório denominado "*Treatment Technologies for Site Cleanp: Anual Status Report*", publicado pela U.S.EPA em 2007, a biorremediação esteve entre as tecnologias mais selecionadas no período de 2000 e 2005 para remediação de solos e águas subterrâneas, contabilizando mais da metade dos projetos de tratamento implantados em todo o país (U.S.EPA, 2007).

No Brasil, o emprego da biorremediação ainda é considerado incipiente, embora, de acordo com Accyoli e Siqueira (2000) e Marques (2007), apresente considerável potencial de uso em função da biodiversidade e condições climáticas favoráveis existentes no país. Estudos sobre as diversas aplicações dessa tecnologia no país vêm sendo desenvolvidas por grupos de pesquisas de universidades, isoladamente ou em conjunto com a indústria de petróleo brasileira (CORSEUIL; MORENO, 2001; COSTA et al., 2007; FILHO, 2003; OLIVEIRA et al., 2007). Desde 1994, por exemplo, a Petrobrás, em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina, vem desenvolvendo estudos pioneiros, relacionados à problemática de contaminação de solos e águas subterrâneas por derivados de petróleo, envolvendo processos de biorremediação (CORSEUIL, 2010; REMAS, 2010). Na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), desde 2004, o grupo de pesquisa BioProcess apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) desenvolve projetos de pesquisa na área de biorremediação de solos e tratamentos de resíduos (MARQUES, 2007; 2010).

Entretanto, ainda são poucas as pesquisas e aplicações reais dessa tecnologia. Segundo a CETESB (2010) a remediação de áreas contaminadas no Estado de São Paulo empregando

processos de biorremediação apresenta atualmente os seguintes registros: *biosparging*, 11 casos; *bioventing*, 5 casos; fitorremediação, 2 casos; biorremediação sem identificação do processo, 21 casos.

Cabe ressaltar, que a biorremediação, como toda tecnologia de remediação, apresenta algumas limitações quanto a sua aplicabilidade. A susceptibilidade do contaminante à biodegradação, assim como a toxicidade deste e a ausência de condições ambientais adequadas ao crescimento e sobrevivência dos organismos, são alguns dos fatores limitantes ao uso da mesma. O tempo necessário para se observar os efeitos positivos do processo pode ser mais longo quando comparado ao de outras tecnologias, consistindo-se também em um fator limitante (ALVAREZ, 2004; MARQUES, 2007). Contudo, segundo CETESB (2001b) e Marques (2007) a maior limitação no momento quanto à aplicação da biorremediação, fato que tem levado a resistência de algumas agências ambientais ao amplo uso da mesma, é a necessidade de maior entendimento dos processos e seus controles. No Brasil, tal entendimento precisa ser urgentemente superado, o que justifica novos estudos na área envolvendo as condições de clima, solos e biodiversidade existentes no país.

1.3.2 Biodegradação e biorremediação microbiana

Quando os hidrocarbonetos são liberados no solo, os mesmos tornam-se suscetíveis a uma variedade de processos físicos, químicos e biológicos, que, naturalmente, agem de forma a reduzir a toxidez, mobilidade, volume e concentração desses compostos, a níveis que não ofereçam risco à saúde humana e ao ecossistema. Esses processos incluem volatilização, dispersão, sorção, biodegradação, degradação química e fotoquímica, sendo a ação de todos eles juntos denominada atenuação natural ou passiva. A contribuição relativa de cada processo, no entanto, depende do composto e das condições ambientais do meio (ALVAREZ, 2004; MILLIOLI et al., 2008; PEDROZO et al., 2002; SEABRA; 2005). Os compostos mais leves, por exemplo, por apresentarem elevada pressão de vapor, tendem a se volatilizar durante as primeiras horas após o vazamento (ou derramento). No entanto, o próprio processo de infiltração do combustível no solo pode prevenir as perdas dessa natureza. A radiação solar, por sua vez, pode provocar a oxidação fotoquímica de alguns compostos através da ação da radiação ultravioleta (UV), que por ser mais energética que a luz visível pode quebrar a ligação química das moléculas que a absorvem (FAY; SILVA; MELO, 2008). Alguns HPAs presentes no diesel podem absorver fortemente na região do UV maior que 300 nm, presente

na radiação solar, sendo foto-oxidados (LEITE, 2007). Contudo, o processo de fotólise pode ser lento e até mesmo incompleto, dependendo da profundidade do derramamento, pela ausência de luz (PEDROZO et al., 2002).

Dentre os processos naturais de atenuação, um dos mais significativos na remoção de contaminantes do ambiente é a biodegradação, que consiste na transformação total ou parcial do contaminante pela ação de micro-organismos. Quando o processo se dá de forma completa, ocorre a mineralização do contaminante, na qual o mesmo é totalmente degradado a produtos inorgânicos inertes tais como, dióxido de carbono (CO_2), água (H_2O) e sais minerais. (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SEABRA, 2008). Entretanto, quando o processo ocorre apenas de forma parcial, há apenas a formação de intermediários estruturalmente diferentes, que em alguns casos, podem ser mais tóxicos que o composto original (CHAGAS-SPINELLI, 2007; MELO; AZEVEDO, 2008).

A biodegradação de contaminantes orgânicos, como os hidrocarbonetos, consiste em um processo bastante complexo, e seu potencial depende, sobretudo, dos micro-organismos envolvidos e da capacidade dos mesmos de reconhecer e metabolizar as estruturas químicas dos compostos. No entanto, os micro-organismos, sobretudo as bactérias, apresentam uma grande diversidade genética e metabólica, sendo capazes de ajustar seu metabolismo à presença dos contaminantes e utilizá-los como fonte de energia (substrato). O ajuste metabólico dos micro-organismos a novos substratos pode ocorrer por meio de três mecanismos: (i) indução de enzimas de baixa especificidade de substrato; (ii) seleção de capacidades metabólicas através de mudanças genéticas; e (iii) aumento no número de organismos capazes de metabolizar o composto de interesse. As bactérias, por exemplo, através de intercâmbio de material genético como transferência de plasmídeos, favorecem a disseminação de genes e, consequentemente, a disseminação de enzimas relacionadas à degradação dos compostos de interesse (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005; SILVA; MELO; FAY, 2006).

De forma geral, a microbiota heterotrófica da maioria dos solos inclui populações degradadoras de contaminantes. Assim, a adição de um dado contaminante ao solo, acidental ou propositalmente, enriquece, seletivamente, a comunidade capaz de utilizar esse substrato. A taxa através da qual os micro-organismos podem se adaptar é determinante da redução da concentração do contaminante no meio (PEIXOTO; ROSADO; TAKETANI, 2008; TAPAJÓS, 2008).

A tecnologia de biorremediação microbiana, portanto, nada mais é, que um exemplo da aplicação do processo natural de biodegradação, por valer-se justamente da capacidade dos micro-organismos em degradar os compostos contaminantes. Entretanto, os processos de biodegradação encontram-se combinados com práticas de engenharia, de modo a criar condições para maximizar as transformações bioquímicas dos contaminantes orgânicos de interesse.

1.3.2.1 Micro-organismos do solo e o seu papel no processo de biodegradação

De acordo com Oliveira, Sette e Fantinatti-Garboggini (2006) e Pereira (2001) os micro-organismos constituem-se nas entidades biológicas mais numerosas e antigas, com capacidade de colonizar com sucesso diversos nichos ecológicos. No solo, os mesmos desempenham funções essenciais para o funcionamento e a manutenção desse ecossistema, participando da sua formação e estruturação, da ciclagem de nutrientes e fluxo de energia, da decomposição da matéria orgânica e da formação de gases componentes da atmosfera terrestre (CUNHA et al., 1998, MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A fração biológica do solo, também denominada microbiota, é ocupada por representantes de cinco grandes grupos: bactérias, actinomicetos, fungos, algas e protozoários. No entanto, bactérias e fungos respondem por cerca de 90% da atividade microbiana do solo, sendo as bactérias predominantes, com populações variando entre 10^6 a 10^8 células por grama de solo (MAIER; PEPPER; GERBA, 2000; PEPPER; GERBA; BRUSSEAU, 2006). A Tabela 4 apresenta o perfil de distribuição dos micro-organismos em vários horizontes do solo.

Tabela 4 - Distribuição dos micro-organismos em diferentes profundidades do solo.

Profundidade (cm)	**Organismos g^{-1} de solo x 10^3**				
	Bactérias aeróbias	**Bactérias anaeróbias**	**Actinomicetos**	**Fungos**	**Algas**
3-8	7800	1950	2080	119	25
20-25	1800	379	245	50	5
35-40	472	98	49	14	0,5
65-75	10	01	05	06	0,1
135-145	01	04	-	03	-

Fonte: Moreira e Siqueira (2006).

De acordo com a Tabela 4, observa-se a existência de uma menor diversidade populacional ao longo do perfil do solo, que segundo Boopathy (2000) está intimamente associada à diminuição dos teores de matéria orgânica natural do mesmo. Além disso, verifica-se também a prevalência das bactérias sobre os demais micro-organismos com o aumento da profundidade, fato atribuído, principalmente, à habilidade destas de utilizar em seus processos metabólicos, além do oxigênio, outros aceptores de elétrons, que serão abordados mais adiante (BOOPATHY, 2000).

No solo, as bactérias estão envolvidas em quase todas as transformações bioquímicas, incluindo o metabolismo de compostos químicos orgânicos e inorgânicos. Devido a sua diversidade e prevalência sobre os demais micro-organismos, assim como a sua alta taxa de crescimento e adaptabilidade, esses seres apresentam uma habilidade quase ilimitada para degradar compostos naturais e vários contaminantes recalcitrantes, sendo, por isso, os mais envolvidos nos processos de biorremediação microbiana (PEPPER; GERBA; BRUSSEAU, 2006). Entretanto, algumas espécies de fungos filamentosos e leveduras também são, reconhecidamente, micro-organismos degradadores de contaminantes, além de componentes importantes em processos de decomposição de material orgânico sob condições de estresse ambiental, como pH ácido, baixos teores de umidade e limitação de nutrientes. E é justamente essa capacidade de viver sob condições ambientais adversas, que torna os fungos, em muitos casos, mais eficientes que as bactérias nos processos de biorremediação (LEMOS et al., 2008; PEPPER; GERBA; BRUSSEAU, 2006).

A degradação microbiana de contaminantes orgânicos no solo, e em outros compartimentos ambientais, resulta de inúmeras reações químicas sequênciais (oxidativas, redutivas e hidrolíticas) mediadas por enzimas que catalizam as transformações do contaminante, permitindo o funcionamento de rotas metabólicas específicas para liberação de energia e a integração das funções biológicas de crescimento e a multiplicação celular (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Diferentes estratégias metabólicas estão envolvidas nessas reações como mostrado na Figura 4.

No catabolismo o contaminante percorre todos os passos de uma determinada rota metabólica, sendo transformado em moléculas menores com produção de energia. Consequentemente, há um aumento da biomassa microbiana (formação de novas células) à custa do substrato que diminui consideravelmente por ser mineralizado. Desta forma, o contaminante constitui-se numa fonte de energia para o crescimento e reprodução do micro-organismo. No cometabolismo, o contaminante é degradado parcialmente e não serve como fonte de energia para o micro-organismo, que por sua vez não responde em crescimento, ao

contrário do catabolismo. Esse tipo de metabolismo não é programado e ocorre por acaso em função de enzimas com pouca especificidade. O produto gerado, no entanto, pode servir de substrato para transformações enzimáticas de outras espécies, possibilitando a degradação completa do contaminante (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

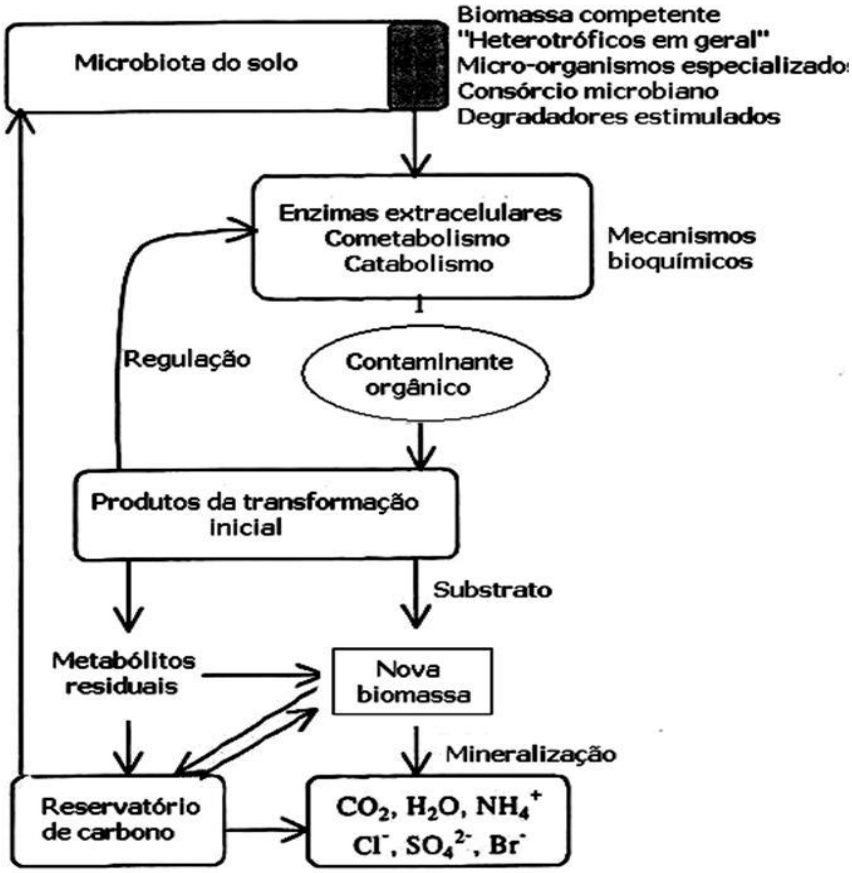


Figura 4 - Transformação de contaminantes orgânicos no solo pelos micro-organismos. Fonte: Accyoli e Siqueira (2001).

Há casos em que os contaminantes podem ser transformados em metabólicos diversos para serem utilizados pelo próprio micro-organismo ou por outros, através do ataque de enzimas extracelulares (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005; PEPPER; GERBA; BRUSSEAU, 2006). Algumas espécies de fungos, por exemplo, se autoprotegem dos contaminantes, degradando-os fora da parede celular, por meio da secreção de enzimas que catalisam a produção de radicais hidroxilas e outros agentes químicos reativos (PEPPER; GERBA; BRUSSEAU, 2006).

Segundo Melo e Azevedo (2008) para fins de biorremediação é interessante que o contaminante seja usado como fonte de carbono e energia pelo micro-organismo, que por sua vez, induz à síntese de enzimas apropriadas ao processo de biodegradação. Estas são, via de

regra, altamente específicas, e outras não, isto é, uma dada enzima pode exibir atividade catalítica contra um análogo estrutural do contaminante alvo que, presumivelmente, fornece pressão seletiva para sua evolução.

Embora a biodegradação de um dado composto só ocorra se enzimas microbianas apropriadas estiverem presentes, outros fatores são essenciais para que o processo de biodegradação se processe de maneira eficaz, uma vez que os mesmos podem influenciar não só o crescimento e a atividade microbiana no meio impactado, mas também as propriedades físico-químicas dos contaminantes, tornando-os mais tóxicos e/ou indisponíveis ao ataque microbiano (PROVIDENTI; LEE; TREVORS, 1993; ROMANTSCHUK et al., 2000).

1.3.3 Fatores limitantes à biodegradação e à biorremediação

Os principais fatores reportados na literatura que influenciam a biodegradação de contaminantes orgânicos no solo encontram-se esquematizados na Figura 5 (BOOPATHY, 2000; PROVIDENTI; LEE; TREVORS, 1993; ROMANTSCHUK et al., 2000; SINGH; WARD, 2004). Uma descrição geral sobre alguns desses fatores, com maior ênfase aqueles que foram foco de atenção na realização do presente estudo, encontra-se a seguir.

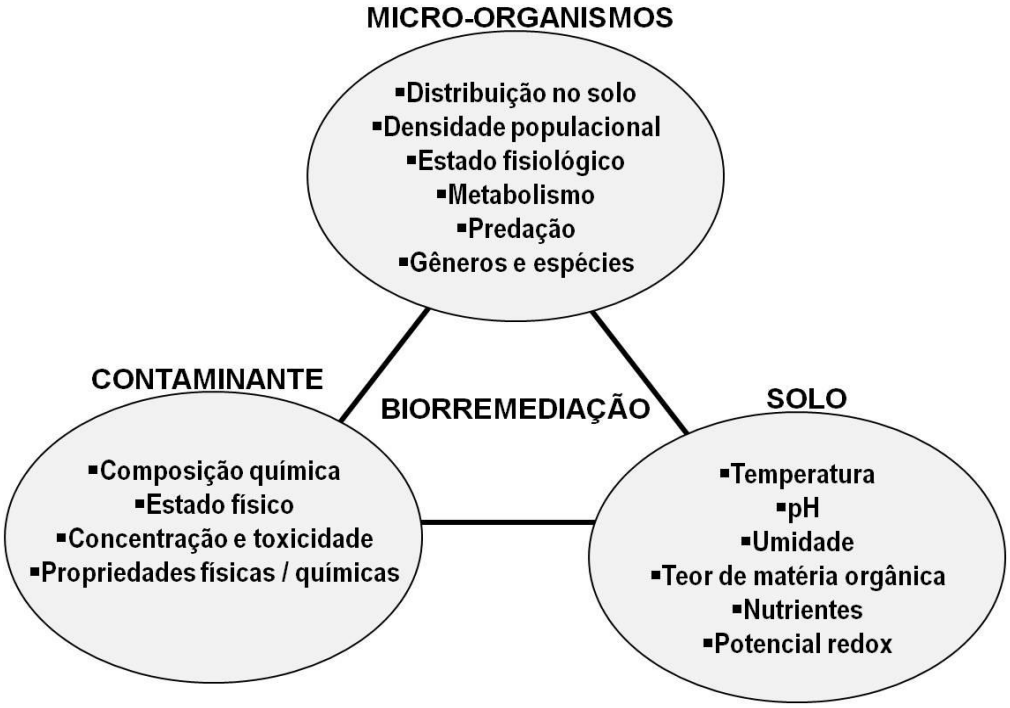


Figura 5 - Fatores que influenciam a biodegradação de hidrocarbonetos no solo.

No ambiente contaminado, as taxas de crescimento microbiano são, parcialmente, uma função da concentração do contaminante e da composição do mesmo. Altas concentrações de hidrocarbonetos, por exemplo, podem causar inibição da ação microbiana devido à ocorrência de efeitos tóxicos ou escassez de elementos associados ao processo de degradação, como nutrientes e oxigênio. Já em concentrações muito baixas, a taxa de crescimento tende a ser mínima, mantendo-se o limite mínimo necessário ao metabolismo (PROVIDENT et al., 1993; MELO; AZEVEDO, 2008).

A inibição por conta dos efeitos tóxicos é vastamente observada e reportada na literatura e pode ocorrer também devido à produção de metabólitos mais tóxicos durante a biodegradação do próprio contaminante (BOOPATHY, 2000). A degradação de hidrocarbonetos aromáticos como o tolueno, por exemplo, pode resultar em intermediários como o ácido benzóico e compostos fenólicos, que em concentrações elevadas apresentam efeito biocida (PEDROZO et al., 2002). Quando no ambiente há uma grande quantidade de material prontamente biodegradável, não tóxico, repressão catabólica pode ocorrer e por consequência a degradação também. Isso pode ser um fator importante no caso do diesel aditivado com biodiesel e da gasolina aditivada com etanol (NUNES; CORSEUIL, 2007; CHIARANDA; SHAMBECK, CORSEUIL, 2009; GOMES, 2008).

Há hidrocarbonetos como os HPAs, cujas taxas de biodegradação são mais limitadas devido à sua baixa solubilidade em água do que sua concentração. Isso porque a maioria dos micro-organismos está localizada na fina camada de água que circunda as partículas do solo e, nesse contexto, a baixa solubilidade do composto dificulta o acesso dos micro-organismos ao mesmo (MAIER; PEPPER; GERBA, 2000; SILVA; MELO; FAY, 2006). Os micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, por exemplo, podem ser encontrados na superfície de uma gota de óleo, no entanto, o crescimento não parece ocorrer em gotas de óleo que não estejam envoltas por água (ATLAS, 1981; TAPAJÓS, 2008).

O processo de sorção de hidrocarbonetos no solo representa outro mecanismo que dificulta o acesso microbiano ao contaminante e, consequentemente, o processo de biodegradação, resultando na retenção e acumulação do mesmo no ambiente. Nesse processo, os compostos tornam-se associados às partículas solo. Segundo Silva, Vidal e Queiroz (1999) a retenção do contaminante pelo solo está relacionada a dois subfenômenos da sorção, absorção e adsorção, que, por sua vez, são influenciados, principalmente, pela matéria orgânica natural e mineralogia do solo. Na absorção, a matéria orgânica do solo age como sorvedor ou meio de partição do contaminante orgânico, limitando sua disponibilidade e, consequentemente, o ataque microbiano (D'AGOSTINHO, 2004; JACCQUES, 2005).

Quanto menos polar e, consequentemente, menos solúvel em água for o composto, maior será a sua tendência de sorção à matéria orgânica do solo. Na adsorção, ocorre a adesão superficial do contaminante à matriz sólida devido às forças de atração existentes no meio. Estas forças são decorrentes de cargas desequilibradas nas superfícies, resultantes de imperfeições ou substituições iônicas na estrutura cristalina dos minerais, ou da quebra de ligações nas estruturas moleculares, especialmente extremidades (THOMÉ; KNOP, 2006). O processo de sorção, de um modo geral, pode ser reversível ou irreversível, dependendo da estrutura química do contaminante e das propriedades físicas e químicas do solo (TRINDADE, 2002). De acordo com Seabra (2008) processos intensivos de mistura de solo, adição de surfactantes e estimulação eletrocinética são algumas das soluções para elevar a biodisponibilidade dos compostos orgânicos.

Alguns micro-organismos, no entanto, são capazes de sintetizar subprodutos metabólicos com ação surfactante, os chamados biossurfactantes, que por apresentarem grupos polares e apolares com propriedades tensoativas conseguem aumentar a taxa de captação e biodegradação do contaminante, particularmente, os oleosos (COLLA; COSTA, 2003). Esses biossurfactantes, primeiramente, aumentam a solubilidade do contaminante através da formação de estruturas micelares e vesículas que se associam ao mesmo. Em seguida, facilitam o contato das células ao contaminante, transformando a superfície celular para mais hidrofóbica, com maior atração pelas gotículas emulsificadas de óleo (BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008).

A atividade enzimática dos micro-organismos responsável pela biodegradação dos contaminantes requer um grau apropriado de protonação dos aminoácidos, o que é controlado pelo pH. Uma acidez elevada do solo pode causar desnaturação protéica e inibição enzimática, comprometendo o metabolismo microbiano e, por consequência, o processo de biodegradação (MOREIRA, SIQUEIRA, 2006). O pH do solo também pode influenciar na solubilidade, mobilidade e nas formas ionizadas dos contaminantes. No entanto, de acordo com Schmidt (2004) não há influência deste parâmetro na solubilização, sorção e/ou dissolução de compostos orgânicos não miscíveis como os *NAPLs*.

Geralmente, a velocidade de degradação de compostos orgânicos no solo é frequentemente maior sob condições neutra a alcalina do que ácida. Tal fato está relacionado, principalmente, ao crescimento bacteriano que é maior sob essas condições. Os fungos são mais competitivos que as bactérias em solos ácidos, adaptando-se melhor em valores de pH menores que 5. Nessas condições, os fungos tornam-se os principais micro-organismos degradadores de vários compostos, particularmente, hidrocarbonetos. Porém, esses mesmos

micro-organismos degradam os hidrocarbonetos em um ritmo muito mais lento que as bactérias, que preferem um ambiente mais neutro a alcalino, com o pH variando de 6,5 a 8,5 (MAIER; PEPPER; GERBA, 2000).

O crescimento e a sobrevivência dos micro-organismos estão associados à síntese de diversos componentes celulares como aminoácidos, enzimas, ATP, DNA e coenzimas, os quais, por sua vez, requerem a assimilação de alguns macronutrientes como o nitrogênio, o fósforo e o enxofre (ALVAREZ, 2004; MAIER; PEPPER; GERBA, 2000). Em ambientes contaminados, esses micronutrientes podem se encontrar em quantidades inadequadas ao metabolismo microbiano, retardando o processo de biodegradação do contaminante (MILLIOLI et al., 2008; TRINDADE, 2002).

Assim como os macronutrientes, o teor de água disponível no solo é fundamental para a produção de novas células, assim como a difusão dos nutrientes e movimentação dos micro-organismos. Normalmente, solos muito secos resultam na morte de células vegetativas. Já teores excessivo de água afetam o metabolismo microbiano aeróbio pela baixa disponibilidade de oxigênio, uma vez que o transporte deste fica limitado pelo preenchimento dos espaços porosos por água (LEAHY; COLWELL, 1990; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; RIZZO et al., 2007; TRINDADE, 2002). O teor de água também tem influência no perfil da microbiota. Os fungos, por exemplo, conseguem tolerar solos mais secos, mas não se desenvolvem em solos com alto grau de saturação. Entretanto, as bactérias tendem a ter um comportamento oposto; em baixa umidade, esses micro-organismos são menos ativos (DEOTTI, 2005). Normalmente, os teores de água no solo ideais para a atividade microbiana são de 25% a 85% capacidade de campo, dependendo do tipo de solo e do contaminante presente (SEABRA, 2005).

Holman e Tsang (1995) *apud* Seabra (2005) mostraram que a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos foi mais eficiente em teores de umidade entre 50% e 70% da capacidade de campo para um solo franco siltoso. Em sistema de compostagem, Richard et al (2002) avaliaram os efeitos da umidade sobre a cinética da compostagem e também observaram os teores de umidade ótima variando de 50% a 70%.

A taxa de crescimento microbiano também está relacionada com a temperatura do solo. Temperaturas muito baixas reduzem a fluidez e permeabilidade da membrana celular, o que inibe a assimilação de nutrientes e até mesmo dos contaminantes (ALVAREZ, 2004; MAIER; PEPPER; GERBA, 2000). Perto ou abaixo de zero grau Celsius, as proteínas sofrem mudanças conformacionais e somente determinados grupos microbianos, classificados como psicrófilos podem sobreviver. Em temperaturas mais elevadas, em torno de 40-50ºC, algumas

células ficam incapacitadas, podendo morrer em temperaturas maiores que 70-85ºC, por conta da desnaturação de proteínas, enzimas e ácidos nucléicos (MOREIRA, SIQUEIRA, 2006).

A temperatura também pode influenciar a biodegradação, indiretamente, pela mudança de algumas propriedades do contaminante. Em altas temperaturas, por exemplo, hidrocarbonetos líquidos podem formar parafinas sólidas, tornando-se indisponíveis aos micro-organismos e, consequentemente, afetando a sua taxa de degradação (RIZZO et al., 2007; SEABRA, 2005). Já em baixas temperaturas, a viscosidade do óleo aumenta, ocasionando não só a redução da volatilização de cadeias hidrocarbônicas mais curtas e mais tóxicas (C_5-C_9), como também a sua solubilidade em água, o que retarde o processo de biodegradação (LEAHY; COLWELL, 1990; SEABRA, 2008). O biodiesel também tende a se solidificar e perder sua fluidez a baixas temperaturas (LOBÔ; FERREIRA; CRUZ, 2009).

Durante o processo de biodegradação, os micro-organismos, obtêm energia para o seu crescimento e manutenção através da quebra de ligações químicas e da transferência de elétrons do contaminante para aceptores de elétrons. Uma vez que os hidrocarbonetos estão em um estado reduzido e sua oxidação é termodinamicamente viável, na maioria das vezes, a biodegradação desses compostos é meramente uma reação de oxirredução, na qual os micro-organismos mediam oxidação dos mesmos, usando aceptores de elétrons durante processos naturais de respiração (ALVAREZ, 2004; MOREIRA, SIQUEIRA, 2006; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1993).

Dentre os compostos que podem agir como aceptores de elétrons, o oxigênio molecular o mais comum deles, sendo o que produz termodinamicamente a maior quantidade de energia em função do seu alto potencial de oxidação (MOREIRA, SIQUEIRA, 2006; MAZZUCO; 2004; TRIGUEROS, 2008). Um grande número de compostos orgânicos, incluindo os BTEX e os HPAs são oxidados pelos micro-organismos na presença de oxigênio. Inclusive, as etapas iniciais do catabolismo de vários hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos, tanto por fungos, quanto por bactérias, envolvem a oxidação do substrato por enzimas que requerem, inicialmente, a presença do oxigênio como aceptor (ALVAREZ; 2004; ATLAS, 1981; JACCQUES, 2005). Desta forma, teores reduzidos de oxigênio têm sido considerados um dos fatores mais críticos na biodegradação de compostos orgânicos como os hidrocarbonetos.

No entanto, em baixos teores de oxigênio e/ou na ausência do mesmo, a biodegradação pode ocorrer sob diversas condições denominadas anaeróbias, que incluem a desnitrificação, a ferro redução, a sulfato redução e a metanogênse, cujos aceptores finais de

elétrons são, respectivamente, o nitrato, o íon férrico, o sulfato e o dióxido de carbono (BAPTISTA, 2003; MAZZUCO, 2004; FRITSCHE; HORFICHTER, 2000). Cabe ressaltar, que alguns compostos também podem ser biodegradados na ausência de oxigênio por via fermentativa a qual não requer um aceptor de elétron externo, uma vez que os elétrons são transferidos para coenzimas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1993).

Outras propriedades do solo, como textura e porosidade também determinam a natureza e a extensão do ambiente no qual os micro-organismos são encontrados, podendo, desta forma, afetar a composição da população microbiana tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Solos arenosos, por exemplo, apresentam partículas com microporos de diâmetro superior a 1μm, viabilizando o acesso dos micro-organismos não só ao interior dos poros, mas também a fonte de carbono que ali estiver contida. Ao contrário, solos argilosos, apresentam microporos com diâmetro inferior a 1μm, limitando o acesso dos micro-organismos (BAPTISTA, 2003; MAIER; PEPPER; GERBA, 2000). Elevados teores de argila também dificultam a passagem de água e ar, prejudicando a atuação dos micro-organismos aeróbios sobre o contaminante. Solos com baixa porosidade como os arenosos, normalmente apresentam melhores taxas de aeração do que aqueles com alta porosidade, como os argilosos, onde a movimentação de gases e água é mais lenta (BAPTISTA, 2003; CHAGAS-SPINELLI, 2007).

1.3.4 Biodegradabilidade dos hidrocarbonetos: mecanismos bioquímicos envolvidos

A capacidade dos micro-organismos em degradar diferentes hidrocarbonetos de petróleo está bem reportada na literatura. Os primeiros estudos acerca da utilização desses compostos por micro-organismos ocorreram há mais de 100 anos, quando Ranh, em 1906, relatou a habilidade de diversos fungos do solo em degradar parafina, utilizando-a como única fonte de carbono. No mesmo ano, Sohnger reportou que esse mesmo substrato também poderia ser degradado por 17 espécies diferentes de bactérias do solo. Kaserer relatou na mesma época, a utilização do metano como fonte de energia por culturas mistas de bactérias do solo (ZOBEL, 1946). Em 1908, o relato de Stomer quanto ao isolamento da bactéria *Bacillus hexacarbovorum* capaz de utilizar o tolueno e o xileno como fonte de carbono, tornou conhecida a capacidade de micro-organismos em degradar hidrocarbonetos aromáticos (BUSHNELL; HAAS, 1941; ZOBEL, 1946).

Atualmente, já são conhecidos mais de 70 gêneros de micro-organismos degradadores, incluindo bactérias, fungos e levedura, alguns deles apresentados no Quadro 1 (JOO et al., 2008).

Bactérias		Fungos filamentosos	Leveduras
Achromobacter	Citrobacter	Aspergillus	Candida
Aerobacillus	Clostridium	Cephalosporium	Rhodotorula
Alcaligens	Enterobacter	Cunninghamella	Torula
Athrobacter	Escherichia	Torulopsis	
Bacillus	Micrococus	Trichoderma	
Bacterium	Pseudomonas	Saccharomyces	
Beijerinckia	Mycobacterium	Botrytis	

Quadro 1 – Gêneros microbianos degradadores de hidrocarbonetos no solo. Fonte: Baptista (2003).

Os extensos estudos acerca da ação dos micro-organismos sobre os hidrocarbonetos têm mostrado que a maioria desses compostos pode ser biodegradado, especialmente, sob condições aeróbias (FRITSCHE; HORFICHTER, 2000; RIZZO et al., 2007). No entanto, embora possam existir condições favoráveis à atividade microbiana nos solos, a biodegradação desses compostos pode ser dificultada pela própria estrutura química do composto, uma vez que os hidrocarbonetos apresentam distinta susceptibilidade quanto ao ataque microbiano (ATLAS, 1981; LEAHY; COLWELL, 1990; BAPTISTA, 2003).

A ocorrência de qualquer transformação do contaminante depende, sobretudo, da ligação química deste com a enzima e de mudanças conformacionais no sítio ativo desta. Nesse contexto, o composto pode não ser capaz de se alinhar adequadamente com a enzima e, portanto, não promover nenhuma reação (PALA, 2002). De modo geral, a biodegradabilidade relativa dos hidrocarbonetos em ordem decrescente é: n-alcanos lineares > alcanos ramificados > alquenos ramificados > alquenos > n-alquil aromáticos de baixo peso molecular > monoaromáticos > cicloalcanos > aromáticos polunucleares > asfaltenos (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003).

Dos hidrocarbonetos presentes no diesel, os alcanos lineares de comprimento C_{10}-C_{25} constituem os substratos mais prontamente utilizados pelos micro-organismos por serem mais susceptíveis ao ataque dos mesmos. Por conta disso, tendem a ser rapidamente degradados no ambiente. No entanto, já foi comprovada a biodegradação de n-alcanos até C_{44} (ATLAS, 1981). Estudos relatam que a biodegradação aeróbia desses compostos ocorre normalmente por um ataque monoterminal ou diterminal. Isso significa que a quebra ocorrerá

em um ou em dois átomos de carbonos terminais. Na oxidação monoterminal, o grupo metila desses compostos é comumente oxidado por uma série de reações que conduzem, primeiramente, a formação de um álcool primário, seguido de um aldeído e um ácido carboxílico, conforme ilustrado na Figura 6. O ácido carboxílico é posteriormente degradado via β-oxidação com a formação de ácidos graxos com dois carbonos a menos e a formação de acetilcoenzima A, com liberação eventual de CO_2. Na oxidação diterminal de alcanos C_{10} a C_{14}, por exemplo, ocorre a formação de diálcools primários e, posteriormente, ácidos alifáticos (ATLAS, 1981; BAPTISTA, 2003; BENTO, 2005).

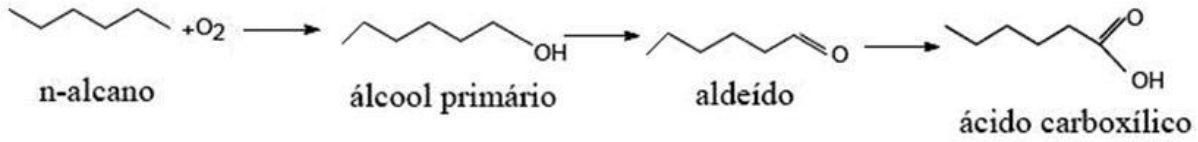


Figura 6 - Via metabólica de biodegradação de um n-alcano. Fonte: Bento (2005).

Diferentemente dos alcanos lineares, os ramificados apresentam maior resistência ao ataque microbiano, sendo poucos os micro-organismos capazes de utilizá-los, uma vez que a posição e o grau de ramificação dificultam a atuação das enzimas oxidativas, aumentando a recalcitrância desses compostos. Os cicloalcanos, por sua vez, são ainda mais resistentes os anteriores devido a sua estrutura e o se estado físico. A biodegradação aeróbia desses compostos inicia-se pela ramificação ou pelos anéis, dependendo dos micro-organismos e do substrato em que se encontram disponíveis, dando origem a cetonas e alcoóis. Quando oxigenados a degradação prossegue ocorrendo a clivagem (ruptura) do anel (ROSA, 2001). A Figura 7 apresenta esquematicamente um exemplo da via metabólica do cicloalcano.

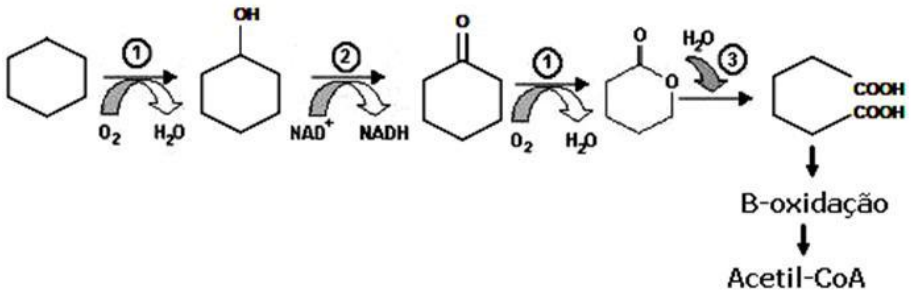


Figura 7 - Via metabólica de degradação do ciclohexano. Os números em negrito representam as enzimas: 1- monoxigenases; 2 – dehidrogenases; 3 – hidrolases. Fonte: Baptista (2003).

Os hidrocarbonetos aromáticos são mais difíceis de serem biodegradados, em função da elevada estabilidade termodinâmica conferida pela energia de ressonância do anel aromático (BAPTISTA, 2003). No entanto, a existência de micro-organismos degradadores

desses compostos, particularmente do grupo BTEX, é um fato amplamente aceito e bem documentado (ALVAREZ, 2004; ATLAS, 1981; CERNIGLIA, 1992; TRIGUEROS, 2008).

De um modo geral, a degradação aeróbia bacteriana dos compostos aromáticos envolve, primeiramente, a ação de enzimas dioxigenases para incorporar duas moléculas de oxigênio, e dar inicio à oxidação, com a formação de cis-diidrodióis. Esses cis-diidrodióis inicialmente formados são rearranjados enzimaticamente gerando um derivado diidroxilado que, posteriormente é oxidado, levando a formação de catecol, substrato resultante dos processos anteriores de oxidação responsável pela clivagem inicial do anel. Existem dois mecanismos para a clivagem do anel: na posição *orto* ou na posição *meta*,como mostrado na Figura 8 (PEREIRA, 2008).

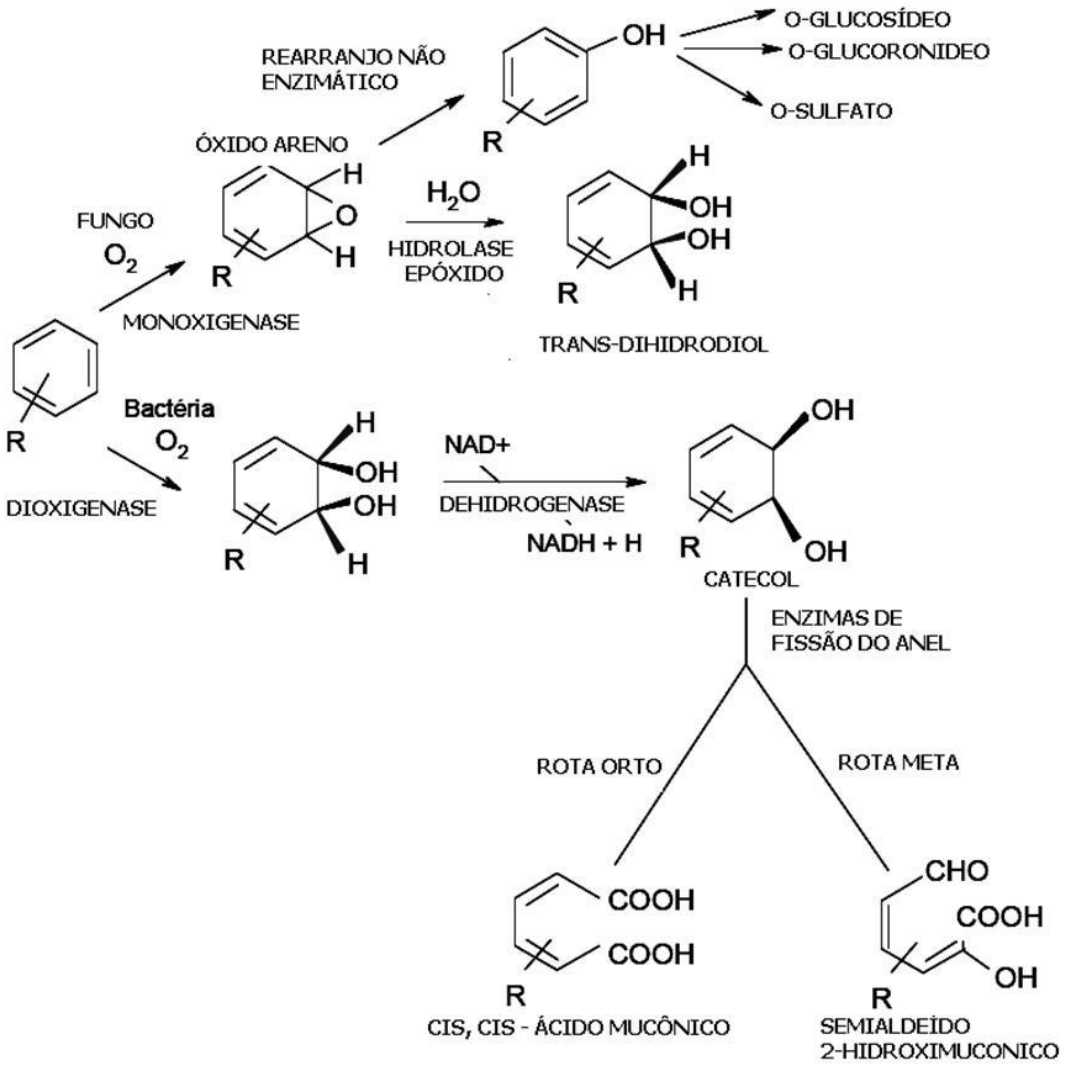


Figura 8 - Rotas metabólicas utilizadas pelos micro-organismos na degradação de HPAs. Fonte: Pereira (2008).

O mecanismo mais comum é o que envolve a posição *orto*, seguido por uma série de reações enzimáticas até chegar aos produtos finais que incluem: ácidos orgânicos de baixo peso molecular e aldeídos, os quais são todos empregados pelos micro-organismos na síntese de constituintes celulares (CERNIGLIA, 1992; FRITSCHE; HORFICHTER, 2000; JUHASZ; NAIDU, 2000).

Os fungos, diferentemente das bactérias, agem sobre os compostos aromáticos produzindo monoxigenases para incorporar um átomo de oxigênio no substrato, formando primeiramente óxidos arenos, seguido de trans-diidrodióis e fenóis (PEREIRA, 2008; SEABRA, 2008).

No tocante aos HPAs, cabe ressaltar que os compostos de maior peso molecular, ou seja, com mais de quatro anéis, são mais resistentes à biodegradação do que os de baixo peso molecular (até três anéis), em função da elevada energia de ressonância do anel e toxicidade que apresentam (CERNIGLIA, 1992; HEITKAMP; CERNIGLIA, 1989). A biodegradação ocorre, geralmente, por cometabolismo de acordo com Heitkamp e Cerniglia (1989). A capacidade de bactérias e fungos em degradar esses compostos, incluindo vias de degradação encontra-se discutida em: Cerniglia, 1992; Kanaly; Harayma, 2000; Juhasz; Naidu, 2000.

Os componentes o biodiesel, quando comparados aos do diesel, apresentam uma estrutura química mais vantajosa no que diz respeito a sua biodegradabilidade. O grupamento éster da cadeia hidrocarbônica é mais susceptível ao ataque enzimático em função da presença dos átomos de oxigênio Presumi-se que a biodegradação aeróbia ocorra primeiramente pela clivagem do metil ou etil éster por uma esterase, produzindo um ácido graxo e o álcool associado, seguida da quebra do ácido graxo por β oxidação (ALUYOR; OBAHIAGBON; ORI-JESU, 2009; GOMES, 2008; VIEIRA et al., 2006). Na β oxidação, o ácido graxo sofre remoção gradativa de dois átomos de carbono na forma de acetil-CoA, que entra no ciclo de Krebs, ciclo do ácido tricarboxílico, para completa mineralização a CO_2 e H_2O (MAIER; PEPPER; GERBA, 2000).

1.3.5 Técnicas e estratégias da biorremediação microbiana

A biorremediação microbiana é uma das principais vertentes da tecnologia de biorremediação, sendo considerada bastante versátil por abranger um conjunto de técnicas que podem ser aplicadas diretamente no local a ser tratado (*in situ*), sem há necessidade de remoção ou transporte do solo contaminado até a superfície; ou em outro (*ex situ)*, a qual

requer, primeiramente, a remoção do solo por escavação, drenagem ou qualquer outro processo, para posterior tratamento (BOOPATHY, 2000; SEPÚLVEDA; TREJO, 2002; SPARKS, 2003). O Quadro 2 apresenta um resumo das principais técnicas de biorremediação de solo contaminado atualmente empregadas e discutidas por diversos pesquisadores (KHAN; HUSAIN; HEJAZI, 2004; PEDROZO et al., 2002; SEABRA, 2008; SEPÚLVEDA; TREJO, 2002; WAUDBY; NESLON, 2004).

Aplicabilidade	**Técnica**	**Princípio**
In situ	Atenuação natural Monitorada	Contaminante permanece no local e através dos processos naturais ocorre a redução da concentração do mesmo. Processo monitorado, sem intervenção.
In situ	*Bioventing*	Estimula os processos de gradação aeróbia pela introdução de ar na zona insaturada do solo. Uso de bombas, redes de tubo, e em alguns casos, galerias de infiltração para distribuição de nutrientes.
In situ	*Biosparging*	Similar ao *Bioventing*, porém a introdução de ar ocorre na zona saturada do solo.
In situ/ Ex situ	*Landfarming*	Disposição do solo contaminado em células de tratamento de grandes dimensões contendo solo de superfície não contaminado. Revolvimento e aragem periódica do solo.
Ex situ	Compostagem	Variante do Landfarming. Uso de micro-organismos termofílicos aeróbios em pilhas (leiras) construídas para degradar o contaminante. Revolvimento periódico do solo.
Ex situ	Biopilhas	Similar a compostagem, porém o tratamento é estático, ou seja, sem revolvimento do solo. Introdução de ar na base da biopilha para aeração do sistema. Cobertura superior com lonas plásticas.
Ex situ	Biorreator	Sistema fechado, controlado e usado para promover maior contato dos micro-organismos com o contaminante. Diversos tipos e configurações.
In situ	Biorremediação melhorada	Estimulação dos micro-organismos nativos ou adicionados ao meio por meio da circulação de soluções aquosas. Parâmetros como nutrientes, pH, oxigênio, entre outros são corrigidos objetivando aumentar a eficiência da biodegradação.

Quadro 2 – Principais técnicas de biorremediação de solos contaminados. Fonte: Accyoli e Siqueira (2000); Seabra (2008).

Segundo a U.S.EPA (2007), as técnicas de aplicação *in situ* são muitas vezes preferidas por profissionais e gestores por serem, em geral, de baixo custo e apresentarem menor risco de exposição ao contaminante, quando comparadas às tecnologias *ex situ*. As técnicas *ex situ*, dependendo do tratamento a ser aplicado, podem tornar-se mais onerosas devido aos custos com transporte e disposição final do solo removido (SEPÚLVEDA; TREJO, 2002). Contudo, em alguns casos, a remoção pode ser necessária, principalmente, pela natureza e concentração do contaminante, pela possibilidade de contaminação de pessoas

e do ambiente ao redor (JACCQUES et al., 2007). De acordo com a CETESB (2001b), na escolha do modo de aplicação (*in situ; ex situ)* deve-se levar em conta os contaminantes, o custo dos processos e, principalmente, a concentração final do contaminante e uso futuro da área.

Independente do tipo de aplicação, todas as técnicas de biorremediação estão fundamentadas no processo natural de biodegradação, o qual pode estar associado (ou não), a diferentes estratégias de tratamento, de modo a otimizar as condições ótimas de degradação biológica do contaminante. Dentre essas estratégias o bioestímulo (ou bioestimulação) e o bioaumento são as mais comumente utilizadas e reportadas na literatura (DIAS, 2007; JACCQUES et al., 2007; RAHMAN et al., 2002; RAHMAN et al., 2003; GHAZALI et al., 2004; VIÑAS et al., 2002).

A estratégia de bioestímulo consiste basicamente na adição de oxigênio e/ou nutrientes ao meio com o objetivo de estimular o metabolismo dos micro-organismos e, consequentemente, aumentar as taxas de biodegradação (CUNHA et al., 2008; MARGESIN, ZIMMERBAUER; SCHINNER, 2000). No entanto, para alguns pesquisadores, alterações de algumas condições *in situ* como pH e umidade também são incluídas como práticas de bioestimulação (CETESB, 2001b; RIZZO et al., 2007).

O fornecimento de oxigênio ao solo tem sido considerado um fator de grande importância, uma vez que a ausência desse elemento pode modificar completamente a natureza do processo de biodegradação, assim como a intensidade com que ele ocorre. Onde há disponibilidade de oxigênio, sob forma de gás, desenvolvem-se micro-organismos que utilizam o mesmo na oxidação do contaminante. Na ausência do mesmo, desenvolvem-se micro-organismos que utilizam outros compostos para oxidação do contaminante, porém, em uma taxa considerada mais lenta do que com a disponibilidade ampla de oxigênio (BAPTISTA, 2003; ALVAREZ, 2004).

A suplementação de oxigênio ao solo pode ser efetuada por diferentes mecanismos de aeração como revolvimento mecânico, injeção de ar e adição de material estruturante, ou ainda pela adição de agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio (CUNHA et al., 2008; SANTOS et al., 2007).

A injeção de ar tem sido uma prática extensivamente usada no tratamento de solos e águas subterrâneas contaminados por petroderivados (MARIANO, 2006; CETESB, 2010). Dependendo do local e do contaminante alvo, o ar injetado, além suprir a demanda de oxigênio necessária a biodegradação aeróbia, pode também, promover a transferência de contaminantes voláteis da zona saturada para a zona insaturada do solo onde os mesmos

podem ser coletados e tratados, se necessário, ou ainda degradados pelos micro-organismos autóctones presentes (KHAN; HUSAIN; HEJAZI, 2004; PEPPER; GERBA; BRUSSEAU, 2006).

A adição de peróxido de hidrogênio também tem sido bastante utilizada em tratamentos *in situ*. O peróxido pode ser utilizado em concentrações que variam de 100 a 500 mg L^{-1} de acordo com o tipo de solo. Concentrações acima de 1200 a 2000 mg L^{-1} são consideradas tóxicas (CUNHA et al., 2008). Essa toxicidade, no entanto, pode ser minimizada aplicando-se, primeiramente doses reduzidas da substância, e depois, aplicação gradativa até atingir doses mais elevadas em torno de 1000 mg L^{-1}. Dentre as vantagens do uso do peróxido destacam-se o custo relativamente baixo envolvido na aplicação e a não persistência do peróxido no ambiente (CUNHA et al., 2008; FORNO, 2006).

Recentemente, a injeção de receptores de elétrons anaeróbios, tais como o nitrato, tem sido sugerida como estratégia de bioestimulação, particularmente em maiores profundidades do solo e em águas subterrâneas, onde a solubilidade do oxigênio é limitada (CASTRO et al., 2005; COSTA; NUNES; CORSEUIL, 2009).

Quanto à suplementação de nutrientes, a mesma tem sido tradicionalmente focada na adição de fontes de nitrogênio e fósforo, tanto orgânicas como inorgânicas (CUNNINGHAM; PHILP, 2000; NAMKOONG et al., 2002; SARKAR et al., 2005). Em relação ao nitrogênio, as fontes mais comumente utilizadas são uréia, cloreto de amônio e nitrato de amônio. O fósforo, por sua vez, é adicionado principalmente na forma de fosfato de potássio ou de sódio, podendo ser utilizados também sais orto fosfóricos e polifosfatos (CUNHA et al., 2008; PEREIRA, 2008; TRINDADE 2002).

Nos processos de biorremediação, as quantidades de nitrogênio e fósforo a serem adicionadas são, geralmente, calculadas através das proporções de carbono:nitrogênio (C:N) e carbono:fósforo (C:P), tendo como base o teor de carbono orgânico do sítio contaminado. Diversas relações C:N:P têm sido reportadas na literatura de modo a permitir uma máxima degradação do contaminante. Porém, deve-se ter cautela na escolha da mesma, pois podem ocorrer efeitos prejudiciais aos micro-organismos caso essa relação esteja acima das quantidades requeridas pelos mesmos. O nitrogênio, por exemplo, quando adicionado na forma de sais de amônia pode ser tóxico aos micro-organismos devido à possibilidade da geração de amônia. Já os fosfatos e orto-fosfatos podem apresentar diversos efeitos na biodegradação, dependendo da toxicidade e solubilidade apresentada por essas fontes (TRINDADE, 2002).

Molina-Barahona (2004) testaram o efeito de duas relações nutricionais C:N, 100:10: e 100:30, quanto ao estímulo da população microbiana autóctone em biodegradar os hidrocarbonetos presentes em um solo contaminado por diesel. A adoção da relação 100:10, combinada com um teor de umidade de 30% e adição de resíduo de milho a 3%, resultaram em uma atividade metabólica mais alta, favorecendo uma maior remoção dos hidrocarbonetos (67%) comparada com as demais condições testadas.

O bioaumento ou bioenriquecimento, como é denominado por alguns autores, consiste na introdução de culturas puras de micro-organismos ou de consórcios microbianos, previamente selecionados, com potencial para a degradação de contaminantes específicos (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005; PIEPER; REINEKE, 2000). Basicamente, o objetivo desta estratégia é aumentar o número de micro-organismos catabolicamente relevantes ao processo de biodegradação e reduzir o período de adaptação dos micro-organismos presentes no sito contaminado, acelerando o processo de degradação do poluente (FANTROUSSI; AGATHOS, 2005). Tais fatores são particularmente importantes quando no meio impactado há um número reduzido ou inexistente de micro-organismos com habilidade degradadora do poluente alvo, tornando o bioaumento uma estratégia bastante interessante (JACCQUES, 2005; JACCQUES et al., 2007).

Existem diferentes abordagens quanto à seleção dos micro-organismos úteis ao bioaumento. Os micro-organismos inoculados podem ser nativos (indígenas), ou seja, próprios do sítio contaminado, extraídos, enriquecidos em meios de cultura usando o próprio contaminante como substrato, e re-introduzidos no ambiente em maior biomassa; ou serem exógenos (alóctones). Estes últimos são estranhos ao habitat alvo, podendo ser previamente selecionados de uma área com histórico de contaminação similar ou não, e enriquecidos em laboratório. Em alguns casos, os mesmos também podem ser geneticamente modificados de modo a conter plasmídeos para a degradação acelerada de um determinado composto de interesse ambiental (GAYLARDE; BELLINASO; MANFIO, 2005; MROSIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2009; SINGER; VAN DER GAST; THOMPSON, 2005).

A reinoculação do solo com micro-organismos pré-selecionados do próprio ambiente contaminado tem sido considerada por alguns autores como a abordagem mais promissora no processo de biorremediação (BENTO et al., 2003; CUNNINGHAM; PHILP, 2000). Segundo Thompson et al (2005) a população indígenas prevalente do habitat alvo encontra-se mais adaptável fisiologicamente as condições do mesmo sendo, portanto, mais favorável a persistir como um inóculo reintroduzido do que aquela população estranha ou mesmo transitória. Além disso, esses mesmos autores ressaltam que o processo de enriquecimento não oferece todas as

condições necessárias para os micro-organismos exógenos se tornarem competitivos à população microbiana indígena. Bento et al (2003, 2005) avaliaram a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solos contaminados com óleo diesel através da biorremediação intrínseca, bioestímulação e bioaumento, e observaram que o bioaumento com adição do inóculo pré-selecionado do solo contaminado apresentou a maior degradação da fração leve e pesada de HTP (73%-75%), sendo mais efetiva do que o bioestímulo e a atenuação natural.

A prática de bioaumento para remediação de áreas contaminadas é relativamente recente, embora a mesma já seja usada há anos na agricultura e no tratamento de águas residuárias (FANTROUSSI; AGATHOS, 2005). Segundo Furtado (2001) empresas norte-americanas e européias já produzem e comercializam aditivos microbianos há mais de 30 anos para uso em tratamento de efluentes.

Existem poucos registros de aplicação do bioaumento em campo, sendo a maioria nos Estados Unidos com foco na remediação de solventes clorados em águas subterrâneas (ESTCP, 2005). Grande parte dos estudos envolvendo essa estratégia ainda é desenvolvida em escala de bancada ou piloto (FANTROUSSI; AGATHOS, 2005). No entanto, os mesmos têm se mostrado promissores na degradação de numerosos compostos incluindo óleo, HPAs e vários pesticidas como antrazina e carbofuran (DEJONGHE et al., 2001; GENTRY; RENSING; PEPPER, 2004). Garon et al (2004), por exemplo, observaram o aumento da degradação do fluoreno da solução do solo após bioaumento com o fungo *A. cylindrospora*. Na presença deste mais de 90% do fluoreno foi degradado em 288 horas enquanto no tratamento com a ausência do mesmo foram requeridas 576 horas. Jaccques (2005) também investigou o bioaumento na degradação de HPAs. Ele observou que a inoculação de um consórcio microbiano composto por seis bactérias e um fungo em um argissolo contaminado com antraceno, fenantreno e pireno resultou em um aumento de aproximadamente 10 vezes na mineralização destes compostos em relação à microbiota nativa do solo. Ueno et al (2006) estudaram a degradação dos n-alcanos em um solo contaminado por diesel com a inoculação de cepas *P. aeruginosa* WatG. No tratamento com solo não estéril a remoção dos HTP foi de 51% em uma semana, enquanto que no controle a remoção foi de apenas 15%.

Embora diversos relatos demonstrem o benefício da utilidade do bioaumento, ainda há pouco conhecimento e evidências definitivas da efetividade dessa estratégia (SINGER; VAN DER GAST; THOMPSON, 2005; VOGEL, 1996). Alguns pesquisadores têm reportado efeitos pouco significativos ou até mesmo nenhum efeito quanto a mesma (MARIANO et al., 2009; SILVA et al., 2009). Fatores relativos à adaptação dos micro-

organismos inoculados, insuficiência de substratos e nutrientes, condições ambientais do sito alvo, predação por protozoários e competição entre as espécies introduzidas e as indígenas têm sido as principais razões para as falhas e os efeitos pouco significativos dessa estratégia (BOUCHEZ et al., 2000; FANTROUSSI; AGATHOS, 2005; VAN VEEN; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 1997).

Mesmo assim, o bioaumento tem sido considerado uma ferramenta importante para o sucesso das aplicações de biorremediação, especialmente nos casos de áreas contaminadas por compostos recalcitrantes (ESTCP, 2005; SINGER; VAN DER GAST; THOMPSON, 2005; VOGEL 1996). Por isso, diferentes abordagens para aumentar a persistência e a atividade dos micro-organismos após sua introdução no ambiente têm sido consideradas, como por exemplo, o encapsulamento de célula e a inoculação de genes catabólicos (MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2009). Gentry, Resing e Pepper (2004) e Frantroussi e Agathos (2005) discutem algumas dessas abordagens.

O uso do bioaumento com uma estratégia eficaz na biorremediação de áreas contaminadas ainda necessita de pesquisas mais detalhadas quanto à interação entre condições ambientais específicas e micro-organismos (FANTROUSSI; AGATHOS, 2005; MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2009; VAN VEEN; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 1997), devendo ser precedido por uma série de estudos experimentais com o objetivo de avaliar a capacidade dos micro-organismos em colonizar e degradar o poluente no ambiente alvo (SABATÉ; VIÑAS; SOLANAS, 2004).

1.3.5.1 Consórcios microbianos

No tocante a estratégia de bioumento, a utilização de consórcios microbianos tem sido preferida em oposição às culturas puras. Isso porque os consórcios microbianos têm apresentado um maior potencial em metabolizar uma faixa significativa de compostos complexos, como, por exemplo, os petroderivados (GHAZALI et al., 2004; FRITSCHE; HOFRICHTER, 2000; VIÑAS et al., 2002).

A literatura reporta uma grande variedade de micro-organismos com capacidade de degradar diferentes compostos químicos. No entanto, o que se tem observado é que os micro-organismos podem metabolizar somente um número limitado de compostos isoladamente, de forma que uma mistura de populações com ampla capacidade enzimática é requerida para

atingir a degradação extensiva de alguns contaminantes (BENTO et al., 2005; DIAS, 2007; VIÑAS et al., 2002).

Rahman et al (2002) investigaram cinco diferentes espécies bacterianas isoladas de amostras de solo contaminado na biodegradação de óleo cru, assim como o consórcio constituído pela mistura das cinco. As culturas isoladamente apresentaram menor taxa de degradação quando comparadas ao consórcio misto.

Mariano et al (2008) avaliaram a capacidade de diferentes micro-organismos em degradar óleo diesel comercial e intemperizado através de experimentos com indicador redox DCPIP. Foram testadas culturas bacterianas, consórcios obtidos de solo e água subterrânea contaminados por hidrocarbonetos e um consórcio de uma área não contaminada. De acordo com os resultados, apenas os consórcios, inclusive os obtidos de uma área não contaminada, foram capazes de biodegradar o diesel intemperizado, sugerindo que culturas puras, mesmo com reconhecida capacidade de biodegradar hidrocarbonetos podem falhar quando aplicadas isoladamente.

Alguns autores ressaltam que a capacidade de degradação de qualquer consórcio microbiano não é somente o resultado da simples soma das capacidades individuais de cada espécie que forma o consórcio. Mas também efeito das interações sinérgicas entre os membros do consócio, que, por sua vez, são bastante complexos. Algumas espécies, por exemplo, podem ser capazes de mineralizar determinados compostos, se os mesmos foram previamente e parcialmente degradados por uma espécie anterior. Outras, por sua vez, podem crescer e degradar metabólitos tóxicos produzidos pelo metabolismo das espécies que a precederam (GHAZALI et al., 2004; VIÑAS et al., 2002; JACCQUES et al., 2008). Em função do exposto, diversos estudos envolvendo o uso de consórcios microbianos para biorremediação de solos contaminados têm sido desenvolvidos, inclusive no Brasil (DIAS, 2007; JACCQUES, 2005; MARIANO 2006, 2008). Segundo uma pesquisadora da Universidade Estadual de Campinas, em São Paulo (UNICAMP), a tendência é que dentro de poucos anos sejam produzidos nacionalmente kits prontos contendo consórcios microbianos para trabalhos de biorremediação, fato que já ocorre nos Estados Unidos. Ainda segundo essa pesquisadora, os trabalhos experimentais estão focados primeiramente no desenvolvimento de consórcios para degradação dos HPAs, derivados de petróleo especificamente e compostos aromáticos clorados como dioxinas e bifenilas policloradas (PCBs) (FILHO, 2003, 2005).

Além da UNICAMP, o Instituto de Botânica de São Paulo (IBT) e a Embrapa Meio Ambiente-SP, também têm desenvolvido pesquisas relativas à aplicação de micro-organismos e formulações destes para tratamento de solos contaminados, envolvendo, particularmente,

fungos e bactérias nativas do litoral paulista. A pesquisa do IBT iniciada há mais de 7 anos identificou dentre 600 linhagens quatros espécies de fungos basidiomicetos com elevada capacidade de degradar diversos compostos, sobretudo, os pesticidas pentaclorofenol e hexaclorobenzeno. Atualmente a pesquisa está focada no aperfeiçoamento da ação desses fungos e na viabilização para aplicação em escala industrial. A Embrapa, com uma pesquisa mais avançada já possui diferentes formulações de fungos e bactérias com função de degradar os principais pesticidas consumidos no país. No entanto, a etapa de formulação por escrito dos aditivos biológicos ainda precisa ser finalizada e patenteada (FURTADO, 2001).

1.3.6 Avaliação da biorremediação em laboratório

Para avaliar a aplicabilidade e a eficácia das técnicas de biorremediação, tanto *in situ* como *ex situ*, faz-se necessário um planejamento inicial sobre isolamento e seleção de micro-organismos ou de consórcios microbianos eficiente na degradação do contaminante em estudo, assim como o conhecimento sobre a cinética da biodegradação (BALBA; AL-AWADHI; AL-DAHER, 1998; CETESB, 2001b; MELO; AZEVEDO, 2008). Estudos em laboratório visando determinar as taxas de biodegradação podem ser usados como testes de varredura para avaliar a rapidez e extensão da biorremediação. Adicionalmente, esses estudos também podem ser usados para auxiliar na seleção do processo de biorremediação mais adequado para aplicação em campo, assim como na previsão de custos e duração do tratamento (BALBA; AL-AWADHI; AL-DAHER, 1998; KING; LONG; SHELDON, 1997).

No entanto, cabe ressaltar que os estudos realizados em laboratório sob condições controladas, ajudam a predizer o que acontecerá em condições naturais, mas nem todos, necessariamente, podem ser usados para simular os complexos processos de biorremediação em condições naturais. Segundo King, Long e Sheldon (1997) estudos realizados em laboratório, na sua maioria, não permitem uma avaliação completa da extensão total da biodegradação, pois tal informação pode levar semanas ou meses para ser alcançada além não retratar, necessariamente, o que ocorrerá em uma futura aplicação *in situ*. Nesse caso, CETESB (2001b) sugere que após a realização dos testes laboratoriais iniciais um segundo teste em pequena escala seja conduzido como uma primeira avaliação da sua eficiência. E, após esse passo, a realização de novos testes, em maior escala, para comprovar a viabilidade observada em laboratório.

Resultados laboratoriais bastante relevantes podem ser obtidos quanto mais próximos das condições reais do ambiente os mesmos forem conduzidos. Nesses casos, o uso de amostras coletadas da própria área a ser remediada representa um fator de grande importância. O uso de controles também é fundamental para que se possa diferenciar outros mecanismos de degradação do poluente como evaporação e fotodegradação do processo de degradação realizado pelos micro-organismos (BALBA; AL-AWADHI; AL-DAHER, 1998; KING; LONG; SHELDON, 1997; MARIANO, 2006).

Microcosmos de bancada e biorreatores estão entre as principais abordagens laboratoriais utilizadas para estudar os processos de biorremediação. Ambas podem assumir diferentes tipos e configurações, buscando-se um maior controle sobre as variáveis do sistema (BALBA; AL-AWADHI; AL-DAHER, 1998; KING; LONG; SHELDON, 1997; MAIER, PEPPER; GERBA, 2000). Para prever o desempenho do processo de biodegradação, parâmetros químicos e biológicos têm sido usados conjuntamente, dentre os quais se destacam: quantificação da população microbiana heterotrófica total e degradadora do poluente alvo, quantificação da taxa de respiração microbiana e determinação da porcentagem de remoção dos compostos poluentes individualmente e/ou na sua totalidade (ALAMRI, 2009; BAPTISTA, 2003; CHAGAS-SPINELLI, 2007; MARIANO et al., 2008; SANTOS, 2007). Dentre esses parâmetros o percentual de remoção dos poluentes, consiste na medida mais direta da eficiência da biodegradação (MARIANO, 2006).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho abordou diferentes estratégias de biorremediação para tratamento de um solo arenoso, contaminado experimentalmente com 5% (p/p) de óleo diesel B5. O estudo consistiu de dois experimentos independentes: (i) ensaios de biodegradação em microcosmos de bancada, empregando o consórcio comercial de micro-organismos eficazes (*Embiotic Line*), produzido pela empresa Korin - Preservação e Recuperação do Meio Ambiente Ltda, e aqui denominado de KMA; e (ii) ensaios de biodegradação em respirômetros de Bartha, empregando o consórcio comercial KMA e uma cultura microbiana, denominada RES, obtida a partir do solo coletado em um posto de revenda de combustíveis com histórico de contaminação.

Adicionalmente, foram conduzidos testes para avaliar a capacidade do consórcio comercial KMA, da cultura microbiana RES e da população autóctone do solo de estudo em biodegradar óleo diesel B5, diesel puro e biodiesel de soja, através do uso de indicadores de oxirredução DCPIP e TTC.

Todos os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI), da Faculdade de Engenharia da UERJ, laboratório este integrado ao Laboratório de Geografia Física-Solos (LAGEFIS), do Instituto de Geografia da UERJ.

2.1 Solo de estudo: seleção, obtenção e caracterização

O solo utilizado nos dois experimentos de biodegradação foi coletado de uma área de agricultura orgânica (Figura 9) da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro-Rio), localizada na Rodovia 465, antiga Rio-São Paulo, Km 47, Seropédica, RJ. Trata-se de um de um Planossolo Háplico Distrófico, típico da região (AGUIAR, 2006; OLIVEIRA, 2008). O local foi escolhido em função da alta probabilidade de estar isento de contaminação à base de petróleo e derivados, e de outros contaminantes químicos.

Foram realizadas duas amostragens: a primeira de cerca de 20 kg e a segunda de aproximadamente 50 kg, antes do início de cada um dos dois experimentos, por agrônomos do grupo de pesquisa BioProcess que atuam no LABIFI, conforme procedimento descrito a seguir.

Figura 9 – Foto por satélite do local de coleta do solo de estudo. Área sinalizada pelo círculo. Fonte: Google maps (2010).

Para a coleta, foi escolhida uma área de baixada, uniforme quanto à cor, topografia e quanto o manejo recebido. Como primeiro passo, folhas e outros detritos foram removidos da superfície. A amostragem foi feita em zig-zag, retirando-se com um trado, amostras simples de 15 diferentes pontos, iniciando-se do topo do solo até uma profundidade de 20 cm. Amostras simples foram acondicionadas em saco plástico de polietileno limpo para formar uma amostral composta. A mesma foi transportada para o LABIFI, colocada em bandejas, seca ao ar e peneirada em malha de 2 mm de abertura, em peneira Granutest (ABNT 10; Tyler 9), para remover restos de material vegetal e grandes torrões de terra, diminuindo, assim, sua heterogeneidade (MELO; AZEVEDO, 2008; LIMA, 2004; TRINDADE, 2002). Em seguida, a solo peneirado foi particionado em duas alíquotas. A primeira, de cerca de 600 g, foi destinada à caracterização física, química e microbiológica. A segunda alíquota foi acondicionada em sacos plásticos e armazenada sob refrigeração de 4 ºC até a realização dos ensaios de biodegradação (LEE et al., 2007; MELO; AZEVEDO, 2008; TRABUE et al., 2006).

No tocante aos aspectos físicos e químicos, o solo foi caracterizado quanto aos seguintes parâmetros: (i) granulometria, porcentagem de areia, silte e argila; (ii) densidade; (iii) complexo sortivo (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Na^{+}, Al^{3+}, H^{+}); (iv) pH; (v) carbono orgânico; (vi) nitrogênio total; (vii) fósforo assimilável; (viii) capacidade de campo; e (ix) umidade. No aspecto microbiológico, foi realizada a quantificação da população microbiana nativa heterotrófica total.

As análises físicas e químicas foram realizadas pelos laboratórios da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Solos), localizada no Município do Rio de Janeiro, de acordo com o Manual de Métodos de Análises de Solo (EMBRAPA, 1997), com exceção dos parâmetros pH, umidade e capacidade de campo, analisados no LABIFI, juntamente com a quantificação da população microbiana nativa heterotrófica total, de acordo com as metodologias apresentadas nas *seções 2.6.2, 2.6.3, 2.6.4* e 2.6.5, respectivamente.

No LABIFI, sete dias antes da quantificação da população microbiana, o solo *in natura* foi separado e incubado à temperatura de 22-27 ºC, ao abrigo da luz, objetivando reduzir os efeitos da amostragem, peneiramento e armazenamento sobre os micro-organismos e seus processos (MELO; AZEVEDO, 2008).

O solo *in natura* também foi caracterizado quanto à presença de hidrocarbonetos de petróleo. A caracterização foi realizada pelo Laboratório Analytical Solutions - RJ, segundo metodologia U.S.EPA 8015. A extração dos hidrocarbonetos extraíves de petróleo do solo foi realizada no LABIFI, conforme metodologia descrita na *seção 2.6.6*

2.2 Diesel B5 usado nos experimentos

O óleo diesel B5 utilizado como contaminante nos dois experimentos de biodegradação e nos testes de biodegradabilidade foi preparado no LABIFI, a partir de amostras de óleo diesel de referência e biodiesel de soja. A mistura foi preparada por pesagem dos respectivos percentuais de diesel/biodiesel adotado: 95/5 (g/g). Ambos os óleos foram doados pelo professor Sérgio Machado Corrêa, do Departamento de Química e Ambiental da Faculdade de Tecnologia (FAT) da UERJ em Resende, sendo os mesmos procedentes do Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES). Cabe ressaltar, que o diesel de referência é o diesel utilizado em ensaios de consumo de combustível e emissões veiculares para homologação de veículos automotores ciclo diesel (ANP, 2007).

Não foi possível obter a caracterização físico-química dos combustíveis, com exceção da densidade do óleo diesel, que era de 0,83 g cm^{-3}. Entretanto, o óleo diesel de referência e o diesel B5 preparado foram caracterizados pelo Laboratório Analytical Solutions - RJ, quanto ao teor de hidrocarbonetos totais por cromatografia de fase gasosa com detector de ionização em chama (CG-FID).

O óleo diesel recebido foi armazenado até o uso sob refrigeração a 4 ºC (CHAGAS-SPINELLI, 2007) e ao abrigo da luz, sendo o frasco, neste último caso, embrulhado em folha de papel alumínio. O biodiesel foi armazenado em temperatura de 20-25 ºC, também ao abrigo da luz, de modo a evitar sua solidificação, perda de fluidez e fotoxidação (LOBÔ; FERREIRA; CRUZ, 2009). O diesel B5 foi preparado no início de cada experimento, na quantidade necessária ao mesmo.

2.3 Ensaios de biodegradação com consórcio comercial de micro-organismos eficazes da Korin Meio Ambiente (*Embiotic Line)*

Esse primeiro experimento, realizado entre os meses de abril a julho de 2009, teve como objetivo avaliar o efeito do bioaumento com o consórcio de micro-organismos eficazes cedido pela Korin Meio Ambiente (*Embiotic Line*) na biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo presentes no solo contaminado artificialmente com óleo diesel B5, comparado a outras estratégias de biorremediação. O *Embiotic Line* constitui-se em uma suspensão microbiana com função de bioaumento, desenvolvida, originalmente, para tratamento de resíduos orgânicos através do processo de compostagem. Em seu conteúdo há diferentes micro-organismos como bactérias e leveduras (KORIN MEIO AMBIENTE, 2010). No presente estudo, tal consórcio microbiano foi designado de KMA.

Cabe mencionar que o termo micro-organismos eficazes (EM - *Effective Micro-organisms*) refere-se a um conjunto de micro-organismos encontrados na natureza, especialmente, em solos férteis, e que auxiliam no desenvolvimento de plantas. Tais micro-organismos foram utilizados inicialmente em 1935 pelos praticantes da Agricultura Natural Messiânica, a qual tem como princípio a produção de alimentos saudáveis, livres de agrotóxicos e fertilizantes prontamente solúveis. Atualmente, soluções de micro-organismos eficazes têm sido testadas e/ou utilizadas em diversos países, inclusive o Brasil, para o manejo de pragas, produção agrícola, tratamento de sementes, em instalações de animais com propósito de controlar maus odores, entre outros (OLIVEIRA, 2006; OTOTUMI; VENTURA; NEVES, 2001; RICHTER et al., 2009).

A seguir, encontram-se descritas as principais atividades desenvolvidas nessa etapa do trabalho.

2.3.1 Consórcio comercial KMA: preparo do inóculo

O consórcio KMA foi cedido em frasco plástico de 5 litros. O mesmo foi mantido sob refrigeração de 4 ^{o}C até o uso.

Para ser inoculado no solo, o consórcio comercial KMA foi, primeiramente, enriquecido com o objetivo de estimular o crescimento microbiano. No procedimento de enriquecimento, 100 mL do consórcio foram adicionados em um frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL do meio de cultivo, previamente esterilizado em autoclave Quimis modelo Q 290-I2, a 121º C por 15 min, e cuja composição encontra-se apresentada na Tabela 5. O sistema foi mantido sob agitação de 150 min^{-1}, em *shaker* marca Quimis modelo Q 816M20, à temperatura de 30 ºC ± 1 ºC, por 72 h, antes da sua inoculação ao solo (ANDRADE, 2008; LIMA, 2004).

Tabela 5 – Composição do meio de cultivo usado na ativação do consórcio KMA.

Sais	**Concentração (g L^{-1})**
Melaço	10,0
NaCl	5,0
K_2HPO_4	1,0
$NH_4H_2PO_4$	1,0
$(NH_4)_2SO_4$	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,2
pH = 7,0 ± 0,2*	

(*) = Ajustado com solução de ácido clorídrico (HCl) 1 mol L^{-1} e/ou solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L^{-1}.

A composição do meio mineral líquido utilizado seguiu as mesmas especificações adotadas por Lima (2004), Pereira (2006) e Pereira (2008) para o enriquecimento de micro-organismos degradadores de petróleo, com exceção do melaço como fonte de carbono, que foi utilizado neste experimento, seguindo recomendações da própria Empresa Korin, fabricante do consórcio. Ressalta-se que, previamente ao preparo do inóculo, foi realizada uma avaliação preliminar da capacidade de crescimento do consórcio no meio de cultivo adotado. Essa avaliação foi realizada sob as mesmas condições supracitadas, adotando-se concentrações diferenciadas de meio e inóculo. O crescimento microbiano foi observado pela turvação do meio de cultivo e quantificado de acordo com a metodologia descrita na *seção 2.6.5*. Os resultados dessa avaliação preliminar encontram-se no *Apêndice A*.

2.3.2 Montagem dos microcosmos: tratamentos adotados

Para avaliar o efeito do bioaumento com o consórcio comercial KMA, diferentes tratamentos foram adotados, baseados nos experimentos desenvolvidos por Bento et al (2005), Chagas-Spinelli (2007) e Trindade (2002), com algumas modificações. Esses tratamentos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Tratamentos utilizados nos ensaios de biodegradação com consórcio comercial KMA.

Tratamento	Caracterização	Contaminante	Estratégia de biorremediação
PA	Controle abiótico Avaliar o efeito de processos abióticos (volatilização, por exemplo) na eventual remoção do contaminante Solo com AJ_{pH} e esterilizado termicamente + C + AJ_U + A_{er}	diesel B5	-
BE_1	Avaliar a habilidade da microbiota nativa do solo em remover o contaminante nas seguintes condições: Solo com AJ_{pH} + C + AJ_U + A_{er}	diesel B5	Bioestímulo
BE_2	Avaliar a habilidade da microbiota nativa do solo em remover o contaminante nas seguintes condições: Solo com AJ_{pH} + C + AJ_U + AJ_n + A_{er}	diesel B5	Bioestímulo
BAD	Avaliar o efeito da adição do consórcio KMA na biodegradação, nas seguintes condições: Solo com AJ_{pH} + C + AJ_U + AJ_n + ADC_{ons} + A_{er}	diesel puro	Bioaumento + Bioestímulo
BAM	Avaliar o efeito da adição do consórcio KMA na biodegradação, nas seguintes condições: Solo com AJ_{pH} + C + AJ_U + AJ_n + ADC_{ons} + A_{er}	diesel B5	Bioaumento + Bioestímulo

Nota: = AJ_{pH} = ajuste de pH; C = contaminante; AJ_U = ajuste de umidade; AJ_n = ajuste de nutrientes; A_{er} = aeração; ADC_{ons} = adição do consórcio microbiano.

O tratamento codificado como BAD foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da presença do biodisel na remoção dos hidrocarbonetos de petróleo associado ao bioaumento com consórcio comercial KMA. Por limitações tanto técnicas quanto financeiras, tal avaliação foi conduzida somente para a combinação do bioaumento em conjunto com o bioestímulo.

De modo a não comprometer a atividade microbiana, o pH do solo *in natura* foi ajustado para um valor próximo da neutralidade (7,0) e dentro da faixa de 6,5 a 8,5, considerada adequada à atividade da maioria dos micro-organismos (SARKAR et al., 2005). Tal ajuste foi realizado para a massa total de solo necessária à condução de todos os

tratamentos através da adição de hidróxido de cálcio $Ca(OH)_2$, seguindo a metodologia descrita na *seção 2.6.2*. O mesmo foi efetuado três dias antes do início dos ensaios de biodegradação para garantir a total neutralização do solo.

Para investigar a eventual remoção do contaminante por fatores abióticos, uma alíquota do solo com pH ajustado foi esterilizada termicamente de modo a servir como controle de tais processos (PA). O solo em questão foi esterilizado três vezes em autoclave (Q 290-I2), em temperatura de 121 ºC, por 30-60 min, três dias consecutivos (BENTO et al., 2005; MOLINA-BARAHONA et al., 2004; VINÃS et al., 2005). Após a última esterilização e antes do início dos ensaios, uma amostra do solo estéril foi retirada para análise do teor de umidade, de forma asséptica e em câmara de fluxo laminar Pachane modelo PCR-T2,5 CB.

Com o pH do solo ajustado e o inóculo ativado, prosseguiu-se a montagem dos microcosmos de bancada (Figura 10). Como microcosmos foram utilizados recipientes redondos de vidro de 18,3 x 8,4 cm, com capacidade de 1,2 L. Esses recipientes foram previamente esterilizados em autoclave (Q 290-I2), a 121º C por 15 min. Cada tratamento (Tabela 6) foi conduzido em duplicata, totalizando 10 microcosmos.

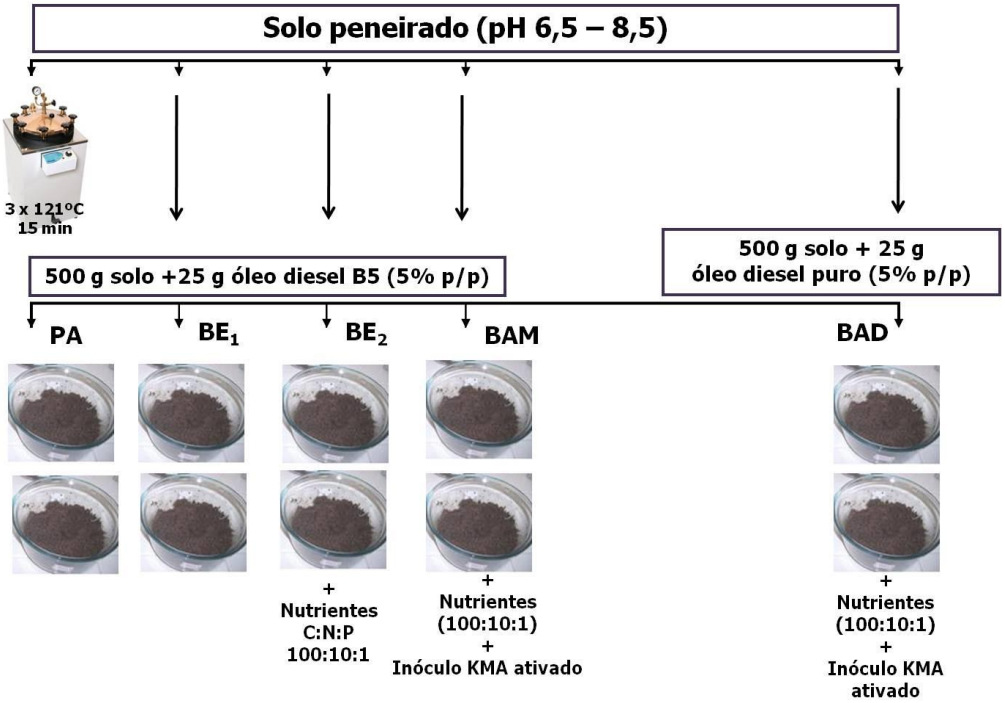


Figura 10 – Representação esquemática da montagem dos microcosmos de bancada.

Cada microcosmo recebeu 500 g de solo e 25 g (30 mL) de óleo diesel B5, o que correspondeu a um percentual de contaminação de 5% (p/p). Tal percentual foi escolhido com base em um conjunto de estudos laboratoriais observados na literatura com esse petroderivado

(MATHEW et al., 2006; MOLINA-BARAHONA et al., 2004; TRINDADE, 2002). No tratamento BAD o óleo diesel B5 foi substituído por diesel puro, na mesma proporção. Para contaminação, o solo foi pesado, previamente, em recipiente de alumínio e o contaminante em bécher de vidro. A homogeneização foi realizada misturando-se manualmente o contaminante ao solo.

Posteriormente à contaminação do solo e sua distribuição nos microcosmos (recipientes de vidro), foram realizados os procedimentos de ajuste de umidade, adição de nutrientes e adição do inóculo comercial KMA ativado.

O ajuste de umidade foi efetuado em todos os tratamentos. O mesmo foi realizado para alcançar aproximadamente 50% da capacidade de campo, valor que se encontra dentro da faixa ótima de umidade recomendada na literatura (ABNT, 1999; LIMA, 2004; TRINDADE, 2002). Esse ajuste, no entanto, obedeceu às seguintes condições: (i) nos tratamentos PA e BE_1 o ajuste foi realizado somente pela adição de água destilada estéril; (ii) no tratamento BE_2 pela adição apenas de solução nutriente estéril; (iii) nos tratamentos BAM e BAD pela adição de solução nutriente estéril e inóculo KMA ativado (suspensão celular).

O volume total de água (solução nutriente e/ou inóculo) para ajuste da umidade em 50% da capacidade de campo foi calculado a partir da Equação 1:

$$m\ água_{ajuste} = m\ água_{50\%CC} - m\ água_{umidade} \quad (1)$$

Onde,

$m\ água_{ajuste}$ = massa de água necessária para o ajuste;

$m\ água_{50\%CC}$ = massa de água correspondente a 50% da capacidade de campo do solo;

$m\ água_{umidade}$ = massa de água correspondente ao teor de umidade do solo, determinada, previamente, a contaminação do solo.

A adição de nutrientes foi realizada nos tratamentos BE_2, BAD e BAM, através de uma solução aquosa contendo sais dissolvidos de $(NH_4)_2SO_4$ e K_2HPO_4, como fontes de nitrogênio (N) e fósforo (P), respectivamente (BENTO et al., 2005). A quantidade desses nutrientes a ser adicionada foi calculada a partir dos teores dos mesmos existentes no solo *in natura* e da relação nutricional C:N:P após contaminação, de modo que esta fosse ajustada para a relação de 100:10:1 (MOLINA-BARAHONA et al., 2004; PALA, 2004). Como não foi possível determinar o teor de carbono orgânico total do solo imediatamente após a sua contaminação com óleo diesel B5, para efeito de cálculo, a massa aproximada de carbono

orgânico proveniente do contaminante foi calculada através da Equação 2, conforme procedimento adotado por Chagas-Spinelli 2007.

$$mC_{aprox} = d_{diesel} \times V_{diesel} \quad (2)$$

Onde:

mC_{aprox} = massa aproximada de carbono na amostra de diesel B5 (g);

d_{diesel} = densidade da amostra de diesel utilizada (g mL^{-1});

V_{diesel} = volume de diesel utilizado na contaminação (mL).

Assim como o teor de carbono orgânico, não foi possível analisar os teores de N e P logo após contaminação. Desta forma, para o cálculo da relação C:N:P do solo após sua contaminação, os teores desses elementos foram considerados os mesmos do solo *in natura,* baseado no fato de que não foram observadas alterações dos mesmos em uma série de caracterizações químicas de solo reportadas na literatura, antes e após contaminação por petroderivados (CHAGAS-SPINELLI, 2007; PALA, 2004; TRINDADE, 2002).

Os tratamentos BE_2, BAD e BAM foram, portanto, bioestimulados pela adição de 4830 mg kg^{-1} de $(NH_4)_2SO_4$ e 464 mg kg^{-1} de K_2HPO_4. No tratamento BE_2 a adição da solução nutriente foi efetuada uma única vez no início do experimento (dia da montagem). Já nos tratamentos BAD e BAM o volume total da solução foi fracionado ao meio e adicionado em duas etapas. A primeira no início do experimento e a segunda cinco dias após. Tal procedimento foi necessário para evitar excesso de umidade, pois se observou que, após a contaminação e a adição do inóculo microbiano, realizados previamente, o solo se encontrava bastante úmido.

A adição do inóculo KMA nos tratamentos BAD e BAM foi efetuada apenas no início do experimento. Uma alíquota de 20 mL do consórcio ativado, de concentração igual a $2{,}64 \times 10^9$ UFC mL^{-1}, foi adicionada aos mesmos. Essa concentração correspondeu ao número total de colônias enumeradas pelo o método de plaqueamento descrito na *seção 2.6.5*.

2.3.3 Monitoramento dos tratamentos

O experimento foi conduzido por 63 dias, em uma sala com temperatura entre 25-30 ºC, e ambiente aeróbio, através do revolvimento do solo três vezes por semana (BENTO et al., 2005). Tal revolvimento foi realizado com o auxílio de uma pequena colher

de alumínio estéril. O solo de cada sistema também era umedecido periodicamente com água destilada estéril para manter um teor de água no solo. A adição, no entanto, foi baseada em controle visual, utilizando-se amostra seca do solo de estudo como referência (TRINDADE, 2002). Durante todo o experimento, os microcosmos foram mantidos cobertos com uma folha de alumínio para minimizar contaminações externas, principalmente, microbiológicas (BENTO et al., 2005).

Para monitoramente dos tratamentos, amostras compostas de solo de cada microcosmo foram coletadas ao longo de 10 semanas, nos intervalos de 0, 7, 14, 28, 42 e 63 dias. A escolha desses intervalos de amostragem teve como base os trabalhos de Bento et al (2005) e Chagas-Spinelli (2007). As amostras compostas consistiram em uma mistura de cinco subamostras retiradas de pontos distintos do microcosmo. Antes de cada amostragem, o solo era revolvido com colher estéril para remover eventuais torrões e aumentar a homogeneidade. Cabe ressaltar que a amostragem correspondente ao instante zero (0), para todos os tratamentos, foi executada imediatamente após a contaminação do solo e a introdução dos aditivos (solução nutriente, inóculo e/ou água estéril), conforme procedimento adotado por Sarkar et al (2005).

A partir das amostras compostas de cada microcosmo e em todos os intervalos de amostragem mencionados, realizou-se as análises dos hidrocarbonetos de petróleo e da população microbiana heterotrófica total. O teor de carbono orgânico total também foi avaliado, porém, somente no início e final do experimento (63 dias).

Na análise dos hidrocarbonetos de petróleo os compostos alvos foram os n-alcanos na faixa de C_{10}-C_{36} e alguns outros compostos isoprenóides como o pristano (2,6,10,14 – tetrametilpentadecano) e o fitano (2,6,10,14 – tetrametilhexadecano), que, geralmente, apresenta uma resolução satisfatória nos perfis cromatográficos de óleo diesel (MARCHAL et al., 2003). O processo de extração dos hidrocarbonetos do solo foi realizado no LABIFI de acordo com o procedimento descrito *na seção 2.6.6* e a quantificação dos mesmos foi realizada pelo Laboratório Analytical Solutions - RJ, segundo metodologia U.S.EPA 8015. As condições analíticas estão descritas na *seção 2.6.7.* A análise do carbono orgânico total foi realizada pelo CENPES, através do método de combustão com detecção por infravermelho, segundo norma de referência da Sociedade Americana para Testes e Materiais ASTM D 4239 e metodologia U.S.EPA NCE-C-1282, ambas com adaptações. A quantificação da população microbiana heterotrófica total foi realizada no LABIFI (*seção 2.6.5*).

2.3.4 Tratamento estatístico dos dados experimentais

A avaliação estatística dos resultados referentes à quantificação microbiana e hidrocarbonetos foi realizada por análise de variância e as médias comparadas pelo teste de *Tukey*, adotando-se um nível de significância de 95% ($p<0,05$). Para tal, foi i utilizado o software SPSS versão 16®. Os dados referentes ao COT foram analisados pelo Teste-*t*.

2.4 Ensaios de biodegradação em respirômetros de Bartha

Esse 2º experimento foi realizado no período de novembro a dezembro de 2009, e teve por objetivo avaliar a atividade microbiana aeróbia através do teste respirométrico de Bartha, padronizado pela norma brasileira NBR 14283 (ABNT, 1999), como parâmetro indicador da biodegradação do óleo diesel B5 no solo, em diferentes condições de bioaumento. Tal teste, adaptado de uma norma holandesa, tem se mostrado bastante útil não só na quantificação da atividade microbiana do solo, como também na biodegradação de contaminantes orgânicos presentes no mesmo (ANDREO, 1999; BALBA; AL-AWADHI; AL-DAHER, 1998).

Nos ensaios respirométricos foi utilizado novamente o consórcio comercial KMA e uma cultura microbiana designada de RES, obtida a partir do solo coletado em um posto de revenda de combustível, com histórico de contaminação por vazamentos nos tanques de armazenamento.

Nesse experimento, diferentemente do anterior, que apenas promoveu o enriquecimento prévio do consórcio comercial, tanto o consórcio KMA quanto a cultura microbiana RES foram previamente aclimatados a concentrações crescentes de óleo diesel B5, objetivando estimular os micro-organismos com potencial de utilização desse contaminante como fonte de carbono.

A seguir, encontram-se descritas as principais atividades desenvolvidas nessa etapa do trabalho.

2.4.1 Obtenção da cultura microbiana RES

A cultura microbiana designada no estudo de RES foi obtida de uma amostra de solo coletada em um posto de revenda de combustíveis, localizado no bairro Manejo, Município de

Resende, Km 293 da Rodovia Presidente Dutra. A escolha e o local da coleta foram realizados pela Prof[a]. Dr[a]. Denise Celeste Godoy de Andrade Rodrigues, da FAT, UERJ- Resende. Tal posto encontrava-se em reforma depois de cerca de 2 anos de interdição, por problemas de vazamento dos tanques de armazenamento. Parte do solo do local havia sido escavada para remoção desses tanques, fato que facilitou o acesso e o processo de amostragem. O local foi escolhido em função da probabilidade de estar contaminado por combustíveis e, portanto, constituir-se em uma fonte potencial de micro-organismos degradadores de derivados de petróleo, uma vez que populações microbianas podem adaptar-se à presença do contaminante e sobreviver por meio de sua transformação ou degradação (PEIXOTO; ROSADO; TAKETANI, 2008; TAPAJÓS, 2008).

A coleta foi realizada com o auxílio de uma pá e consistiu na retirada de várias pequenas subamostras de solo, de diferentes pontos, nos primeiros 5-10 cm até 4 m de profundidade do local onde o solo havia sido removido. As várias amostras formam colocadas em um mesmo saco plástico limpo, dando origem a uma amostra composta de cerca de 3 kg, que foi transportada para o LABIFI, seca ao ar e peneirada em malha de 2 mm de abertura (peneira Granutest ABNT 10; Tyler 9). O solo peneirado foi então dividido em duas partes. A primeira foi destinada a análise do pH, dos hidrocarbonetos de petróleo e quantificação dos micro-organismos heterotróficos totais. A segunda foi armazenada sob refrigeração de 4 ºC até preparo da cultura (inóculo) (MELO; AZEVEDO, 2008). A análise de HTP foi realizada no CENPES através da extração por solvente acelerado e quantificação do extrato por gravimetria. Os parâmetros pH e a quantificação microbiana foram realizados no LABIFI.

Diferentemente do experimento anterior que utilizou o meio descrito na Tabela 5, o meio mineral líquido utilizado no presente experimento foi o Bushnell-Hass (BH) composto por (g L^{-1}): $MgSO_4.7H_2O$ (0,2); $CaCl_2$ (0,02); K_2HPO_4 (1,0); KH_2PO_4 (1,0); NH_4NO_3 (1,0) e; $FeCl_3$ (0,05) (MARIANO, 2006). O mesmo foi acrescido de 10 g de melaço como fonte de carbono, e esterilizado em autoclave (Q 290-I2) a 121 ºC, por 15 minutos, antes do uso. Ressalta-se que antes da esterilização o meio teve o pH ajustado para 7,0 ± 0,2.

Previamente ao preparo do inóculo, o solo foi retirado da refrigeração e incubado à temperatura de 22-27 ^{o}C, ao abrigo da luz, por 7 dias. Após esse período foi realizada uma avaliação preliminar da capacidade microbiana de crescimento no meio de cultivo líquido BH. A extração dos micro-organismos foi realizada de acordo com o seguinte procedimento, adaptado de Pereira (2006): 100 g do solo foram adicionados em frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio mineral líquido BH acrescido de 10 g de melaço como fonte de carbono. A mistura foi mantida sob agitação em *shaker* (Q 816M20) a 150 min^{-1} e

temperatura de 30 ºC ± 1 ºC, por 4 dias. Após esse período, o crescimento microbiano foi observado pela turvação do meio de cultivo comparado ao frasco controle contendo mesmo meio, sem a amostra de solo. Conjuntamente, foi realizada a quantificação da população microbiana heterotrófica, conforme metodologia descrita na *seção 2.6.5*. Os resultados dessa avaliação preliminar encontram-se no *Apêndice B.*

2.4.2 Consórcio comercial KMA

Para esse experimento uma cultura mais recente do mesmo consórcio comercial KMA foi obtida junto à Empresa Korin. Uma avaliação preliminar da capacidade microbiana de crescimento dessa cultura foi realizada sob mesmas condições descritas na *seção 2.4.1*, utilizada para a cultura RES. Isso porque, nessa etapa, optou-se em trabalhar com o meio mineral BH, tendo-se observado que o mesmo é um dos mais adotados na literatura em estudos de enriquecimento microbiano (MARIANO, 2006, 2008; PIRÔLLO, 2006; TOMASELLA, MARIANO, ANGELIS, 2009). Contudo, manteve-se a mesma fonte de carbono. Os resultados dessa avaliação preliminar encontram-se no *Apêndice B.*

2.4.3 Aclimatação do consórcio comercial KMA e da cultura microbiana RES

Primeiramente, fez-se a extração da cultura microbiana RES do solo em meio líquido BH acrescido de melaço, conforme procedimento descrito na seção *2.4.1*. Ao final desse processo, seguiu-se a aclimatação da cultura microbiana RES e do consórcio comercial KMA, conforme ilustrado na Figura 11. Ressalta-se que para aclimatação do consórcio comercial KMA, foi utilizado no sistema inicial (1) 100 mL do consórcio, ou seja, da suspensão microbiana como é comercializada.

Em câmara de fluxo laminar (Pachane TPCR-T2,5 CB), uma alíquota de 20 mL da suspensão microbiana do meio de extração (1) foi transferida para outro frasco Erlenmeyer (2), contendo 200 mL do meio mineral líquido BH, porém sem melaço, que foi substituído por 1% (v/v) de óleo diesel B5 como fonte de carbono. Essa nova mistura foi mantida sob agitação em *shaker* (Q 816M20) a 150 min^{-1}, temperatura de 30 ºC ± 1 ºC, por 4 dias, quando, uma alíquota de 20 mL foi retirada e transferida para outro frasco Erlenmeyer contendo meio

mineral líquido BH acrescido de 2% (v/v) de óleo diesel B5 (3). Nova incubação, nas mesmas condições, foi conduzida.

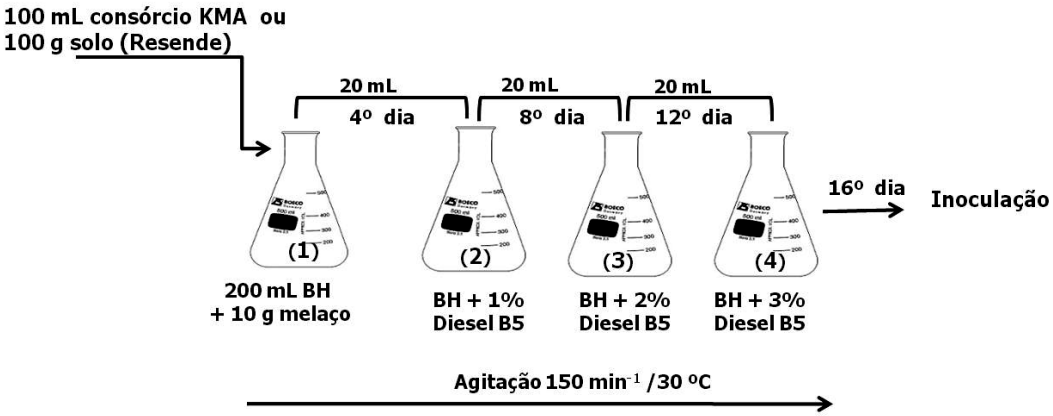


Figura 11 - Processo de aclimatação do consórcio KMA e da cultura microbiana RES.

O procedimento foi repetido depois de 4 dias de incubação para a concentração de 3% (v/v) de óleo diesel B5 (4). Ao final deste processo (16º dia), uma alíquota da suspensão microbiana aclimatada (4) foi utilizada nos ensaios de bioaumento. A substituição do melaço por concentrações variáveis de diesel B5 teve por objetivo não só estimular os micro-organismos com potencial de utilização desse contaminante como fonte de nutrientes, dando-lhes uma vantagem seletiva em detrimento aos demais, mas também torná-los menos vulneráveis aos efeitos tóxicos do contaminante nos ensaios de biorremediação subsequentes.

De modo a avaliar a atividade do consórcio KMA sem prévia aclimatação, um procedimento apenas de enriquecimento, nas mesmas condições supracitadas, também foi conduzido. No entanto, nos sistemas de cultivo (Erlenmeyers) 2, 3 e 4, o óleo diesel B5 foi substituído por melaço.

Todo o material e vidraria utilizados nos processos de extração e aclimatação, assim como o meio mineral líquido BH, sem óleo diesel B5, foram previamente esterilizados em autoclave (Q 290-I2) a 121º C por 15 minutos.

2.4.4 Descrição dos respirômetros de Bartha

No presente estudo foram utilizados respirômetros de Bartha preconizados pela norma NBR 14283 (ABNT, 1999) com algumas adaptações, e construídos especialmente por uma empresa especializada em vidrarias. Tais respirômetros consistem em um sistema fechado, com duas câmaras interligadas, conforme Figuras 12 e 13.

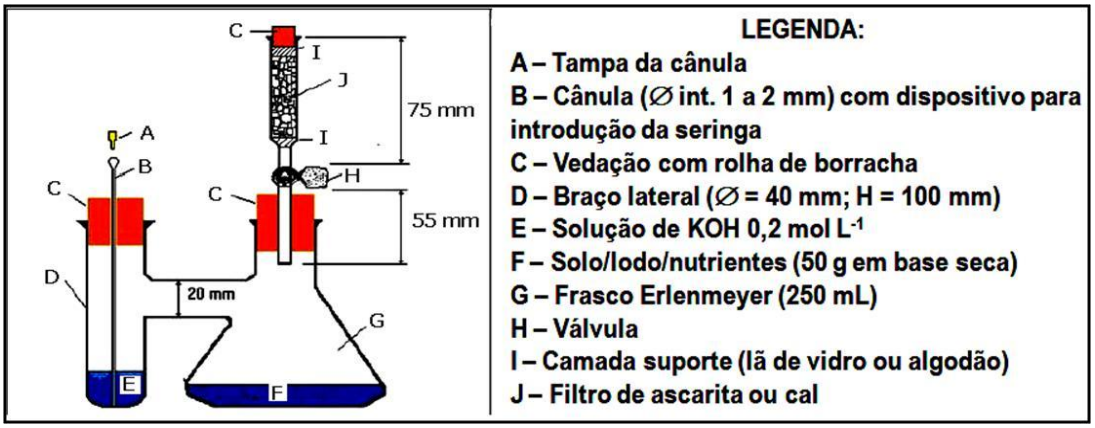


Figura 12 - Esquema do respirômetro de Bartha preconizado na NBR 14283. Fonte: Adaptado da ABNT (1999).

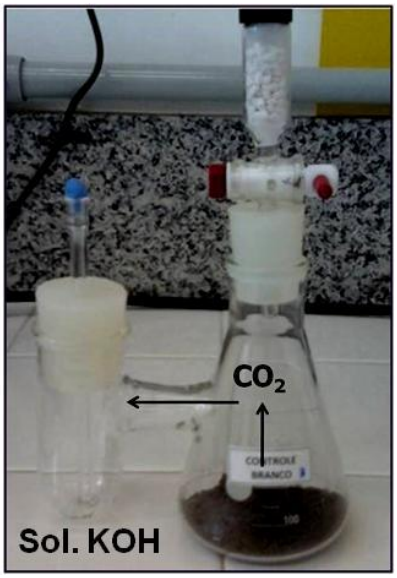


Figura 13 - Respirômetro de Bartha utilizado no experimento de biodegradação.

O princípio da metodologia adotada baseia-se na captura e quantificação do CO_2 gerado durante o processo de respiração aeróbia. O gás produzido na câmara principal onde se encontra a amostra de solo (Figura 12 - Letra G) é dissolvido em uma solução alcalina, geralmente de hidróxido de potássio (KOH) ou de sódio (NaOH), colocada na câmara secundária (Figura 12 Letra D), a qual se encontra interligada a câmara principal. A quantificação do CO_2 é feita em instantes de tempo regulares, através da titulação da alcalinidade residual da solução de KOH (ou NaOH) com uma solução de ácido clorídrico (HCl), na presença de cloreto de bário ($BaCl_2$). Uma vez que a respiração representa a oxidação da matéria orgânica pelos micro-organismos aeróbios presentes no solo, pode-se estimar, através da evolução do CO_2, a quantidade de carbono biodegradado durante o processo de mineralização do contaminante (ANDREO, 1999; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

2.4.5 Montagem dos respirômetros: tratamentos adotados

Foram montados 6 sistemas de tratamento, em triplicata, para cada uma das condições experimentais descritas na Tabela 7, totalizando ao final, 18 respirômetros.

Tabela 7 – Descrição das condições experimentais adotadas nos ensaios respiromêtricos de Bartha.

Respirômetro	Tratamento	Condição experimental
CB	-	Respirômetro controle Solo com AJ_{pH} + AJ_U (sem contaminação)
PA	Controle de processos abióticos	Solo com AJ_{pH} e esterilizado quimicamente com azida sódica + C + AJ_U
ATN	Atenuação natural	Solo sem AJ_{pH} + C + AJ_U
BKNA	Bioaumento com consórcio comercial KMA não aclimatado	Solo com AJ_{pH} + C + KNA + AJ_U
BKA	Bioaumento com consórcio comercial KMA aclimatado	Solo com AJ_{pH} + C + KA + AJ_U
BRES	Bioaumento com cultura microbiana RES aclimatada	Solo com AJ_{pH} + C + RES + AJ_U

Nota: = AJ_{pH} = ajuste de pH; C = contaminante – óleo diesel B5; AJ_U = ajuste de umidade; KNA = adição do consórcio comercial KMA não aclimatado; KA = adição do consórcio comercial KMA aclimatado; RES = adição da cultura microbiana RES aclimatada.

O tratamento codificado como ATN foi denominado de atenuação natural, apesar de ter sido realizado o ajuste de umidade do solo, procedimento não característico dessa estratégia. No entanto, a denominação adotada também foi utilizada por Bento et al (2005), em seu estudo quanto a biorremediação de solo contaminado com óleo diesel por atenuação natural, bioestímulo e bioaumento.

Como no experimento anterior, o pH do solo *in natura* foi ajustado apara um valor próximo da neutralidade e dentro da faixa de 6,5 a 8,5. Somente o solo usado no tratamento ATN não teve o pH ajustado.

Com o pH ajustado e as culturas microbianas aclimatadas e/ou enriquecidas, procedeu-se a contaminação do solo e a montagem dos respirômetros, conforme ilustrado na Figura 14. A contaminação foi realizada para a massa total de solo necessária a todos os respirômetros,

com exceção dos respirômetros controle CB e ATN (Tabela 7). A mesma foi simulada conforme experimento anterior: adição de 5% (p/p) de óleo diesel B5 ao solo.

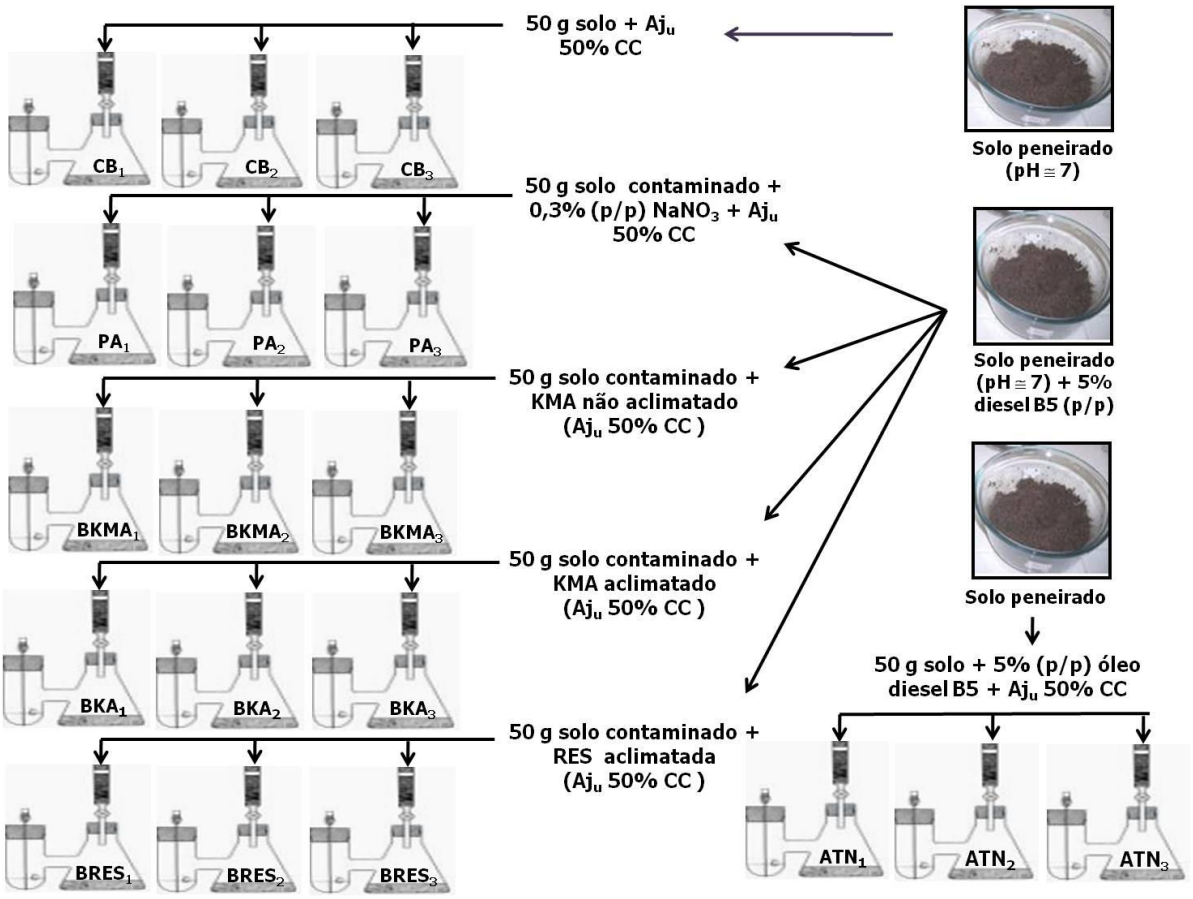


Figura 14 - Representação esquemática da montagem dos respirômetros de Bartha.

Diferentemente do experimento anterior, para avaliação da remoção do contaminante por processos abióticos (PA), optou-se pela inibição da atividade microbiana do solo pela adição de 0,3% (p/p) de azida sódica ($NaNO_3$), conforme procedimento adotado por Aguiar (2006). Isso porque, a esterilização térmica, além de não se mostrar muito eficaz, também pode alterar a estrutura do solo (MELLO et al., 2007; TREVORS, 1996).

A partir da massa total de solo contaminada foram separadas quatro alíquotas para simulação das diferentes condições experimentais (Tabela 7), através dos procedimentos de ajuste de umidade e adição dos inóculos microbianos.

O ajuste de umidade inicial foi conduzido em todas as condições experimentais para 50% da capacidade de campo. Nos tratamentos CB, PA e ATN, onde não foi realizada a adição dos inóculos microbianos, a umidade foi corrigida com água destilada estéril (121 ºC por 15 minutos). Já nos tratamentos BKNA, BKA e BRES, a umidade foi corrigida pela

adição dos próprios inóculos correspondentes (suspensão celular), identificados na Tabela 7. O volume total de água (ou inóculo) a ser adicionado foi calculado seguindo o mesmo procedimento do experimento anterior (*seção 2.3.2*, Equação 1). A capacidade de campo do solo foi analisada por uma metodologia diferente daquela usada no primeiro experimento. A mesma encontra-se descrita na *seção 2.6.4.2*.

A adição dos inóculos nos tratamentos BKNA, BKA e BRES foi realizada apenas no início do experimento. De modo que tais tratamentos recebessem a mesma densidade microbiana, os inóculos KNA, KA e RES foram, previamente, ajustados para o mesmo valor de densidade ótica (D.O = 0,169) ao final do processo de aclimatação. Tal ajuste foi efetuado para as duas culturas com maior valor de D.O, por diluição com água destilada estéril (121 ºC por 15 minutos). A densidade ótica foi estimada por leitura espectrofotométrica a 610 nm, utilizando-se espectrofotômetro HACH modelo DR 2000 (MARIANO, 2006).

Nesse experimento, optou-se por não bioestimular o solo, após sua contaminação, pela adição de nutrientes (N e P).

A montagem de cada respirômetro foi iniciada pela adição de uma alíquota de 50 g do solo contaminado acrescido dos respectivos aditivos (água e/ou inóculo). Em seguida, procedeu-se a preparação do sistema de absorção de CO_2 que consistiu na adição de 10,0 mL de uma solução de KOH 0,2 mol L^{-1} no braço lateral do respirômetro (Figura 12 – Letra D) (ABNT, 1999).

2.4.6 Monitoramento dos ensaios respirométricos

Os respirômetros foram incubados em incubadora Tecnal modelo TE-401, no escuro, a temperatura de 28º C ± 2º C. O experimento foi conduzido por 29 dias e a quantidade de CO_2 produzida em cada respirômetro determinada em intervalos de 24 horas, pelo método titulométrico preconizado na NBR 14283 (ABNT, 1999), descrito na seção *2.6.*8. A cada intervalo de 24 horas, durante o procedimento de titulação, o filtro de ascarita ou cal soldada (Figura 12 – Letra J), permanecia aberto por cerca de 3 minutos para aeração do sistema.

A partir da produção diária de CO_2, acumulada ao longo dos 29 dias de experimento, estimou-se a quantidade total de carbono biodegradado em cada tratamento, assim como a eficiência da biodegradação dos mesmos. Os cálculos para tais determinações encontram-se descritos, respectivamente, nas seções: *2.6.10* e *2.6.11*.

No início e no final dos ensaios respirométricos, amostras de solo de cada condição experimental foram retiradas para a realização das análises dos seguintes parâmetros: pH, umidade, hidrocarbonetos de petróleo e população microbiana heterotrófica total. O teor de carbono orgânico total também foi avaliado, porém, apenas no início do experimento para estimativa da eficiência de biodegradação medida pela evolução de CO_2, conforme procedimento descrito na *seção 2.6.11*.

Igualmente ao experimento anterior, a população microbiana heterotrófica total, o pH e a umidade foram determinados no LABIFI, assim como o processo de extração dos hidrocarbonetos das amostras de solo. A quantificação dos hidrocarbonetos foi realizada pelo laboratório Analytical Solutions-RJ. As análises do carbono orgânico total foram realizadas pelo CENPES.

Ressalta-se que as amostras de solo para caracterização inicial dos parâmetros supracitados foram retiradas da massa total de solo contaminado acrescida dos aditivos, necessária a montagem de todos os respirômetros submetidos à mesma condição experimental, enquanto que para a caracterização final foram analisadas amostras de solo de cada uma das réplicas de respirômetro-ensaio (ou controle). Entretanto, para a quantificação microbiana heterotrófica total, os solos contidos nas réplicas foram misturados previamente à realização da análise.

2.4.7 Tratamento estatístico dos dados experimentais

Procedeu-se a análise estatística dos dados respirométricos através da metodologia de reamostragem *Bootstrap*, na sua versão não-paramétrica, ou seja, assumindo a distribuição uniforme na geração das amostras "*bootstrap*". O objetivo da aplicação deste método no presente trabalho está na geração de intervalos de confiança para as médias acumuladas de CO_2 em função do tempo, nos diferentes tratamentos, conforme procedimento descrito a seguir.

Para cada tratamento e amostra em triplicata (produção de CO_2), obtida a cada dia do experimento, foram geradas 500 amostras aleatórias simples com reposição (amostras *bootstrap*). Em seguida, para cada uma dessas 500 amostras foi calculada a média aritmética, de modo a obter a distribuições das médias de CO_2 nos instantes de tempo considerados. A distribuição das médias acumuladas, em um determinado tratamento, por sua vez, foi obtida com base no somatório das médias de cada amostra *bootstrap*. Os intervalos de confiança

bilaterais considerados foram de 95%, obtidos com base na observação dos percentis da distribuição acumulada até o instante de tempo de interesse.

A escolha do método deveu-se ao menor número de restrições teóricas para avaliação das somas acumuladas das médias, tal como a dependência temporal entre as diferentes estimativas. Pela metodologia *bootstrap*, este fator é considerado de maneira simples, através da simulação de grande número de possibilidades distintas (SILVA JR, 2005). O procedimento de reamostragem *Bootstrap* foi implementado em linguagem VBA em uma planilha de Microsoft Excel® 2007.

2.5 Teste de biodegradabilidade: indicadores redox DCPIP e TTC

O potencial do consórcio comercial KMA, da cultura microbiana RES e da população nativa do próprio solo de estudo (Seropédica) em utilizar o óleo diesel B5, biodiesel de soja e diesel puro como únicas fontes de carbono foi verificado através da utilização de duas metodologias baseadas no uso dos indicadores redox: DCPIP e TTC. O princípio dessas metodologias baseia-se na ação desses indicadores como aceptores artificiais de elétrons provenientes da oxidação microbiana dos hidrocarbonetos. Ao serem incorporados no meio de cultura, esses indicadores são reduzidos, sendo possível averiguar o potencial dos micro-organismos em utilizar os hidrocarbonetos como substratos pela mudança de coloração do meio (Figura 15).

O DCPIP, no seu estado oxidado é um indicador de coloração azul. Quando reduzido torna-se incolor (MARIANO, 2006, 2008). Já o TTC é incolor no seu estado oxidado. Quando reduzido resulta na formação de uma substância de cor avermelhada, insolúvel e estável, denominada formazan, que é mantida dentro das células microbianas, tornando-as pigmentadas (avermelhadas) (DIAS; SILVA, 1998; HERNÁNDEZ et al.; 2008).

A metodologia de determinação do potencial de degradação utilizando DCPIP foi descrita inicialmente por Hanson, Desai e Desai (1993) para bactérias degradadoras de óleo cru. Porém, recentemente, a mesma tem sido bastante utilizada na avaliação e seleção de diferentes microorganismos degradadores de diesel e biodiesel (SOARES JR; MARIANO; ANGELIS, 2009; MARIANO, 2006; VAZ; VIEIRA, 2009).

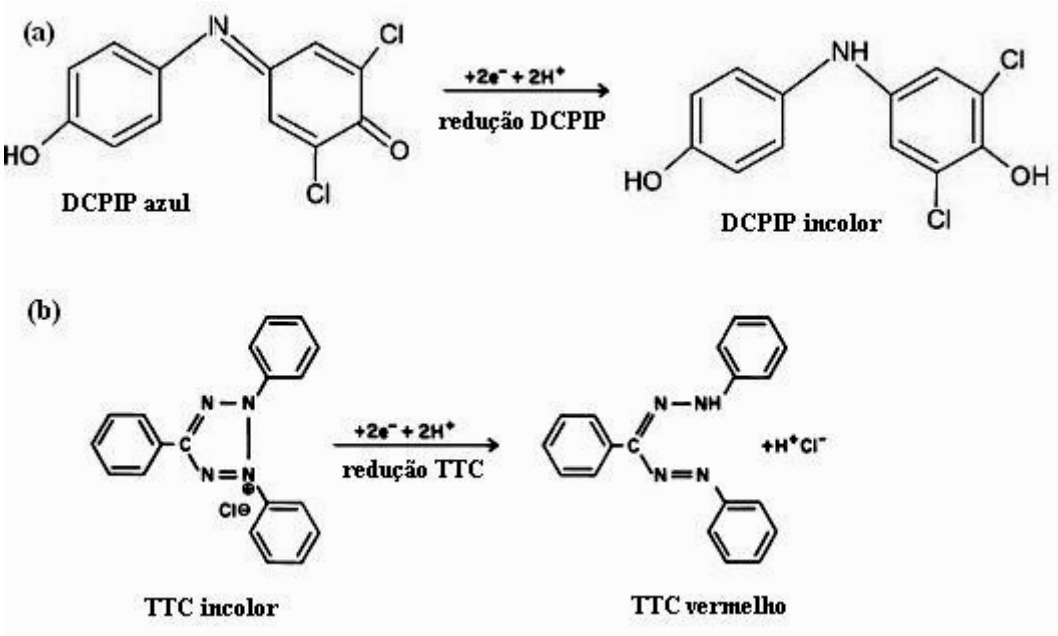


Figura 15 – Mudança da coloração dos indicadores durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos. (a) redução do DCPIP e (b) redução do TTC. Fonte: (a) Hollywood, Shadi e Goodacre (2009); (b) Bochner e Savageau (1977).

Já os testes com TTC, inicialmente empregados para verificação da capacidade de germinação de sementes, têm sido amplamente adaptados e utilizados na avaliação da atividade de enzimas desidrogenases em muitos sistemas enzimáticos, assim como na enumeração e seleção de microorganismos em meios de cultura (BELOTI et al., 1999; MACHADO, 2006; SANT´ANA; CONCEIÇÃO; AZEVEDO, 2002; ZONTA et al., 2008).

2.5.1 Preparo dos inóculos microbianos (culturas) para os testes de biodegradabilidade

O método de preparo dos inóculos para os testes de biodegradabilidade foi adaptado do experimento de Mariano (2006). O consórcio comercial KMA foi primeiramente estriado na superfície de 3 placas de Petri contendo meio Agar-melaço, cuja composição encontra-se descrita na *seção 2.6.5*. As placas de Petri foram incubadas em estufa microbiológica Tecnal modelo TE-392/I, durante 72 h, a 30 ºC ± 1 ºC. Após período de incubação, as células foram raspadas utilizando-se água estéril e alça de Drigalski, e transferidas para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio mineral BH. O frasco foi mantido sob agitação em *shaker* (Q 816M20) a 150 min^{-1} e 30 ºC ± 1 ºC, durante 72 h, antes do início dos testes. Para o preparo dos inóculos RES e da população nativa do solo de estudo, designada de EX, 10 g das respectivas amostras de solo, Resende e Seropédica, foram adicionados a frascos

Erlenmeyers contendo 100 mL do mesmo meio mineral (BH) e o sistema mantido sob as mesmas condições de temperatura e agitação do consórcio KMA.

Ressalta-se que o meio BH foi previamente esterilizado em autoclave (Q 290-I2) a 121º C por 15 min.

2.5.2 Condução e monitoramento dos testes

Os testes foram adaptados dos experimentos de Bento et al (2005) e VIEIRA et al (2007), e conduzidos em tubos de ensaio de 20 mL. Para o diesel puro e o biodiesel de soja, a capacidade degradadora foi avaliada apenas pelo uso do indicador TTC, em placas de acrílico tipo ELISA de 96 poços (≅ 3 mL). As condições experimentais adotadas estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Protocolo experimental dos testes de biodegradabilidade com óleo diesel B5, diesel puro e biodiesel de soja.

Condições experimentais	**Óleo diesel B5** **Tubo**	**Diesel puro e biodiesel** **Placa (poço)**
Meio mineral BH	2,5 mL	1,8 mL
Fonte de carbono*	0,1 mL	0,1 mL
Inóculo-teste	0,1 mL	0,1 mL
Temperatura de incubação	30 ºC ± 2 ºC	30 ºC ± 2 ºC

Nota: (*) = Óleo diesel B5, diesel puro ou biodiesel de soja.

O meio mineral BH foi previamente esterilizado em autoclave (Q 290-12) a 121 ºC por 15 min, sem contaminante e sem indicador. Ambos foram adicionados posteriormente ao meio, dentro de câmara de fluxo laminar (PCR-T2,5 CB), para evitar contaminações. A concentração do DCPIP e do TTC adicionada ao meio foi de 0,25 mg mL^{-1}. Foram preparadas três alíquotas de meio mineral BH: uma para os ensaios com DCPIP, outra para os ensaios com TTC e a terceira para o controle positivo contendo 0,1% (v/v) de glicose. Esta última, no entanto, foi esterilizada com a glicose.

Os inóculos RES, KMA e EX foram adicionados aos tubos (ou placas) já contendo o meio mineral acrescido do indicador e da fonte de carbono (óleo diesel B5, diesel puro ou biodisel de soja), nas proporções estabelecidas na Tabela 8. As concentrações respectivas

desses inóculos foram de: 2,65 x 10^7 UFC mL^{-1} (RES); 2,31 x 10^8 UFC mL^{-1} (KMA); 7,55 x 10^6 UFC mL^{-1} (EX).

Os testes em tubos foram conduzidos em triplicatas e os testes em placas em quadruplicatas, ou seja, foram inoculados 4 poços para cada inóculo-teste. Paralelamente, também foram conduzidos os seguintes controles (em duplicata):

- Controle positivo = meio mineral com 0,1% (v/v) de glicose + inóculo-teste + indicador;
- Controle negativo = meio mineral + inóculo-teste + indicador;
- Controle branco = meio mineral + indicador + contaminante (diesel B5, diesel puro ou biodiesel de soja), sem o inóculo;

O potencial degradador foi analisado de forma visual. As primeiras leituras foram realizadas após 24-48 h de incubação. As leituras subsequentes foram feitas após 5, 7, 10 e 14 dias de incubação (VAZ; VIEIRA, 2009). Resultado positivo quanto ao potencial degradador foi dado após esses intervalos de incubação, pela descoloração do DCPIP e/ou pela coloração do meio com TTC.

2.6 Metodologias analíticas

2.6.1 Limpeza das vidrarias

A vidraria utilizada nos ensaios microbiológicos e físico-químicos foi previamente lavada com detergente neutro para laboratório marca Vetec, rinsada com águas destilada e seca em estufa microprocessada Quimis modelo Q317-2M, a temperatura de 105 ºC. A vidraria de uso microbiológico, após secagem, foi esterilizada em autoclave (Q 290-I2), a temperatura de 121 ºC por 15 min. Já as vidrarias utilizadas para extração dos hidrocarbonetos foram previamente ambientadas com o solvente utilizado na extração. Para reuso, as mesmas foram deixadas imersas no detergente neutro por 24 h, rinsadas, posteriormente, com água destilada, álcool etílico marca Vetec, e secas em estufa (Q 317-2M) a 105 ºC por 24-48 h.

2.6.2 Verificação e ajuste de pH

Para verificação do pH do solo adotou-se a metodologia descrita na NBR 14283 (ABNT, 1999), na qual a medição é feita em extrato aquoso. Para tal, pesou-se em balança analítica GEHAKA modelo AG 200, 10 g ± 0,1 g do solo em um béquer de 50 mL. A este foram adicionados 25 mL de água destilada. O sistema solo + água foi agitado com bastão de vidro, por cerca de 15 min, e deixado em repouso por 1 h. A medição do pH foi realizada no líquido sobrenadante através de pH-metro Quimis modelo Q 400AS, previamente calibrado com soluções padrão de pH 4 e 7 (Quimis), e eletrodo combinado de vidro. O parâmetro foi analisado em duplicata.

Para o ajuste de pH do solo fez-se uma adaptação da metodologia descrita na NBR 14283 (ABNT, 1999) com a descrita por Lima (2004). O ajuste ocorreu através da construção de uma curva de neutralização. Para tal, em Erlenmeyers, foram pesados (em duplicata) 10 g ± 0,1 g do solo de estudo e adicionados, com precisão, as seguintes quantidades de $Ca(OH)_2$ marca Vetec para cada ponto da curva: 0 (controle); 50 mg; 100 mg; 150 mg; 300 mg e 500 mg. Cada sistema (Erlenmeyer) foi vigorosamente homogeneizado com bastão de vidro e deixado em repouso por 24 h. Em seguida, foram adicionados, a cada um deles, 50 mL de água destilada. Os sistemas foram mantidos sob agitação orbital de 150 min^{-1} em *shaker* (Q 816M20), por 1 h. Após agitação, os mesmos foram deixados em repouso por mais 1 h para posterior medição dos valores de pH. Seguidamente, foi efetuada a construção da curva de neutralização de pH x massa de $Ca(OH)_2$.

2.6.3 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade total foi determinado de acordo com o Manual de Métodos de Análises de Solo (EMBRAPA, 1997). Em uma cápsula de alumínio de peso conhecido, pesou-se cerca de 5 g do solo úmido, em balança analítica (AG 200). O conjunto cápsula + solo foi levado à estufa microprocessada (Q 317-2M) por 24 h, a 105 ºC. Após esse período, o conjunto foi colocado em dessecador por cerca de 30 minutos e, posteriormente, pesado. O procedimento de secar, colocar em dessecador e pesar foi repetido até obtenção de peso constante. A umidade foi calculada através da diferença de massa, conforme Equações 3 e 4:

$$\text{Massa de água} = \text{massa de solo úmido} - \text{massa de solo seco} \quad (3)$$

$$\text{Umidade (\%)} = (\text{massa de água} / \text{massa de solo úmido}) \times 100 \quad (4)$$

2.6.4 Capacidade de campo

2.6.4.1 Ensaios em microcosmos: 1º experimento

Adotou-se a metodologia descrita por Lima (2004), na qual 20 g de solo foram saturados com 100 g de água destilada, utilizando-se um sistema de filtração (funil + kitassato) de modo que o excesso de água fosse eliminado por gravidade. O sistema foi coberto e deixado em repouso por 24 h. O filtrado foi recolhido em uma proveta previamente pesada em balança analítica (AG 200). Em seguida, o solo e o filtrado foram novamente pesados e o percentual da capacidade de campo determinado pela Equação 5. O ensaio foi realizado em triplicata.

$$\text{Capacidade de campo (\%)} = \{[(100 - Wp) + Wi] / dwt\} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

Wp = Peso (g) da água percolada;

Wi = Peso (g) da água inicial presente no solo;

dwt = Peso (g) do solo seco.

2.6.4.2 Ensaios de respirometria: 2º experimento

Foi adotada a metodologia descrita por Chagas-Spinelli (2007) e Trindade (2002). Em uma proveta de 50 mL, de peso conhecido, pesou-se 50 g do solo de estudo úmido ($m_{solo\ úmido}$), suficiente para formar uma pequena coluna. Com o auxílio de um conta-gota foi adicionado ao solo da proveta água destilada, gota a gota, até que toda a coluna fosse percolada pela água, chegando ao fundo da proveta (condição de saturação). O sistema proveta + solo foi pesado ($m_{sistema\ saturado}$) e levado a secagem em estufa microprocessada (Q 317-2M) a 110 ºC, por 24 h. Ao término desse período, o sistema foi pesado ($m_{solo\ seco}$) e a

capacidade de campo determinada conforme Equações 6 e 7. O ensaio foi realizado em triplicata

$$\text{Massa}_{\text{água retida}} = m_{\text{sistema saturado}} - m_{\text{solo seco}} \quad (6)$$

$$\text{Capacidade de campo (\%)} = (\text{Massa}_{\text{água retida}} / m_{\text{solo úmido}}) \times 100 \quad (7)$$

2.6.5 Quantificação microbiana heterotrófica total

A quantificação da população microbiana heterotrófica total foi realizada pelo método de contagem padrão das unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de Petri. A metodologia consiste no plaqueamento de alíquotas da suspensão do solo diluída sucessivamente, seguido da incubação das placas em estufa e posterior contagem direta do número de colônias (MOREIRA, SIQUEIRA, 2006).

Para a extração dos micro-organismos do solo, 10 g deste foram pesados e adicionados em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de solução salina 0,9%. O frasco foi mantido sob agitação de 150 min^{-1} em *shaker* (Q 816M20), durante 1 h, a 30 ºC ± 1ºC, de acordo com os procedimentos adotados por Lima (2004) e Trindade (2002). Após agitação foram realizadas diluições decimais seriadas da suspensão do solo, na faixa de 10 a 10^8, conforme ilustrado na Figura 16.

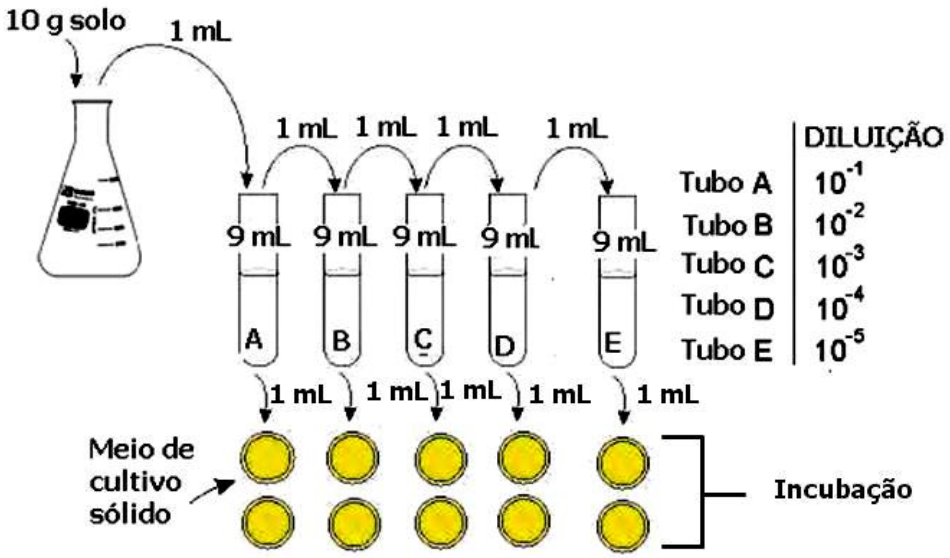


Figura 16 – Método das diluições seriais sucessivas para contagem microbiana.

A primeira diluição foi conduzida transferindo-se 1 mL da suspensão do solo (líquido sobrenadante) para um tubo contendo 9 mL de solução salina 0,9%. As demais diluições

foram conduzidas pela transferência de 1mL da diluição anterior para outro tubo contendo solução salina, e assim sucessivamente. A partir de diluições previamente escolhidas, prosseguiu-se o plaqueamento das mesmas em meio de cultivo orgânico sólido, denominado Agar-melaço (Tabela 9), através da técnica *pour plate*. Esse procedimento foi realizado adicionando-se 1mL da suspensão de cada diluição escolhida em placas de Petri, seguido da adição de aproximadamente 20 mL do meio orgânico, com homogeneização constante da placa. O mesmo foi realizado em duplicata.

Tabela 9 – Composição do meio Agar-melaço.

Componentes	**Concentração (g L^{-1})**
Melaço da cana-de-açúcar	10,0
Triptona	5,0
Extrato de levedo	2,5
Ágar-Ágar bacteriológico	15,0
pH = 7,0 ± 0,2	

Fonte: Pereira (2008).

Após solidificação do meio, as placas foram incubadas em estufa microbiológica (TE-392/I) a 30 ºC ± 1ºC, por 72 h. Ao término do período de incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias em cada placa de Petri, com o auxílio de um contador eletrônico de colônias Quimis modelo Q 2958. A contagem foi realizada segundo a metodologia do Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA, 2003), considerando-se o intervalo de precisão e repetibilidade de 30 a 300 colônias, ou seja, placas com contagem de 30 a 300 colônias. Os resultados foram expressos em UFC g^{-1} de solo. Brancos contendo apenas meio orgânico Agar-melaço foram utilizados para avaliar a esterilização do meio orgânico e materiais utilizados. As etapas de diluição e plaqueamento foram conduzidas na câmara de fluxo laminar para evitar contaminações externas durante todo o procedimento.

A composição do meio Ágar-melaço consistiu em uma modificação do meio TSA (*Tryptic Soy Agar*) usado por Pereira (2008). O TSA é um meio de cultura rico e não seletivo aplicado ao crescimento de vários micro-organismos heterotróficos.

Ressalta-se que todo material e vidraria utilizados nas análises microbiológicas, assim como o meio de cultura e a solução salina, foram previamente esterilizados em autoclave (Q 290-I2) a 121º C por 15 min, antes do uso.

2.6.6 Extração dos hidrocarbonetos de petróleo

A extração dos hidrocarbonetos das amostras de solo foi realizada de acordo com a metodologia U.S.EPA 3540 C. Foram pesados aproximadamente 10 g da amostra de solo em um béquer de vidro, com auxílio de uma balança analítica (AG 200). À amostra pesada, foram adicionados 10 g de sulfato de sódio anidro grau PA (Vetec), previamente calcinado em forno mufla marca Digmec modelo CH1, a 400 ºC por 4 h, seguidamente do padrão de recuperação deuterado $C_{12}D_{54}$ (*surrogate*). O material foi transferido para um cartucho de celulose levado posteriormente a uma bateria de *Sebelin* marca Solab modelo SL201/6 composta de 6 bases de aquecimento as quais estavam acoplados 6 extratores do tipo *Soxhlet* para extrações simultâneas. No extrator *Soxhlet*, pela parte de cima, foram adicionados 250 mL do solvente ciclohexano grau pesticida marca Tédia. A extração foi conduzida por cerca de 8 horas (MOLINA-BARAHONA et al., 2004). Do extrato obtido no balão de fundo chato foram retirados 4 mL que foram transferidos para um "vial" previamente limpo e identificado, o qual permaneceu sob refrigeração até a análise por cromatografia gasosa.

2.6.7 Quantificação dos hidrocarbonetos: condições analíticas

Os hidrocarbonetos extraíves de petróleo foram analisados pelo Laboratório Analytical Solutions (RJ), por GC-FID, utilizando como referência o método U.S.EPA 8015. De acordo com o laboratório, as análises foram realizadas em cromatográfico gasoso, modelo 6890 e coluna capilar da marca Agilent modelo DB-1 (30m; 025 mm; 025µm). O gás de arraste utilizado foi o Hélio na vazão de 1mL min^{-1}. O volume de injeção foi de 1µl sem divisão de fluxo. A temperatura do injetor foi de 250 ºC. A temperatura inicial do forno foi de 60 º C, seguido de uma rampa de aquecimento de 10 ºC min^{-1} até 310 ºC e isoterma de 7 min. A temperatura do detector foi de 350 ºC. A quantificação das amostras foi realizada através do método de padronização externa, tendo como referência a metodologia U.S.EPA 8000. O padrão interno utilizado foi um mix de n-alcanos (C_{12}, C_{20}, C_{24}, C_{36}) e o padrão de recuperação, alcano deuterado C_{16}.

2.6.8 Quantificação da produção de CO_2

A determinação da quantidade de CO_2 produzida foi realizada de acordo com a norma NBR 14283 (ABNT, 1999), através da titulação da alcalinidade residual da solução de KOH 0,2 mol L^{-1} contendo o CO_2 dissolvido, com solução de HCl 0,1 mol L^{-1}. A solução de KOH foi retirada do respirômetro de Bartha através de uma seringa de 10 mL. Para isto, a tampa do filtro de ascarita foi removida e a válvula para entrada de oxigênio no respirômetro, aberta. Tal solução foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 2 gotas do indicador fenolftaleína e 1 mL de solução de cloreto de bário ($BaCl_2$) 0,1 mol L^{-1}, cuja finalidade é eliminar a interferência da presença de carbonato na solução, promovendo sua precipitação na forma de carbonato de bário (ANDREO, 1999). Antes da titulação foram realizadas três lavagens do braço lateral do respirômetro com 10 mL de água destilada isenta de CO_2, com o auxílio da seringa. A quantidade de água proveniente das três lavagens (30 mL) foi transferida para o frasco Erlenmeyer contendo a solução de KOH a ser titulada. Imediatamente após estas lavagens, foi procedida a titulação da solução de KOH 0,2 mol L^{-1} com a de HCl 0,1 mol L^{-1}. O ponto final da titulação foi dado pela viragem da coloração rosa do indicador fenolftaleína para incolor. O volume gasto de HCl 0,1 mol L^{-1} nessa viragem foi anotado e nova solução de KOH 0,2 mol L^{-1} (10 mL) foi adicionada imediatamente ao respirômetro de Bartha, que retornou para incubação até a determinação seguinte. Durante o procedimento de retirada da solução de KOH e sua titulação a válvula para entrada de oxigênio (Figura 12 – Letra H) foi mantida aberta para aeração dos respirômetros pelo filtro de ascarita.

As principais reações que ocorrem no ensaio respirométrico estão representadas nas Equações 8, 9 e 10.

$$2\ KOH_{(aq)} + CO_{2\,(g)} \rightleftarrows KHCO_{3(aq)} + KOH_{(aq)} \tag{8}$$

$$KHCO_{3(aq)} + 2\ KOH_{(aq)} + H_2O_{(l)} + BaCl_{2(aq)} \rightarrow BaCO_{3(s)}\downarrow + 2\ KCl_{(aq)} + KOH_{(aq)} + 2\ H_2O_{(l)} \tag{9}$$

$$KOH_{(aq)} + HCl_{(aq)} \rightarrow KCl_{(aq)} + H_2O_{(l)} \tag{10}$$

A cada titulação foi conduzido um controle branco, constituído por 10 mL da solução de KOH 0,2 mol L^{-1}, 2 gotas de fenolftaleína, 1 mL da solução de $BaCl_2$ 0,5 mol L^{-1} e 30 mL de água destilada isenta de CO_2, utilizada nas lavagens dos respirômetros. Para cada respirômetro-ensaio e/ou respirômetro controle (CB) (Tabela 7), a quantidade de CO_2 produzida foi calculada a partir da Equação 11.

$$mg\ CO_{2\ \text{solo contaminado}} = (A\text{-}B) \times 50 \times 0{,}044 \times F_{HCl} \quad (11)$$

Onde:

A = volume de HCl gasto para titular a solução de KOH da prova em branco, em mL;

B = volume de HCl gasto para titular a solução de KOH do respirômetro-ensaio (ou controle), em mL;

50 = fator para converter mol de NaOH em μmol de CO_2 produzido;

0,044 = fator para transformar μmol de CO_2 em mg de CO_2;

F_{HCl} = fator de correção da solução de HCl 0,1 mol L^{-1}

Ressalta-se que a cada dia de ensaio as soluções de KOH e HCl eram, previamente, padronizadas, de acordo com os procedimentos descritos na NRB 14283 (ABNT, 1999). A água isenta de CO_2 também era produzida diariamente. Todos os reagentes utilizados foram da marca Vetec.

A produção de CO_2 diária em cada tratamento adotado foi dada pela média aritmética das três réplicas de respirômetro.

2.6.9 Quantificação da produção de CO_2 por biodegradação

Para determinar a quantidade de CO_2 produzida por biodegradação (CO_{2b}), subtraiu-se a quantidade diária de gás produzida no respirômetro-controle (CB) (Tabela 7) da quantidade produzida no respirômetro-ensaio (tratamento). Já a produção acumulada de CO_2 por biodegradação em função do tempo de incubação foi determinada através da soma de todas as massas de CO_2 (mg) obtida em cada um dos intervalos de tempo analisados.

2.6.10 Quantidade de Carbono biodegradado

A quantidade de carbono biodegradado foi estimada conforme Equação 12 (ABNT, 1999):

$$C_b\ (mg) = 2 \times CO_{2b}\ (mg) \quad (12)$$

Onde:

C_b = quantidade de carbono biodegradado;

CO_{2b} = quantidade de CO_2 produzida por biodegradação.

Em tal equação, admiti-se que 50% do carbono biodegradado se transformam em CO_2 e que os 50% remanescentes se incorporam ao solo sob a forma de húmus e biomassa microbiana, conforme preconizado na NBR 14283 (ABNT, 1999).

2.6.11 Eficiência da biodegradação pela evolução de CO_2

Através da quantidade acumulada de carbono biodegradado (C_{acum}), calculou-se a eficiência de biodegradação (EB) de cada tratamento ao final do experimento, de acordo com a equação 13 (MARIANO, 2006; TRINDADE 2002):

$$EB\,(\%) = \{\, C_{acum}\,(mg) \,/\, COT_{\text{inicial do solo}}\,(mg)\} \times 100 \qquad (13)$$

Onde:

EB= eficiência de biodegradação;

C_{acum} (mg) = $\sum$ das massas de C_b obtida em cada instante de tempo

COT = carbono orgânico total presente no solo no início do experimento

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização e ajustes do solo de estudo

O solo utilizado nos dois experimentos de biodegradação, classificado como Planossolo Háplico, é típico da região de Seropédica onde está localizado o Campo Experimental da PESAGRO-RIO, local da coleta (AGUIAR, 2006; BALIEIRO et al., 2005). Segundo Balieiro et al (2005), uma das características marcantes desse tipo de solo é a diferenciação bem acentuada dos horizontes superficiais A e E, de textura variando de areia a areia franca. Outras características, de acordo com os mesmos autores, são os baixos teores de matéria orgânica e baixa capacidade de troca catiônica.

Cabe ressaltar, que a classe dos Planossolos compreende solos minerais imperfeitamente ou mal drenados, e mais arenosos, que ocorrem, preferencialmente, em áreas de relevo plano ou suave ondulado, sendo muito comuns no semi-árido brasileiro e regiões litorâneas (SANTOS et al., 2006). A Figura 17 mostra a distribuição dessa classe de solos no Brasil e no Estado do Rio de Janeiro.

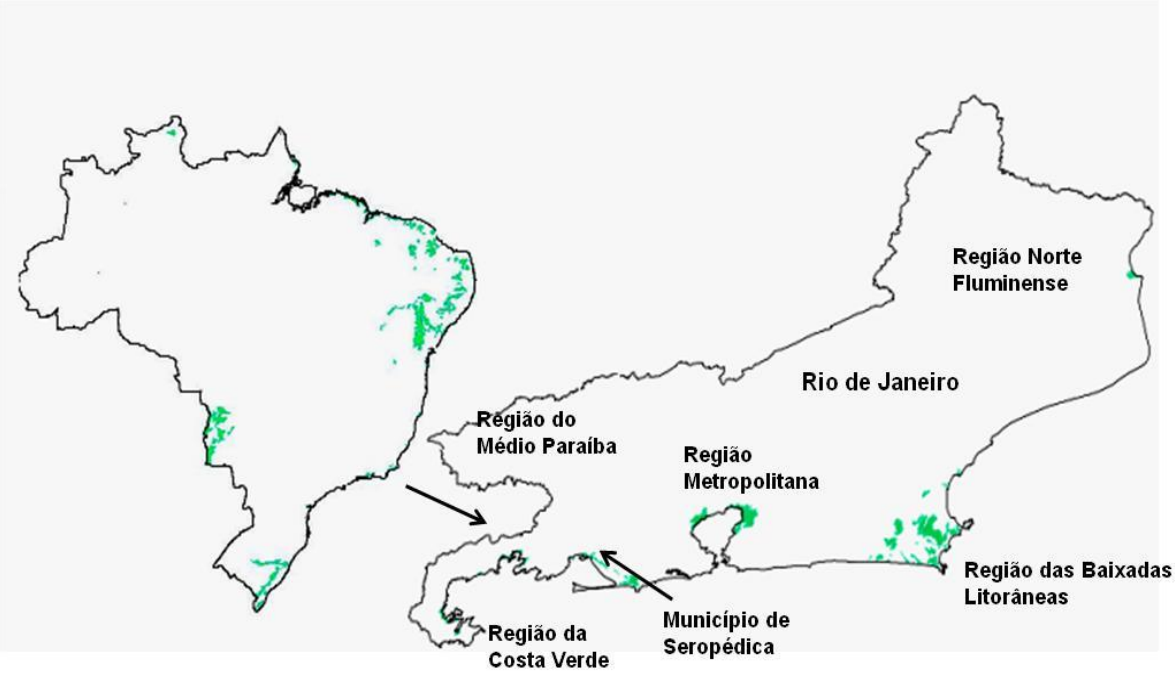


Figura 17 – Mapa da distribuição de planossolos no Brasil e no Estado do Rio de Janeiro (Escala 1:5.000.000). Fonte: Embrapa (2010).

A caracterização físico-química e microbiológica dos solos *in natura* utilizados no 1º experimento (microcosmos de bancada) e no 2º experimento (respirômetros de Bartha) está apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 - Caracterização físico-química e microbiológica dos solos *in natura* utilizados nos experimentos de biodegradação.

Parâmetros		**Solo 1º experimento**	**Solo 2º experimento**
Físico-químico			
Granulometria (%)	Areia	87,2	88,8
	Silte	8,8	7,2
	Argila	4,0	4,0
Umidade (%)		4,25	4,0
Capacidade de campo (%)		33	18
Densidade g cm^3	Solo	1,41	-
	Partículas	2,61	-
Complexo ($ccmoI_c$ Kg^{-1})	Ca^{2+}	1,6	0,0
	Mg^{2+}	0,4	0,9
	K^+	0,35	0,05
	Na^+	0,08	0,02
	Al^{3+}	0,0	0,0
	H+	1,0	1,5
pH (água)		5,7	5,4
Carbono orgânico total (g Kg^{-1})		5,0	4,9
Nitrogênio total (g Kg^{-1})		0,6	0,5
Fósforo assimilável (g Kg^{-1})		0,079	0,076
Microbiológico			
População microbiana heterotrófica total (UFC $g-^1$ de solo)		3,3 $x10^6$	1,19 $x10^7$

As amostras de solo apresentaram várias similaridades físicas e químicas, o que já era esperado pelo fato dos mesmos terem sido oriundos do mesmo local de coleta. Diferenças foram observadas quanto ao complexo sortivo (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Na^+, Al^{3-}, H^+), fato, possivelmente, relacionado à heterogeneidade natural do local e época da coleta. Tais parâmetros apresentaram-se em menores concentrações na amostra obtida para o 2º experimento.

A composição granulométrica dos solos *in natura* foi praticamente a mesma: 88% de areia, 8% de silte e 4,0% de argila, mostrando uma predominância de areia (grossa e fina), superior a 80% do total, e evidenciando que o mesmo é de textura arenosa (silte + argila < 15%) (ARAÚJO et al., 2003; MILLIOLI et al., 2008). Essa textura, por sua vez, apresenta aspectos relevantes à ecologia microbiana. Normalmente, solos arenosos, em função do maior tamanho de suas partículas e do seu espaço poroso (predomínio de macroporos), são mais permeáveis e apresentam melhores taxas de aeração, já que elevados teores de oxigênio podem ser acumulados em seus espaços porosos, com rápida reposição por difusão. Em contrapartida, apresentam baixa capacidade de retenção de umidade (ARAÚJO et al., 2003; BAPTISTA, 2003).

A alta permeabilidade é um aspecto importante na distribuição de nutrientes e aceptores de elétrons nos solos. No entanto, *in situ*, a mesma tem influência na taxa de infiltração do contaminante, tendendo a ampliar a extensão da contaminação (MARIANO, 2006; SILVA, 2004). A baixa retenção de umidade (água), por sua vez, pode inibir o crescimento microbiano por substrato, já que filmes de água são os principais sítios de atividade microbiana no solo (ESPÍRITO SANTO, 2002; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A quantidade máxima de água que um solo bem drenado consegue armazenar contra a ação da gravidade, por um período de tempo, corresponde à capacidade de campo deste (FABIAN; OTTONI FILHO, 2000; STANFORD et al., 2005). Em estudos de biorremediação, esse parâmetro constitui uma importante informação quanto ao teor máximo de água retido no solo e disponível aos micro-organismos, sendo bastante utilizado para ajustar a umidade do mesmo (BAPTISTA, 2003; SEABRA, 2005; CHAGAS-SPINELLI, 2007). Normalmente, a literatura tem reportado teores ideais de água no solo para a atividade microbiana na faixa de 25% a 85% da capacidade de campo (SEABRA, 2005). Nos experimentos, optou-se por ajustar a umidade do solo para 50% desse parâmetro.

A umidade do solo *in natura*, nos dois experimentos, foi de 4%. No entanto, as amostras de solo utilizadas nos experimentos 1 e 2 apresentaram valores de capacidades de campo de 33% e 18% respectivamente. Provavelmente devido à utilização de metodologias distintas na determinação desse parâmetro.

A decisão de utilizar uma metodologia no 2º experimento (CHAGAS-SPINELLI, 2007; TRINDADE, 2002) distinta da utilizada no primeiro (LIMA, 2004), deveu-se justamente ao fato de que durante a montagem dos microcosmos (1º experimento), o solo ficou bastante "encharcado" após o ajuste de umidade, sugerindo que o valor de 33% foi superestimado. Mello et al (2002) recomenda que a capacidade de campo seja determinada *in situ*. No entanto, por ser um processo oneroso, com dificuldades práticas, tal determinação tem sido realizada em laboratório na maioria dos estudos. Netto, Nacif e Resende (1999) e Souza et al (2002) ressaltam que diferenças têm sido observadas entre as diversas metodologias, especialmente quando comparadas com o método direto no campo, o que corrobora com os resultados encontrados.

O pH das duas amostras de solo *in natura* mostrou-se moderadamente ácido (5,7 e 5,4), estando em ambos os casos abaixo da faixa ótima de pH reportada na literatura para processos de biorremediação que é de 6,5 a 8,5 (SARKAR et al., 2005). Tal inadequação do pH pode restringir a atividade e o crescimento microbiano, principalmente bacteriano (SARKAR et al., 2005). Por isso, ambos os solos tiveram o pH ajustado para

aproximadamente 7,0 através da adição de $Ca(OH)_2$, cuja quantidade foi determinada pela curva de neutralização apresentada na Figura 18.

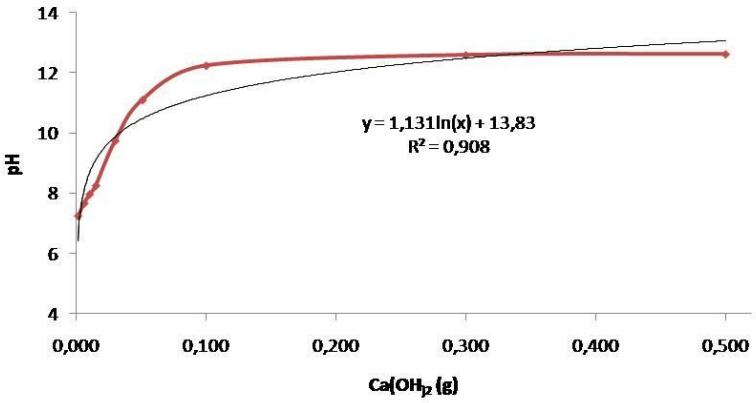


Figura 18 - Curva de neutralização pH x $Ca(OH)_2$ (g).

A relação nutricional C:N:P do solo *in natura* utilizado no 1º experimento apresentou-se em torno de 100:12:1,58. Tal relação foi calculada a partir dos resultados de carbono orgânico, nitrogênio e fósforo assimilável, que foram respectivamente de: 5 g kg^{-1}, 0,6 g kg^{-1} e 0,079 g Kg^{-1}. Entretanto, tendo em vista o aumento da quantidade de carbono orgânico disponível para degradação microbiana ocasionada pela introdução do óleo diesel B5 (5% p/p) foi estimada uma alteração da relação C:N:P para aproximadamente 100:1,091:0,14. Nesse caso, tanto os teores de nitrogênio quanto de fósforo estariam muito aquém da razão 100:10:1 considerada adequada para biodegradação de hidrocarbonetos por alguns autores (JACCQUES et al., 2007; SILVA, 2004; U.S.EPA, 2004). Por isso, de modo a estimular a atividade degradadora dos micro-organismos a relação C:N:P, após contaminação do solo, foi ajustada para 100:10:1.

No 2º experimento (respirometria), o solo *in natura* apresentou um relação nutricional em torno de 100:10,2:1,55. Com a introdução do óleo diesel B5 (5% p/p) a razão final C:N:P foi estimada para aproximadamente 100:0,91;0,14, que igualmente ao experimento anterior, estaria muito aquém da faixa de 100:10:1. Porém, nesse segundo experimento, em função do novo valor de capacidade de campo (18%) assumido, que limitava o teor de água (ou inóculo) que podia ser adicionado, optou-se por não bioestimular o solo após sua contaminação pela adição de nutrientes.

Cabe mencionar que as relações nutricionais ótimas de C:N:P são na verdade, estabelecidas empiricamente, sendo dependentes do tipo de contaminante e da população

microbiana envolvida (JACCQUES et al., 2007; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Ressalta-se, no entanto, que não foi objetivo do presente trabalho definir qual seria a melhor relação nutricional.

Quanto à população microbiana nativa, os solos *in natura* (1º e 2º experimento) apresentaram, respectivamente, uma população heterotrófica total de 3,3 x 10^6 UFC g^{-1} de solo e 1,19 x 10^7 UFC g^{-1} de solo, sendo considerados inicialmente bem povoados, quando comparados a outros estudos na literatura (LIMA, 2004; PALA, 2004; ESPIRITO SANTO, 2002; TRINDADE, 2002). Espírito Santo (2002), por exemplo, em seu estudo sobre a biodegradabilidade de óleo diesel por micro-organismos nativos da areia da praia de Suape - PE, encontrou, inicialmente, populações nativas de fungos e bactérias na ordem de 10^6 e 10^7, respectivamente.

Quanto à presença de contaminação por hidrocarbonetos, na Tabela 11 são apresentados os teores de HTP e HPAs encontrados para o solo *in natural* (1º experimento). Em relação aos HPAs, a análise foi realizada apenas para os 16 compostos considerados prioritários pela U.S.EPA e os naftalenos metilados.

Tabela 11 – Caracterização do solo *in natura* quanto à presença de hidrocarbonetos de petróleo.

Parâmetros	**Solo *in natura* (mg Kg^{-1})**
HTP	394,68
HPAs	
Naftaleno	0,43
Fenantreno	59,96
Antraceno	57,77
Fluoranteno	102,90
Pireno	15,32
2-metil-naftaleno	0,14
1-metil-naftaleno	0,06
Total de HPAs	236,59

Nota: os HPAs não detectados não foram apresentados nessa tabela.

Observou-se uma quantidade considerável de hidrocarbonetos de petróleo e HPAs no solo *in natura* (Tabela 11). Levando-se em consideração a concentração encontrada, sugere-se que um eventual derramamento (ou vazamento) de óleo mineral, por uso de maquinário agrícola, por exemplo, seja a causa mais provável da presença dos mesmos no solo de estudo.

Contudo, cabe ressaltar a proximidade do local de coleta da Rodovia 465 (antiga Estrada Rio-São Paulo), onde há trânsito de carros, ônibus e caminhões, o que também pode ter contribuído para a presença dos hidrocarbonetos encontrados, através da deposição atmosférica de material particulado provenientes da queima automotiva de combustíveis. Alguns estudos têm relatado a presença de HPAs e outros contaminantes químicos em solos agrícolas, florestais e/ou adjacentes a rodovias (FIGUEIREDO; MORCELLI; SÍGOLO, 2005; PLACHÁ et al., 2009, STEIN et al., 2008).

3.2 Caracterização do solo usado no preparo da cultura microbiana RES

A caracterização físico-química e microbiológica do solo *in natura* proveniente do posto de combustível e utilizado no preparo da cultura microbiana RES está apresentada na Tabela 12.

Tabela 12 – Caracterização do solo *in natura* usado no preparo da cultura microbiana RES quanto à presença de hidrocarbonetos de petróleo.

Parâmetros	Solo do posto de combustível (Resende)
pH (água)	7,0
HTP (mg Kg^{-1})	64,00
População microbiana heterotrófica total (UFC g^{-1} de solo)	$2,56 \times 10^{8}$

Com base na Tabela 12, observa-se que o teor total de hidrocarbonetos de petróleo no solo proveniente do posto de combustível foi bem menor comparado ao solo de estudo (Seropédica). A escavação e revolvimento do solo durante o processo de reforma do posto pode ter contribuído para os baixos valores observados. A população microbiana heterotrófica total e o pH, no entanto, apresentaram valores superiores comparados ao solo de estudo (Seropédica).

3.3 Caracterização analítica do óleo diesel puro e diesel B5

Na Tabela 13 apresenta-se a quantificação dos HTP e suas frações, assim como dos 16 HPAs prioritários presentes no óleo diesel puro e no óleo diesel B5. Pode-se observar uma

quantidade considerável de HPAs no óleo diesel, fato documentado por vários autores (MAZZUCO, 2004; PALUDO, 2007).

Tabela 13 – Caracterização química do óleo diesel puro e do diesel B5 quanto os hidrocarbonetos de petróleo.

Parâmetros	Óleo diesel	Diesel B5
	mg Kg^{-1}	
n-alcanos	85138,49	97386,10
HRP	228716,98	28906,06
UCM	451584,47	487130,91
HTP	680301,44	776194,97
HPAs		
Naftaleno	254,596	243,158
Acenaftileno	9,993	12,243
Acenafteno	50,796	50,924
Fluoreno	48,106	40,288
Fenantreno	126,203	152,491
Antraceno	12,353	17,985
Fluoranteno	2,132	9,547
Pireno	33,551	37,438
Benzo[a]antraceno	3,967	4,927
Criseno	2,776	1,924
Benzo[b]fluoranteno	0,493	0,708
Benzo[k]fluoranteno	0,201	0,561
Benzo[a]pireno	0,408	0,435
Indenol[1,2,3-cd]pireno	0,067	0,081
Dibenzo[a,h]antraceno	0,026	0,026
Benzo[g,h,i]perileno	0,233	0,281
2-metil-naftaleno	494,855	404,210
1-metil-naftaleno	335,412	348,809
Total de HPAs	1376,18	1426,04

Nota: HRP = hidrocarbonetos resolvidos do petróleo; UCM = mistura complexa não resolvida; HTP = hidrocarbonetos totais de petróleo.

3.4 Ensaios de biodegradação com consórcio de micro-organismos eficazes KMA (*Embiotic Line*)

3.4.1 Contagem microbiana: comportamento dos micro-organismos heterotróficos totais ao longo do experimento

A quantificação de micro-organismos heterotróficos totais é uma das medidas microbiológicas amplamente utilizadas em estudos de biorremediação não somente para se avaliar os efeitos de contaminantes sobre a população microbiana nativa, mas também o potencial desta na utilização dos mesmos como substratos. Cabe ressaltar que os micro-

organismos heterotróficos são aqueles que utilizam compostos orgânicos como sua principal fonte de carbono, sendo os agentes de destaque na biodegradação desses compostos. No solo, a maioria desses micro-organismos é representada por actinomicetos, fungos e bactérias (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As quantificações da densidade microbiana heterotrófica total nos diferentes tratamentos adotados ao longo do período de realização do experimento estão apresentadas na Tabela 14. As mesmas foram expressas em unidades formadora de colônia por grama de solo (UFC g^{-1}).

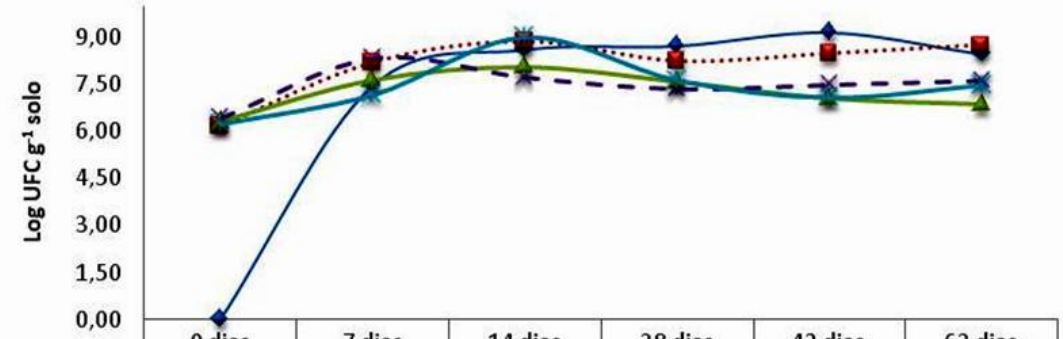
Tabela 14 – População microbiana heterotrófica total nos intervalos 0, 7, 14, 28, 42 e 63 dias.

Dias	**PA**	**BE_1**	**BE_2**	**BAD**	**BAM**
			$UFCg^{-1}$ de solo *		
0	0	$2,48 \times 10^6$	$3,36 \times 10^6$	$4,85 \times 10^6$	$2,26 \times 10^6$
7	$5,60 \times 10^7$	$1,67 \times 10^8$	$5,04 \times 10^7$	$2,22 \times 10^8$	$1,65 \times 10^7$
14	$5,40 \times 10^8$	$9,61 \times 10^8$	$4,80 \times 10^8$	$8,93 \times 10^7$	$6,46 \times 10^8$
28	$6,32 \times 10^8$	$1,83 \times 10^8$	$8,00 \times 10^8$	$2,44 \times 10^7$	$8,85 \times 10^7$
45	$1,55 \times 10^9$	$3,15 \times 10^8$	$1,13 \times 10^7$	$3,19 \times 10^7$	$1,74 \times 10^7$
63	$3,15 \times 10^8$	$6,35 \times 10^8$	$7,35 \times 10^6$	$8,40 \times 10^6$	$5,60 \times 10^7$

Nota: (*) = média de duplicata.

Para verificar a proporcionalidade entre as médias e desvios padrões dos tratamentos adotados, os dados da Tabela 14 foram previamente convertidos para logaritmo de UFC, conforme procedimento adotado por Chagas-Spinelli (2007), Mariano (2006) e Vieira e Nahas (2000), entre outros. A Figura 19 ilustra o perfil da população microbiana em log UFC g^{-1} de solo ao longo dos 63 dias de experimento.

De modo geral, a população heterotrófica total em todos os tratamentos adotados apresentou o seguinte comportamento: aumento do número de micro-organismos nos primeiros 14 e leve decaimento ao final, com exceção do tratamento BE_1. Nos tratamentos bioaumentados BE_2, BAD e BAM, a contagem de micro-organismos heterotróficos totais ao final do 63º dia foi igual ou pouco superior à contagem inicial (tempo 0). O comportamento microbiano em termos de UFC não foram marcadamente diferentes entre os tratamentos adotados, com exceção do tratamento PA que apresentou um crescimento microbiano significativo na primeira semana após o início do experimento (teste de Turkey; $p<0,05$).



	0 dias	7 dias	14 dias	28 dias	42 dias	63 dias
PA	0	7,46	8,61	8,73	9,17	8,47
BE1	6,17	8,19	8,85	8,23	8,48	8,75
BE2	6,31	7,65	8,06	7,59	7,05	6,87
BAD	6,44	8,34	7,74	7,37	7,50	7,63
BAM	6,25	7,19	9,02	7,65	7,10	7,50

Figura 19 – Perfil da população microbiana (Log UFC g^{-1} de solo) nos diferentes tratamentos, no decorrer do 1º experimento de biodegradação (microcosmos).

Mariano (2006) avaliou diferentes estratégias de biorremediação em solo contaminado por óleo diesel e também verificou que o número de micro-organismos heterotróficos totais não foi influenciado pelos tratamentos, concluindo que a biomassa microbiana pode ser um indicador pouco específico para se determinar o potencial de biodegradação.

De modo geral, o crescimento da população microbiana nos primeiros dias de tratamento deve-se à maior disponibilidade de nutrientes nesse período, assim como à presença de fonte de carbono mais facilmente assimilável (ESPÍRITO SANTO, 2002; TRINDADE, 2002). Entretanto, é importante destacar que, dependendo da toxicidade do contaminante e da microbiota presente, o crescimento microbiano nos primeiros dias pode ser, ao contrário, inibido. Bento (2005) estudou a influência da utilização de um dispersante químico e de um biossurfactante na realização de um derramamento controlado de óleo diesel na Ilha dos Cavalos - RS e observou que a quantidade de bactérias foi bastante afetada nos primeiros 30 dias do experimento. Spinelli (2005), em experimentos de derramamento com gasolina, observou uma queda na contagem de bactérias nos primeiros 10 dias.

O decréscimo do número de micro-organismos ao longo do processo de biodegradação, comumente reportado na literatura, pode estar relacionado a fatores como o envelhecimento da população microbiana, esgotamento de nutrientes e/ou diminuição da fonte de carbono como consequência da utilização dos hidrocarbonetos, principalmente, daqueles mais susceptíveis ao ataque microbiano (JORGENSEN; PUUSTINEN; SUORTTI, 2000; MOLINA-BARAHONA et al., 2004; PEREIRA, 2008). Schenk (2004), por exemplo,

observou durante o processo de biorremediação de um solo contaminado por querosene, que a elevação da biomassa microbiana ocorreu nos primeiros 10 dias pela utilização das substâncias orgânicas contaminantes como fonte de carbono. No entanto, com a utilização dessas substâncias houve uma diminuição da população microbiana nos dias que se seguiram, devido ao decaimento dos teores de substrato para crescimento..

Um fato que despertou atenção no presente experimento foi o crescimento considerável de micro-organismos no controle abiótico (PA), onde o solo foi previamente esterilizado em autoclave três vezes, por dias consecutivos, método adotado em vários trabalhos BENTO et al., 2005; MOLINA-BARAHONA et al., 2004; VINÃS et al., 2005). Embora não tenham sido detectadas UFC no tempo inicial (dia 0), um aumento microbiano expressivo ocorreu já na primeira semana de experimento em relação aos demais tratamentos, fato que perdurou até o 42º dia, quando ocorreu um leve decaimento.

O crescimento microbiano no controle de processos abióticos, também observado nos trabalhos de Pereira (2008) e Mello et al (2007) empregando solos termicamente esterilizados, pode ter ocorrido tanto por uma deficiência do processo de esterilização térmica, permitindo que micro-organismos permanecessem no solo sob a forma de esporos, quanto por repovoamento de micro-organismos externos, suspensos no ar, durante a aeração do sistema (microcosmo).

Mello et al (2007), avaliando a aplicabilidade do método respirométrico de Bartha para a determinação da biodegradação de poluentes em latossolos, observaram a ausência de micro-organismos heterotróficos totais na amostra de solo esterilizada (6 vezes) no tempo inicial. No entanto, após 72 horas de incubação havia a presença de mais de $1,6 \times 10^5$ UFC g^{-1} de solo e o crescimento foi observado até 3 meses de incubação do experimento. Segundo esses autores, as condições favoráveis existentes no interior dos respirômetros, como presença de oxigênio, umidade, nutrientes e pH, semelhantes às condições dos microcosmos deste estudo, possibilitaram o crescimentos de micro-organismos que resistiram ao processo de esterilização em autoclave e não foram detectados na contagem do tempo inicial.

Cabe ressaltar que Mello et al (2007) consideraram que a ausência de UFC no tempo inicial, fato igualmente observado no presente experimento, possa ter sido resultante da própria limitação do método de contagem em placa e do meio de cultivo utilizado que, por sua vez, pode não atender as exigências de todos os micro-organismos existentes.

É sabido que a quantificação de micro-organismos pela técnica de plaqueamento em meio de cultura, geralmente, detecta um número menor de espécies de micro-organismos que ocorre naturalmente no solo, pois tal técnica favorece o crescimento de grupos de espécies de

metabolismo rápido e adaptáveis às condições de cultivo e à composição do meio (FORTES NETO; FERNANDES; JAHNEL, 2007). No entanto, apesar das limitações existentes, a referida técnica, por sua facilidade de execução, é amplamente utilizada para se estimar o número de micro-organismos em solo e outros sistemas, sendo de bastante utilidade quando se trabalha com um número grande de amostras e os resultados são exigidos em um curto espaço de tempo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SOUZA; NAHAS, 2000).

No presente experimento, sugere-se, no entanto, que o repovoamento do solo por micro-organismos externos tenha sido a causa mais provável do crescimento no tratamento PA, uma vez que os microcosmos utilizados, ao contrário dos respirômetros, são sistemas abertos, e mesmo que cobertos externamente com uma folha de alumínio, eram periodicamente revolvidos para aeração, o que, por sua vez, pode ter contribuído para a introdução de micro-organismos suspensos no ar, já que o local onde os ensaios foram conduzidos não se tratava de um ambiente estéril. Os respirômetros de Bartha, embora também sejam aerados periodicamente, possuem um suporte de algodão no local de entrada de ar (filtro de ascarita), que reduz a possibilidade de introdução de micro-organismos.

Segundo Fantroussi e Agthos (2005), o solo estéril é mais colonizado por micro-organismos externos do que solo não estéril pelo fato da esterilização eliminar fatores bióticos como predação e competição oferecida pelos micro-organismos autóctones, aumentando a probabilidade de estabelecimento dos colonizadores. Por isso, alguns autores têm utilizado a esterilização do solo como forma de promover um satisfatório estabelecimento da população inoculada como forma de obter maiores taxas de degradação do contaminante (KÄSTNER; BREUER-JAMMALI; MAHRO, 1998; JACCQUES, 2005).

No tratamento BE_1, a população microbiana heterotrófica total apresentou leve crescimento durante os primeiros 14 dias, quando atingiu seu maior patamar ($9{,}61 \times 10^8$ UFC g^{-1}) com decréscimo entre o 14º e o 28º dia e, posterior crescimento no final do monitoramento (63º dia). No tratamento BE_2, a população microbiana cresceu nos primeiros 28 dias, quando atingiu seu maior patamar ($8{,}00 \times 10^8$ UFC g^{-1}) e em seguida decresceu até o 63º dia. Ao final dos 63 dias, observou-se que o bioestímulo com ajuste de pH (BE_1) apresentava população superior ao bioestímulo com ajuste de pH e adição de nutrientes (BE_2).

No tratamento BAD, solo contaminado somente por óleo diesel, o crescimento mais significativo ocorreu nos primeiros sete dias ($8{,}93 \times 10^8$ UFC g^{-1}) e o decréscimo, do 7º ao 28º dia. Essa diminuição da população pode ter ocorrido em função de competição nutricional

entre os micro-organismos inoculados e os nativos do solo (FANTROUSSI; AGHTOS, 2005; MARIANO, 2006).

No tratamento BAM, bioaumento do solo contaminado com óleo diesel B5, a população microbiana cresceu nos primeiros 14 dias, atingindo seu maior patamar (6,46 x 10^8 UFC g^{-1}). Em seguida, a mesma decresceu até o 42º dia e voltou a crescer no final do experimento.

Quanto aos tratamentos BAD e BAM, aos quais foram adicionados inóculo KMA, contendo 2,64 x 10^9 UFC mL^{-1}, não foi observado um aumento na população inicial e durante o experimento, quando os valores em UFC foram comparados com os demais tratamentos sem inóculo, o que sugere que os micro-organismos adicionados previamente não aumentaram consideravelmente a população microbiana total. Uma provável explicação para isso pode estar relacionada aos princípios ecológicos de predação e competição que se estabelece entre os micro-organismos autóctones e os introduzidos, diminuindo a taxa de sobrevivências dos mesmos, particularmente daqueles inicialmente estranhos ao ambiente.

Tem sido observado que as comunidades autóctones do solo têm maior eficiência na obtenção do substrato e na tolerância aos estresses ambientais do que a população inoculada (FANTROUSSI; AGHTOS, 2005; MARIANO, 2006; VAN VEEN; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 1997). Segundo Van Veen, Van Overbeek e Van Elsas (1997) fatores abióticos tais como textura do solo, pH, temperatura, conteúdo de umidade, entre outros, determinam, em grande parte, a sobrevivência e a atividade dos micro-organismos introduzidos. Sendo assim, a capacidade destes micro-organismos em lidar com as condições do meio e suas variações é o requisito principal para manterem-se vivos e ativos no solo.

Chagas-Spinelli (2007) avaliou sob condições laboratoriais diferentes processos de biorremediação no tratamento de solo contaminado por óleo diesel. No decorrer dos dias de incubação (realização do experimento) observou um comportamento de crescimento e decréscimo no número de bactérias e fungos muito associado aos valores de pH medidos durante os testes. Nos períodos iniciais (10º e 17º dia), por exemplo, ocorreu uma redução do número de bactérias nos três tratamentos estudados (*Landfarming*, bioestímulo e bioestímulo + bioaumento) e um aumento do número de fungos, fato que foi relacionado à redução dos valores de pH, que tornou o meio mais promissor ao desenvolvimento desses microorganismos.

No presente estudo, a variação de pH ao longo do experimento, assim como a quantificação diferenciada de fungos e bactérias, não foram avaliados. Entretanto, um fato semelhante aos experimentos de Chagas-Spinelli (2007) foi observado. Do 14º dia ao 28º dia,

houve um intenso crescimento de fungos ocupando quase todo o espaço das placas, dificultando inclusive a contagem das unidades formadoras de colônias (Figuras 20a e 20b). Tal crescimento ocorreu em todos os tratamentos, em especial, no BE_2, BAD e BAM. Do 28º dia ao 63º dia, o crescimento de fungos foi bem menos expressivo, em particular, a partir do 42º dia, quando os mesmo quase não foram mais detectados (Figuras 20c e 20d).

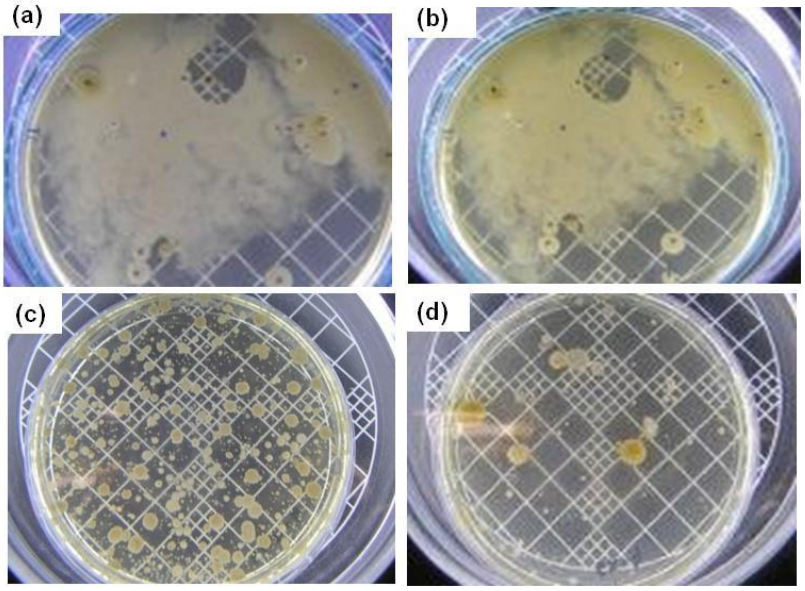


Figura 20– Crescimento microbiano observado entre o 14º dia ao 63º (microcosmos de bancada). (a e b) intenso crescimento de fungos observado entre o 14º dia e o 28º dia no tratamento BE_2; (c e d) crescimento mais expressivo de bactérias observado entre o 42º dia e 63º dia, no tratamento BE_2.

Segundo Chagas-Spinelli (2007) a contaminação com óleo diesel tende a provocar um aumento da população de fungos presentes no solo em função do efeito catabólico da atividade bacteriana sobre as frações do óleo, que produzem frequentemente, metabólitos ácidos. Em seus experimentos, foi observado um crescimento gradativo da população fúngica até o 24º dia, com posterior decréscimo até o último dia de incubação (129 dias), nos tratamentos de bioestímulo e bioestímulo + bioaumento. De acordo com Gadd (2001), os fungos estão geralmente presentes em contaminações com derivados de petróleo como o óleo diesel, pois os compostos deste produto apresentam cadeias mais longas que podem dificultar a ação enzimática das bactérias e favorecer o crescimento de fungos. Ainda de acordo com o autor, esses micro-organismos são muitas vezes mais eficientes na degradação de determinados substratos, como, por exemplo, HPAs, do que as bactérias.

Cabe mencionar, no entanto, que o consórcio comercial KMA, adicionado nos tratamentos BAM e BAD, contém em sua formulação espécies de leveduras. Portanto, o

crescimento expressivo de fungos observado nesses tratamentos em particular, pode estar relacionado à atividade metabólica do próprio inóculo.

Além do pH, a temperatura é outro fator que influencia fortemente as populações microbianas devido ao fato de atuar de duas maneiras totalmente opostas: aumentando a eficiência metabólica e assim acelerando o crescimento ou causando danos a algumas moléculas essenciais, causando a morte celular (MARQUES et al., 2003; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Durante o período do experimento, a temperatura ambiente do laboratório foi controlada de modo a manter-se na faixa de 25-30 ºC, já que os micro-organismos aeróbios crescem normalmente entre 25-37 ºC (MARQUES et al., 2003). A Figura 21 mostra a variação da temperatura ambiente ao longo do período do experimento.

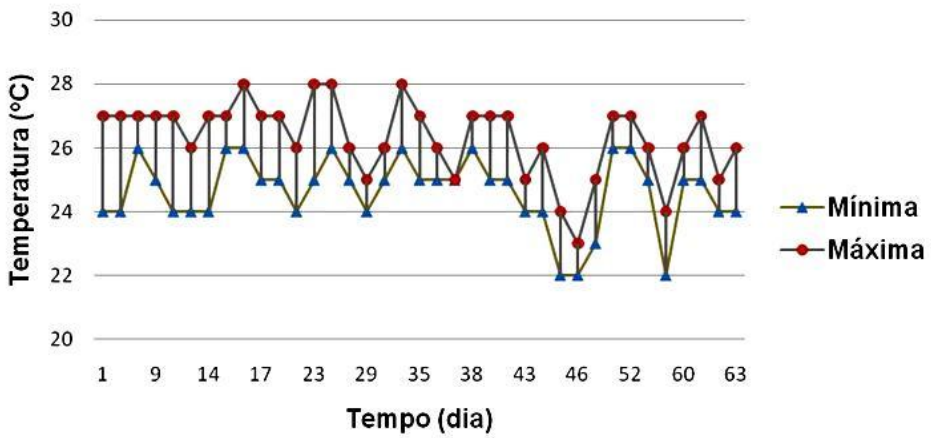


Figura 21 – Variação da temperatura ambiente do laboratório ao longo do período de 63 dias.

De acordo com a Figura 21, variações na temperatura ambiente fora da faixa de 25ºC - 30ºC foram observadas, mas na maior parte do tempo a temperatura manteve-se dentro da mesma.

3.4.2 Eficiência dos tratamentos

3.4.2.1 Remoção dos hidrocarbonetos

O óleo diesel é constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos (normais, ramificados e cíclicos) e alguns compostos aromáticos, os quais não podem ser

totalmente separados por cromatografia gasosa. De fato, somente os n-alcanos (alcanos normais) e alguns hidrocarbonetos ramificados podem ser identificados separadamente. Por isso, a maior fração de componentes do óleo diesel não é caracterizada, aparecendo no cromatograma como uma "lombada" denominada de mistura complexa não resolvida, que presumivelmente inclui alguns alcanos ramificados, cíclicos e aromáticos (MARCHAL et al., 2003; MARIANO, 2006).

No presente experimento, a remoção dos hidrocarbonetos alifáticos na faixa de C_{10}-C_{36} (n-alcanos) foi utilizada como parâmetro de avaliação da biodegradação do óleo diesel B5. A extensão da biodegradação também foi avaliada através do uso dos índices *n*-C_{17}/fitano e *n*-C_{18}/pristano (ROSA, 2001; ROSA; TRIGÜIS, 2006).

Ressalta-se que os n-alcanos não são considerados um grupo de elevada toxicidade a biota e seres humanos quando comparados aos compostos aromáticos. Contudo, são importantes indicadores de biodegradação, uma vez que são os primeiros compostos a serem degradados pelos micro-organismos. Sendo assim, quanto menor a quantidade desses compostos mais biodegradado estará o óleo (ROSA, 2001; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003).

A Figura 22 ilustra graficamente os teores médios de n-alcanos ($\sum C_{10}$-C_{36}) ao longo dos 63 dias de experimento, nos diferentes tratamentos. A quantificação analítica de cada n-alcano (C_{10}-C_{36}) nos diferentes tratamentos e intervalos amostrais adotados, encontra-se nas tabelas 15 e 16.

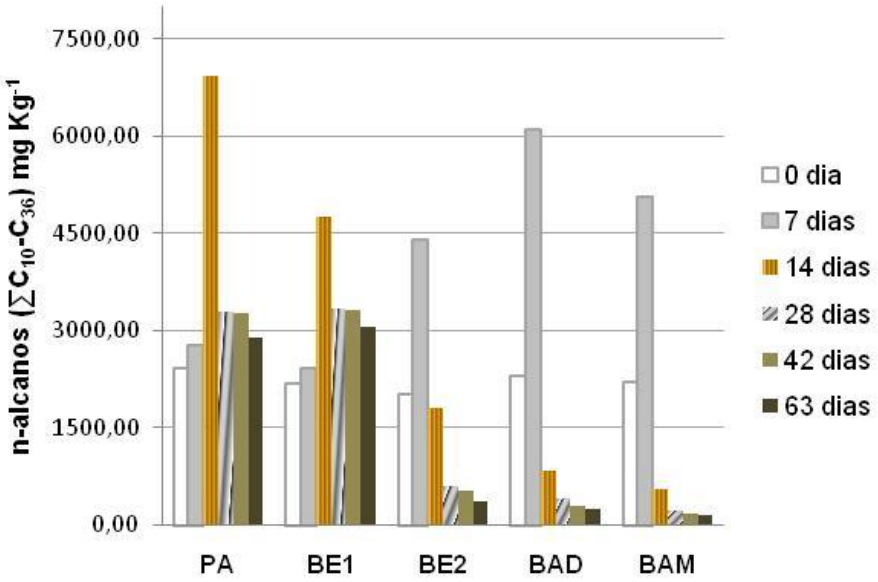


Figura 22 – Teores médios dos n-alcanos ($\sum C_{10}$-C_{36}) em mg kg^{-1}, nos diferentes tratamentos ao longo dos 63 dias de experimento.

Tabela 15 – Teores médios dos n-alcanos em mg kg^{-1} de solo, nos diferentes tratamentos adotados (microcosmos de bancada), nos períodos amostrais: 0, 7 e 14 dias.

	PA			BE_1			BE_2			BAD			BAM		
	0 dia	**7 dias**	**14 dias**	**0 dia**	**7 dias**	**14 dias**	**0 dia**	**7 dias**	**14 dias**	**0 dia**	**7 dias**	**14 dias**	**0 dia**	**7 dias**	**14 dias**
Alcano															
C10	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	12,41	N.D	N.D	25,19
C11	22,62	116,82	217,88	24,44	95,36	171,59	23,20	179,27	72,50	113,34	282,07	57,18	108,02	262,50	58,63
C12	96,29	214,80	507,87	97,33	183,91	374,56	92,70	332,70	134,64	193,69	509,33	46,07	187,22	415,76	29,92
C13	173,43	273,49	702,25	164,55	239,02	493,68	149,91	418,76	161,92	237,69	627,20	81,07	230,69	476,35	51,71
C14	249,20	306,90	809,98	222,31	272,06	558,24	191,67	483,12	187,78	260,36	696,85	126,09	250,53	539,96	38,11
C15	282,87	293,88	790,21	248,89	261,21	530,29	213,79	474,93	185,21	244,06	662,55	101,83	237,20	534,61	37,29
C16	254,92	268,21	681,21	228,50	231,02	474,66	198,29	435,75	186,97	217,63	584,81	84,63	207,79	484,95	56,01
C17	230,91	232,10	612,18	209,52	201,38	417,78	187,02	385,66	157,28	189,13	520,92	66,54	180,17	438,82	49,79
C18	201,52	201,17	508,48	187,83	174,16	349,87	166,77	319,86	133,12	161,92	426,41	56,96	152,63	360,47	44,19
C19	201,06	198,86	510,56	187,01	172,83	346,48	171,49	326,71	139,37	158,77	424,76	39,39	153,99	368,32	30,72
C20	154,10	148,81	378,23	139,40	128,82	255,56	131,30	246,46	99,86	117,88	318,61	35,95	114,58	274,29	26,32
C21	123,15	122,93	286,07	116,02	103,91	193,02	106,64	187,77	79,95	95,11	252,96	23,73	92,27	205,25	15,18
C22	113,77	109,31	271,36	104,94	95,41	181,00	99,20	178,20	76,96	86,79	228,67	27,19	83,84	204,18	18,63
C23	92,15	88,51	212,07	86,64	76,03	140,44	81,43	139,20	61,83	69,80	178,78	17,56	66,77	161,08	17,19
C24	59,85	54,32	135,53	51,49	46,92	91,52	52,11	88,73	40,73	43,90	116,27	12,67	47,26	102,00	8,81
C25	40,64	37,74	92,40	36,34	33,29	69,70	34,80	61,57	26,67	29,85	80,75	6,93	29,15	70,91	5,32
C26	34,08	31,61	76,12	31,39	27,51	50,43	29,51	50,39	23,37	24,77	66,80	9,43	24,04	58,09	7,78
C27	27,85	25,60	60,49	26,38	22,01	15,79	26,00	40,39	19,53	19,84	53,64	9,33	19,12	47,03	7,60
C28	20,60	18,76	4,97	19,23	15,83	13,17	18,25	30,81	3,62	14,06	3,85	6,48	13,78	5,92	7,35
C29	12,96	14,44	30,49	3,56	10,18	13,51	9,71	7,56	10,25	8,80	15,29	3,56	9,09	24,03	4,98
C30	11,40	3,82	8,68	3,75	5,75	10,51	14,84	6,49	5,04	5,58	8,73	4,70	7,01	15,03	5,16
C31	13,09	5,22	15,95	5,69	9,37	1,84	3,11	8,96	3,18	3,51	12,33	2,15	3,54	12,64	0,00
C32	N.D	N.D	3,37	N.D	N.D	0,95	0,00	1,36	0,91	N.D	3,39	N.D	N.D	3,69	2,46
C33	N.D	2,68	3,26	N.D	N.D	1,84	2,01	2,02	N.D	N.D	5,72	N.D	N.D	5,46	2,23
C34	N.D	N.D	13,97	N.D	N.D	2,44	2,18	3,53	N.D	N.D	16,32	1,80	N.D	N.D	N.D
C35	N.D	N.D	N.D	N.D	10,67	1,39	N.D	1,31	N.D	N.D	2,76	N.D	N.D	1,37	N.D
C36	N.D	7,28	2,41	N.D	N.D	N.D	2,39	3,86	N.D	N.D	3,88	N.D	N.D	1,79	5,35
Total	2416,46	2777,22	6935,93	2195,21	2416,60	4760,19	2008,28	4415,37	1810,66	2296,46	6103,58	833,58	2218,64	5074,44	555,87
Fit	80,80	57,63	68,75	64,72	62,82	81,51	69,80	137,10	174,08	174,47	211,79	140,14	85,42	100,82	114,84
Pri	128,88	79,30	101,58	93,90	100,31	116,20	101,06	201,80	254,57	247,61	302,99	222,03	118,76	149,17	157,65

Nota: N.D. = não detectável. Fit = fitano; Pri = pristano.

Tabela 16 – Teores médios dos n-alcanos em mg kg^{-1} de solo, nos diferentes tratamentos adotados, nos períodos amostrais: 28, 42 e 63 dias.

	PA			BE_1			BE_2			BAD			BAM		
	28 dias	**42 dias**	**63 dias**	**28 dias**	**42 dias**	**63 dias**	**28 dias**	**42 dias**	**63 dias**	**28 dias**	**42 dias**	**63 dias**	**28 dias**	**42 dias**	**63 dias**
Alcano															
C10	3,66	13,49	N.D.	16,65	4,68	N.D	10,28	3,27	N.D	10,45	2,10	N.D	3,51	3,02	N.D
C11	51,12	88,52	9,41	95,93	61,97	19,37	44,04	24,95	6,30	35,30	14,90	4,86	17,91	4,43	0,00
C12	192,56	226,39	101,63	240,21	211,38	134,70	44,18	36,22	18,98	26,33	17,40	11,08	13,78	6,64	3,11
C13	317,59	321,38	252,96	331,66	330,34	280,50	71,78	67,54	46,52	46,25	36,22	28,75	27,53	17,47	11,70
C14	368,92	356,19	338,91	362,68	375,65	353,73	57,66	54,55	40,58	31,97	23,05	15,76	8,70	1,83	1,84
C15	397,10	376,62	387,22	388,92	407,78	383,76	64,10	47,63	36,45	24,18	8,32	12,14	5,68	2,76	1,54
C16	358,69	339,99	332,33	341,81	350,75	340,29	62,70	59,75	45,85	42,70	33,92	27,59	27,06	21,81	22,15
C17	297,37	285,26	276,38	286,96	297,04	288,90	47,75	46,81	37,40	33,56	28,64	24,24	22,37	17,23	15,66
C18	249,16	239,90	229,36	241,73	248,53	241,21	41,09	38,72	32,18	29,78	23,97	16,70	4,77	3,09	16,00
C19	250,80	238,15	226,69	238,79	244,24	238,33	55,54	53,01	23,61	46,54	42,85	40,57	40,65	34,63	33,84
C20	186,33	178,53	169,47	180,10	185,98	180,14	23,69	23,28	19,13	17,15	14,69	12,14	10,77	11,92	7,55
C21	150,31	144,97	136,21	142,38	146,71	144,83	14,02	14,67	9,43	7,62	5,93	4,26	2,12	4,76	1,45
C22	137,50	132,01	122,63	131,36	135,59	132,28	17,22	16,79	12,51	11,73	7,90	4,40	6,31	5,23	5,05
C23	110,59	107,24	98,65	107,01	108,85	105,64	10,15	14,13	10,11	9,11	9,99	7,82	8,17	6,98	8,34
C24	62,49	60,49	58,00	63,86	62,92	61,23	8,34	7,03	5,38	4,63	3,06	3,98	1,96	3,96	4,51
C25	43,61	41,39	39,94	42,53	43,18	42,36	3,49	3,41	2,82	7,92	8,87	6,33	13,09	11,11	14,65
C26	37,55	36,33	34,83	35,06	37,06	35,28	5,80	5,59	4,46	4,22	2,82	2,34	2,44	3,37	3,22
C27	30,35	29,75	27,17	30,71	28,90	27,54	5,97	5,22	4,25	4,68	3,03	2,60	3,10	1,05	0,51
C28	22,61	21,70	20,74	20,13	20,54	20,22	5,31	4,95	4,53	5,27	3,62	2,91	3,31	2,92	2,58
C29	16,02	9,32	14,38	7,97	13,09	12,72	2,92	3,29	2,76	2,70	3,69	3,94	5,05	8,80	4,45
C30	4,04	12,59	3,46	3,85	3,85	6,00	4,15	3,77	3,82	4,24	4,92	3,34	4,27	7,34	3,25
C31	5,68	2,88	5,06	5,12	5,02	4,91	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,03	0,00	0,50
C32	2,34	0,85	1,28	0,00	N.D	1,30	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	1,16	0,00	0,52
C33	N.D	1,72	N.D	7,82	N.D	N.D	2,00	N.D	N.D	N.D	N.D	2,17	N.D	3,32	0,44
C34	1,42	1,44	N.D	2,90	N.D	N.D	2,56	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
C35	N.D	N.D	N.D	11,24	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
C36	N.D	2,65	N.D	8,11	N.D	N.D	3,87	N.D	N.D	0,03	N.D	6,61	N.D	5,08	N.D
Total	3297,75	3269,70	2886,66	3345,43	3324,01	3055,18	608,55	534,52	367,04	406,28	299,84	244,48	233,68	188,70	162,86
Fit	92,68	90,05	96,24	104,79	107,75	111,73	92,92	91,81	102,80	101,01	97,69	90,50	95,67	104,17	98,95
Pri	152,86	146,76	125,37	131,39	133,08	153,62	150,71	129,31	130,32	124,35	154,76	153,60	120,04	128,57	122,05

Nota: N.D. = não detectável. Fit = fitano; Pri = pristano.

Um aumento expressivo do teor de n-alcanos (Σ C_{10}-C_{36}) foi observado em todos os tratamentos adotados, nas primeiras semanas após o início do experimento (Figura 22). Nos tratamentos PA e BE_1 esse aumento foi observado nos 14 primeiros dias, quando a concentração dos hidrocarbonetos foi duas vezes maior do que a registrada no dia 0. Nos tratamentos BE_2, BAD e BAM, o aumento foi observado apenas nos 7 primeiros dias, mas também, em uma ordem de magnitude duas vezes maior que a inicial. Tal aumento poderia, a princípio, estar relacionado a uma baixa recuperação de extração no instante inicial (dia 0), porém, tal hipótese foi descartada, já que a eficiência de recuperação do padrão de extração (*surrogate*) nos períodos abordados foi em média de 96,5%.

O aumento da concentração de hidrocarbonetos ocorrido no presente experimento, particularmente nos períodos iniciais, não é um fato comumente reportado na literatura, embora já tenha sido descrito anteriormente (LÓPEZ, MUELLER, 2009; OLIVEIRA et al., 2007). Normalmente, o que se observa é um decréscimo nos teores desse parâmetro em função tanto do processo de volatilização dos compostos mais leves, quanto do consumo dos mesmos pelos micro-organismos como substratos (fonte de alimento). No entanto, decréscimos dos teores de n-alcanos só foram observados a partir do 14º dia para os tratamentos PA e BE_1, e a partir do 7º dia para os tratamentos BE_2, BAD e BAM, o que sugere claramente que os aditivos adicionados nesses três últimos tratamentos (nutrientes e/ou nutrientes + inóculo KMA), aceleraram o processo de remoção dos n-alcanos.

López e Mueller (2009) investigaram em condições laboratoriais, a biodegradação de hidrocarbonetos de um solo contaminado por combustíveis proveniente de um posto de serviço e observaram um aumento da concentração dos hidrocarbonetos na faixa do diesel (HTP-DRO). No entanto, tal aumento ocorreu 120 dias após o início do experimento, quando já havia sido observada uma redução significativa de hidrocarbonetos nos 100 primeiros dias. De acordo com tais autores, o aumento dos HTP-DRO observado está relacionado ao processo de degradação desses compostos, que por apresentarem cadeias hidrocarbônicas mais longas, são, primeiramente, quebrados em cadeias mais curtas, para depois serem degradados, proporcionando, inicialmente, um aumento na concentração total. Essas quebras podem dar origem a compostos intermediários que são detectados pelo método cromatográfico usado para medição dos hidrocarbonetos totais.

Nesse contexto, cabe mencionar que o biodiesel, particularmente o de soja, é constituído por ésteres de cadeia carbônica insaturada bastante susceptível as reações de auto-oxidação e fotodegradação (VECCHI et al., 2005). Estas reações, por sua vez, resultam na quebra dos ésteres e na formação de diferentes compostos secundários que incluem, dentre

outros, epóxidos, hidroperóxidos, aldeídos, alcoóis, cetonas e hidrocarbonetos saturados de cadeias menores (LEITE, 2007). Uma vez que essas reações podem ser favorecidas por condições ambientais como luz, temperatura e umidade, hidrocarbonetos menores podem ser originados através da própria oxidação química do biodiesel (LEITE, 2007).

Oliveira et al (2007) investigando a eficácia da biorremediação de solo contaminado por diesel e diesel B5 em um sistema de reatores aeróbios (escala piloto) também observaram um aumento dos hidrocarbonetos de cadeia aberta (C_{10}-C_{36}) 30 dias após o início do experimento, particularmente, no reator contendo apenas solo contaminado por diesel B5. Segundo os autores, o aumento pode ter ocorrido por interconversão de n-alcanos, especialmente os de cadeias mais longas em cadeias mais curtas.

Oliveira, Baisch e Machado (2007), através de um derramamento controlado, avaliaram o tempo de degradação dos componentes de um petróleo leve em um solo arenoso de modo a verificar a evolução e os constituintes remanescentes desta degradação. Após 4 dias do início do experimento tais autores observaram uma elevação na concentração dos hidrocarbonetos com menos de 28 átomos de carbono, fato que influenciou o aumento dos teores totais de hidrocarbonetos alifáticos. A elevação da concentração, segundo os autores, foi provavelmente causada pelo crescimento da microbiota local, uma vez que foi observada uma elevada concentração de pristano no mesmo período abordado, sendo este composto característico do metabolismo dos micro-organismos. Ressalta-se que no período abordado não foi observado pelos autores um aumento dos hidrocarbonetos de maior peso molecular ($>n$-C_{20}).

Analisando-se individualmente os teores de n-alcanos do presente experimento (Tabelas 15 e 16), dois aspectos descritos por Oliveira, Baisch e Machado (2007) foram observados: aumento considerável da concentração de hidrocarbonetos com menos de 28 átomos de carbono nos períodos amostrais onde ocorreram elevações no teor total de n-alcanos ($\sum C_{10}$-C_{36}); elevada concentração de pristano nos mesmos períodos amostrais. Nos tratamentos PA e BE_1, tais aumentos foram observados nos primeiros 14 dias após o início do experimento, e nos tratamentos BE_2, BAD e BAM, particularmente, nos 7 primeiros dias. Nos mesmos períodos abordados também foi verificado um aumento da biomassa microbiana nos tratamentos adotados (Figura 19). No entanto, tal crescimento em todos os tratamentos foi considerado similar em termos estatísticos, com exceção do ocorrido no PA na primeira semana, o que implica em dizer, que quantitativamente, a biomassa microbiana heterotrófica total foi praticamente equivalente, independente das condições experimentais adotadas.

Cabe mencionar que nas duas primeiras semanas (7-14 dias) de experimento não foi observado um aumento acentuado dos hidrocarbonetos com 30 ou mais átomos de carbono (C_{30}-C_{36}) nos tratamentos adotados. Em alguns tratamentos tais compostos sequer foram detectados (Tabela 15).

O pristano (2,6,10,14 – tetrametilpentadecano) é um alcano isoprenóide de cadeia ramificada formado a partir da reunião de isoprenos (estrutura básica formada por cinco átomos de carbono) (ROSA, 2001). Esse isoprenóide conjuntamente com o fitano (2,6,10,14 – tetrametilhexadecano), constituem a principal classe de alcanos ramificados encontrados no petróleo e derivados, sendo muito utilizados para avaliar a origem de hidrocarbonetos em sedimento (DEL ROSSO, 2005; STEFENS, 2006). Além de origem petrogênica, tais compostos também podem ser de origem biogênica, sendo o pristano o mais comumente biossintetizado. O mesmo é produzido a partir do fitol, um álcool abundante na natureza constituinte da clorofila-a ou de organismos marinhos que contenham fitol em sua composição, tais como zooplâncton, fitoplâncton e bactérias (DEL ROSSO, 2005; STEFENS, 2006).

O pristano e o fitano são moléculas orgânicas resistentes a alterações químicas no ambiente. Os mesmos têm sido empregados como indicadores da biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos saturados pela medida das razões de *n*-C_{17}/pristano e *n*-C_{18}/fitano, uma vez que os *n*-alcanos C_{17} e C_{18} são mais facilmente biodegradados que os isoprenóides correspondentes, pristano e fitano. Assim, baixos valores para esses índices (<1) são indicativos da presença de óleo biodegradado, enquanto índices mais altos (>1), sugerem baixa biodegradação (DEL ROSSO, 2005; LIMA et al., 2007; ROSA, 2001). As Figuras 23 e 24 ilustram, respectivamente, as razões *n*-C_{17}/pristano e *n*-C_{18}/fitano nos diferentes tratamentos ao longo do experimento.

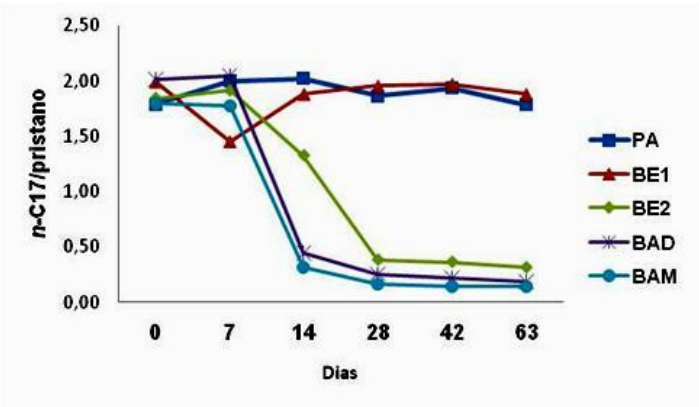


Figura 23 – Razões *n*-C_{17}/pristano nos tratamentos adotados ao longo dos 63 dias de experimento.

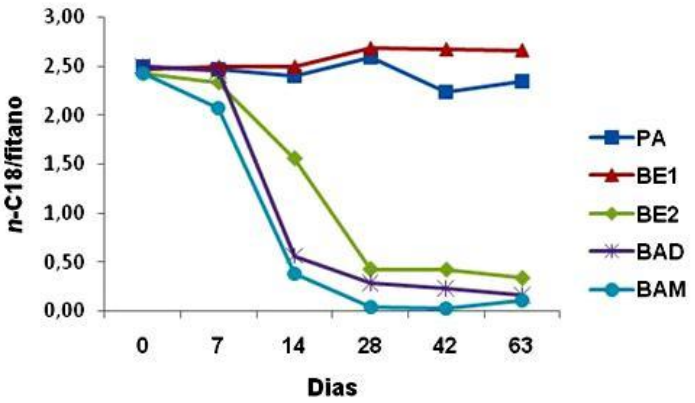


Figura 24 – Razões n-C_{18}/fitano nos tratamentos adotados ao longo dos 63 dias de experimento.

Nos tratamentos PA e BE_1 as razões n-C_{17}/pristano e n-C_{18}/fitano obtidas foram altas e mantiveram-se praticamente constantes ao longo do experimento, indicando, portanto, baixa biodegradação do óleo diesel B5. No caso do bioestímulo (BE_1), ainda foi observado um leve aumento da razão n-C_{18}/fitano, ao final do experimento. Já nos tratamentos BE_2, BAD e BAM, houve uma considerável redução nos valores dessas razões, confirmando a aceleração da biodegradação, e indicando que as condições adotadas (bioestímulo e/ou bioaumento) tiveram influência nos referidos tratamentos. Além disso, tais reduções também corroboram com a ordem crescente de susceptibilidade dos hidrocarbonetos ao ataque microbiano reportada na literatura, na qual os alcanos lineares são mais susceptíveis à biodegradação que os alcanos ramificados (ROSA, 2001; ROSA; TRIGUIS, 2006; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003).

Analisando-se o conjunto de tratamentos, observa-se que a redução das razões n-C_{17}/pristano e n-C_{18}/fitano já era bem acentuada no 14º dia nos tratamentos de bioaumento associado ao bioestímulo (BAD e BAM), e menos acentuada no tratamento de bioestímulo apenas BE_2. Tais resultados sugerem a existência de um benefício do bioaumento associado ao bioestímulo na biodegradação dos n-alcanos.

As porcentagens de remoção de n-alcanos ao final do experimento (63 dias) em relação ao dia 0 foram bastante expressivas para os tratamentos BE_2 (81,7%), BAD (89,4%) e BAM (92,7%), mesmo tendo ocorrido um aumento generalizado de compostos na 1º semana após o início do experimento. Diferentemente, nos tratamentos PA e BE_1 a concentração de n-alcanos ao final do experimento foi superior a inicial (0 dia), embora reduções tenham ocorrido do 14º ao 63º dia. No PA essa redução foi de 58,4% enquanto que no BE_1 a mesma

foi de 35,8%. Provavelmente, condições mais desfavoráveis à biodegradação, associada ao aumento dos hidrocarbonetos ocorrido nas primeiras semanas, tenham contribuído para que os referidos tratamentos ainda permanecessem com concentração superior em relação ao dia 0.

Levando-se em consideração a presença de micro-organismos no tratamento PA, não foi possível separar de forma clara os processos abióticos dos processos bióticos. Por isso, as reduções nos teores de hidrocarbonetos observadas nesse tratamento a partir do 14º dia podem ser resultantes tanto de processos abióticos, como volatilização, fotodegradação, entre outros, quanto de processos bióticos (biodegradação microbiana). Entretanto, comparando o tratamento PA com os tratamentos BE_2, BAD e BAM, é bastante nítida a influência dos ajustes de pH e nutrientes associados à inoculação com microorganismos no processo de remoção dos hidrocarbonetos.

De modo geral, o bioestímulo do solo com nutrientes, BE_2, mostrou-se bastante benéfica, quando comparado ao tratamento somente com aeração e ajuste de umidade e pH (BE_1), corroborando com outros estudos que têm demonstrado que a aplicação de nutrientes realmente acelera o processo de biodegradação natural do óleo pela comunidade microbiana autóctone (CHAGAS-SPINELLI, 2007; ROSA, 2001). Entretanto, embora aos 14 dias tenha sido observada uma redução nitidamente superior nos tratamentos BAD e BAM comparados com os demais, a associação de nutrientes e micro-organismos, nesses tratamentos, não se mostrou a longo prazo, mais eficiente que o bioestímulo por ajuste de pH e adição de nutrientes BE_2 (teste *Turkey*; $p<0,05$), indicando que a introdução do consórcio microbiano não apresentou influência significativa no processo de biodegradação. Chagas-Spinelli (2007) avaliou a eficiência de remoção de hidrocarbonetos poliaromáticos e óleos e graxas (OG) de um solo argiloso contaminado experimentalmente com óleo diesel e também observou que a remoção dos compostos no tratamento bioestimulado e bioaumentado (nutrientes + inóculo) foi estatisticamente similar à observada no tratamento apenas bioestimulado. De maneira geral, o acréscimo de nutrientes foi bastante promissor entre os tratamentos testados (*landfarming* e bioestímulo + bioaumento) pelo autor.

Mathew et al (2006) avaliaram o desempenho de micro-organismos nativos na biorremediação de um solo contaminado experimentalmente por óleo diesel. Os resultados confirmaram o potencial biodegradador da população indígena quando bioestimulada pela adição de nutrientes (fertilizante NPK). Depois de 60 dias do início do experimento, houve uma redução de 53% dos HTP comparado ao controle sem adição de nutrientes. Já nos tratamentos enriquecidos com cultura microbiana comercial, a remoção foi de 25% para o mesmo período abordado.

Segundo Jorgensen, Puustinen e Suortti (2000) a introdução de micro-organismos no solo, na maioria dos casos, não é uma estratégia muito promissora, sendo mais vantajoso criar condições favoráveis ao crescimento dos micro-organismos nativos do solo do que adicionar micro-organismos exógenos. Tais autores avaliaram o efeito de dois inóculos comerciais no tratamento de um solo contaminado por óleo lubrificante através da técnica de biopilhas (escala de campo) e verificaram que o bioaumento não exerceu influência significativa na eficiência do processo.

Por outro lado, há estudos nos quais o bioestímulo (introdução de nutrientes) não apresenta influência no processo de biodegradação (RIFFALDI et al., 2006; SEKLEMOVA; PAVLOVA; KOVACHEVA, 2001) e outros em que o bioaumento mostra-se bastante eficiente (BENTO et al., 2005). Liu et al (2008) estudaram diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de um solo contaminado por óleo diesel em colunas de solo e verificaram que o bioaumento foi o mais eficiente na remoção de hidrocarbonetos de petróleo (80%) entre os tratamentos testados. Os dois tratamentos de bioestímulo, um com nutrientes e outro com biossurfactante, apresentaram, remoções de 67% e 45%, respectivamente.

No presente experimento, embora a associação de nutrientes e micro-organismos tenha promovido um percentual de remoção muito próximo daquele obtido somente com nutrientes, uma observação cuidadosa da Figura 25, permite verificar que a remoção de n-alcanos nos tratamentos com bioaumento associado ao bioestímulo (BAD e BAM) foi consistente e levemente superior ao tratamento somente com bioestímulo (BE_2), do 7º dia até o 63º dia.

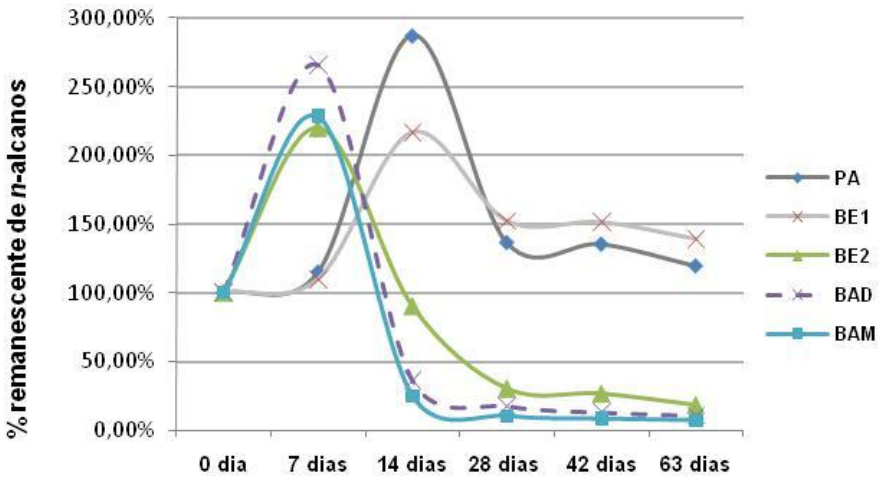


Figura 25 – Porcentagem dos n-alcanos ($\sum C_{10}$-C_{36}) remanescente nos tratamentos adotados ao longo do experimento.

Ao comparar os dois tratamentos que receberam inóculo KMA (BAD e BAM), verificou-se também um desempenho levemente superior do BAM, com diesel e biodiesel, em relação ao BAD, apenas diesel, em termos de remoção percentual dos teores de n-alcanos, fato que poderia estar associado à uma maior disponibilidade dos hidrocarbonetos aos micro-organismos degradadores em função da propriedade emulsificante do biodiesel presente no BAM. Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Oliveira et al (2007) do mesmo grupo de pesquisa BioProcess, UERJ, que investigaram a biorremediação de solo contaminado por óleo diesel e diesel B5 em biorreatores aeróbios. Ao comparar o reator que recebeu solo contaminado por diesel B5 + composto (Bio-2) com o reator que recebeu solo contaminado apenas por diesel + composto (Bio-3), aqueles autores também observaram um desempenho levemente superior do primeiro reator contendo mistura diesel/biodisel em relação ao reator contendo apenas diesel.

Taylor e Jones (2001) investigaram em laboratório e em campo a biorremediação dos HPAs presentes no piche de carvão através da adição de biodiesel e diesel de petróleo. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que o biodiesel é capaz de solubilizar e aumentar a biodisponibilidade dos HPAs do piche nos solos e, por consequência, promover um aumento da biodegradação dos mesmos. Miller e Mudge (1997) investigaram o efeito do uso de biodiesel na mobilidade e degradação de óleo cru em colunas de areia e também observaram um aumento na biodegradação de HPAs devido ao aumento da dispersão do óleo nos sedimentos.

Ressalta-se, no entanto, que o desempenho superior observado em termos de redução dos hidrocarbonetos, especialmente dos n-alcanos, na presença do biodiesel necessita de investigação mais aprofundada para a confirmação, uma vez que alguns trabalhos têm reportado que a biodegradação dos hidrocarbonetos não é significativamente acelerada pela presença de biodiesel (DeMELLO et al., 2007; MARIANO et al., 2008; OWSIANIAK et al., 2007).

3.4.2.2 Remoção de carbono orgânico total (COT)

A quantificação do carbono orgânico total do solo tem sido um dos parâmetros utilizados para se avaliar a eficiência do processo de biodegradação (CHAGAS-SPINELLI, 2007; CHIEREGATI; SILVA; RIZK, 2007; PALA, 2004). A Figura 26 mostra os teores

médios de COT das amostras de solo no início e final do experimento nos diferentes tratamentos adotados.

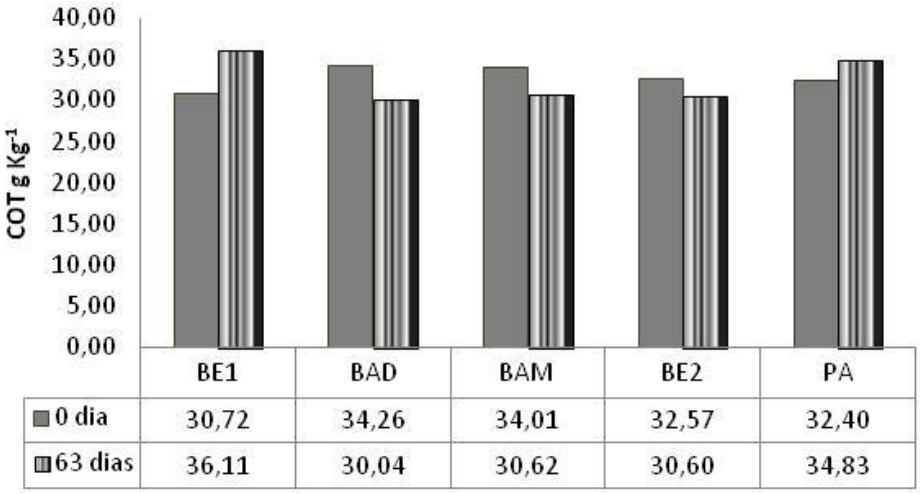


Figura 26 – Teores médios de COT (g kg^{-1}) no início e final do 1º experimento de biodegradação.

Observou-se que, após contaminação do solo com óleo diesel B5 e introdução dos agentes estimulantes (nutrientes e inóculo), houve um aumento médio no teor de COT em relação ao solo *in natura* (Tabela 10) de aproximadamente 7,0 vezes. Nos tratamentos BAD e BAM esse aumento foi levemente maior que a média dos demais tratamentos, provavelmente, em função da adição do inóculo comercial KMA, que também adiciona carbono orgânico celular. Segundo Araújo e Monteiro (2007) e Siqueira e Moreira (2006) a biomassa microbiana representa um dos principais componentes vivos da fração orgânica do solo, e a proporção de células microbianas vivas contendo carbono, geralmente, compreende de 1 a 5% do carbono orgânico total do solo.

É possível observar que todos os tratamentos que promoveram uma redução nos n-alcanos, a saber, BE_2, BAD e BAM (Figura 22) também apresentaram uma redução no COT ao final dos 63 dias (6,0%, 12,3% e 10,0%, respectivamente, Figura 26). Entretanto, uma pequena elevação do teor COT foi observado justamente nos tratamentos que não apresentaram remoção de n-alcanos, a saber, PA e no BE_1. Os percentuais de remoção de n-alcanos ao final do experimento em relação ao dia 0, observados para os tratamentos BE_2, BAD e BAM, foram considerados estatisticamente similares (teste *Turkey;* $p<0,05$). A elevação foi estatisticamente significativa no tratamento BE_1, porém não significativa no tratamento PA (teste *Turkey*; $p<0,05$). Acredita-se que tal fato possa ser resultante de uma amostragem não representativa ou possa estar associado a erro analítico. Neste caso, a

interpretação mais adequada dos dados seria que os teores de COT permaneceram aproximadamente inalterados no BE_1 e no PA.

Chieregati, Silva e Risk (2007) investigaram em microcosmos de bancada (recipientes plásticos de 7 L) o processo natural de biorremediação de um solo contaminado por óleo diesel, durante 60 dias, e observaram um aumento do teor percentual de carbono orgânico durante os primeiros 15 dias no solo contaminado com 5% e 10% p/p de óleo diesel. No caso do solo contaminado com 5% de óleo, novo aumento no teor desse parâmetro foi observado a partir do 30º dia, perdurando até o 45º dia. Em relação ao solo contaminado com 10%, tal fato foi observado somente nos 15 dias inicias.

De acordo com os autores, nos primeiros 15 dias, a quantidade de carbono orgânico proveniente do óleo diesel foi consumida pelos micro-organismos inicialmente presentes no meio, fazendo com que os mesmos se reproduzissem em grande número. Porém, ao longo dos dias, muitos micro-organismos morreram por competição de nutrientes e substratos, aumentando assim, a quantidade de carbono orgânico no solo devido à biomassa morta. Após o intervalo de 15 dias, os micro-organismos sobreviventes passaram a consumir o carbono orgânico remanescente, o que ocasionou novamente o aumento da população microbiana. Ainda segundo esses autores, o sistema buscou constantemente atingir um equilíbrio entre produção e consumo de carbono orgânico, ora removendo, ora aumentando os teores desse parâmetro. No caso do solo contaminado com 10% p/p de óleo, o equilíbrio foi mais facilmente atingido, apresentando, por isso, maior porcentagem de remoção a parti do 15º dia ao 45º dia.

Chagas-Spinelli (2007), em seus estudos, também não encontrou diferenças na eficiência de remoção de carbono orgânico entre os tratamentos adotados após 129 dias do início do experimento. Os percentuais de remoção foram: 25,2% (*Landfarming)*; 30,2% (bioestímulo); e 34,4% (bioestímulo + bioaumento). Tal autor, também observou que não houve um patamar claramente definido quanto à estabilização do percentual de remoção de carbono orgânico.

3.5 Ensaios de biodegradação em respirômetros de Bartha

3.5.1 pH, umidade e temperatura

A Tabela 17 apresenta os resultados de pH e umidade das amostras de solo no início e final da respirometria, para as diferentes condições testadas.

Tabela 17 – Valores médios de pH e umidade das amostras de solo no início e final da respirometria. Média de duplicatas.

Tratamento	pH		Umidade (%)	
	0 dia	29 dias	0 dia	29 dias
CB	7,17	6,59	7,26	6,13
PA	8,15	8,10	7,64	6,89
ATN	6,90	6,52	7,36	6,89
BKNA	6,84	6,95	7,59	6,32
BKA	6,96	6,98	7,38	6,09
BRES	6,86	6,45	7,55	6,33

Em todas as condições, com exceção do controle de processos abióticos (PA), os valores de pH inicial e final permaneceram próximos de 7,0. No caso dos processos abióticos, o pH mais elevado, tanto no início, quanto no final do ensaio deveu-se, provavelmente, `a presença da azida de sódio, adicionada ao mesmo como agente esterilizante. Diferentes estudos têm relatado o aumento do pH do solo na presença da azida, estando o mesmo associado à oxidação dessa substância em amônia, na solução do solo (CHEFETZ et al., 2006; SILVA, 2004; TREVORS, 1996).

Silva (2004), por exemplo, observou elevados valores de pH (9,5) nos tratamentos controles que receberam azida de sódio, quando investigou a utilização da tecnologia de biopilhas na biorremediação de solo contaminado por óleo diesel. Skipper e Westermann (1973) compararam os efeitos de diferentes agentes esterilizantes nas propriedades do solo e observaram um aumento de 0,5 a 1,1 unidades no valor final do pH quando o solo foi tratado com azida sódica. Wolf et al (1989) também investigaram a eficácia de diferentes agentes esterilizantes em solo e observaram um aumento médio do pH em 0,7 e 0,3 unidades.

Em relação à umidade, observa-se que os valores iniciais foram levemente inferiores ao valor de 50% da capacidade de campo. Após 29 dias de incubação esses valores apresentaram, em média, redução de 1,0%.

Durante o período do experimento, a temperatura de incubação dos ensaios respirométricos foi controlada de modo a ser mantida na faixa de 28 ºC ± 0,2 ºC, recomendada pela metodologia adotada (ABNT, 1999). A Figura 27 ilustra a variação da temperatura de encubação ao longo do experimento.

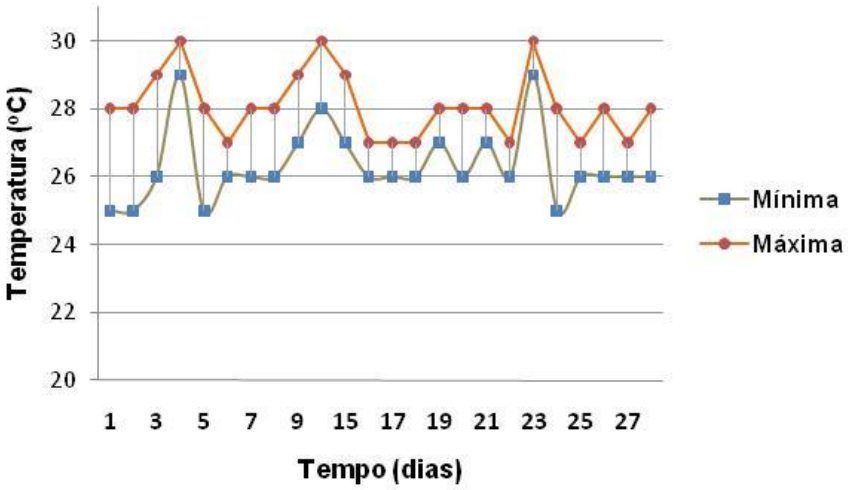


Figura 27 - Variação da temperatura de incubação ao longo dos 29 dias de respirometria.

Variações da temperatura de incubação fora da faixa de 28 ºC ± 0,2 ºC foram observadas, mas na maior parte do tempo a temperatura manteve-se dentro da faixa. A temperatura mais baixa registrada durante a incubação foi de 25 ºC e a mais alta de 30 ºC. Em média a temperatura oscilou de 26,4 ºC a 28,0 ºC. No mesmo dia, a temperatura mínima e a máxima variaram na faixa de 1,0-2,0 ºC.

3.5.2 COT e quantificação microbiana heterotrófica total

A Tabela 18 apresenta os teores de carbono orgânico (COT) em cada tratamento no início do ensaio respiromêtrico (dia 0), assim como a quantificação dos micro-organismos heterotróficos totais no início e término do experimento.

Tabela 18 – Tores médios de COT e quantificação da população microbiana heterotrófica total nos ensaios de respirometria.

Tratamento	COT g kg^{-1} de solo(1)	Micro-organismos heterotróficos totais UFC g^{-1} de solo(2)	
	0 dia	0 dia	29 dias
CB	4,87	1,19 x 10^7	7,53 x 10^7
PA	22,80	2,15 x 10^6	1,07 x 10^6
ATN	25,29	1,46 x 10^6	1,35 x 10^7
BKNA	23,66	1,39 x 10^7	1,65 x 10^8
BKA	24,28	1,46 x 10^6	1,76 x 10^7
BRES	24,95	1,54 x 10^7	9,10 x 10^7

Notas: (1) média de triplicatas; (2) média de duplicatas (placas).

Observou-se que, após contaminação do solo com óleo diesel B5, houve um aumento médio no teor de COT em relação ao solo *in natura* (CB) de aproximadamente 5,0 vezes. No experimento anterior esse aumento foi de 7,0 vezes, aproximadamente.

Com relação à população microbiana heterotrófica total, verifica-se que quantitativamente a mesma não foi consideravelmente diferente ao final do experimento (29 dias) em relação ao dia 0 (início). Houve aumento da população em uma ordem de grandeza para todas as condições, exceto o controle abiótico que apresentou leve decaimento. Os valores similares da população microbiana nos tratamentos bioaumentados (BKA, BKNA e BRES) em relação à do solo *in natura*, sugere que as culturas microbianas adicionadas não aumentaram consideravelmente a população heterotrófica total. Contudo, através do monitoramento da evolução de CO_2, que será mostrado mais adiante, foi possível verificar diferenças significativas na taxa de biodegradação (C-CO_2) entre os tratamentos bioaumentados, o controle abiótico e a atenuação natural.

Assim como no experimento anterior, o controle abiótico despertou atenção por novamente apresentar uma considerável população microbiana heterotrófica total, particularmente ao final do experimento, sugerindo que a quantidade de azida sódica adicionada (0,3% p/p) não foi suficiente para eliminar todos os micro-organismos nativos do solo. Trindade (2002), em seus experimentos de biodegradação, também observou crescimento microbiano no controle abiótico no qual o solo recebeu a mesma quantidade de azida sódica. Silva (2004), em seus estudos de biorremediação de solo contaminado por óleo diesel usando biopilhas, realizou adições periódicas de solução de azida sódica 2% no controle abiótico, mas também observou a presença de bactérias heterotróficas totais nos mesmos, após 60 dias do início do experimento. Seabra (2005) também usou azida sódica na

proporção de 0,3% par investigar em de biopilhas o processo abiótico de um solo contaminado com óleo cru e verificou alta concentração de micro-organismos ao final do experimento.

A azida sódica é um biocida comumente utilizado como agente esterilizante em muitos experimentos laboratoriais de biodegradação e até mesmo de sorção de contaminantes (CHAGAS-SPINELLI, 2007; CHEFETZ et al., 2006; ENELL et al., 2004). No entanto, segundo Enell et al (2004) a azida sódica, na verdade, não é um esterilizante, mas sim um inibidor da atividade biológica, perdendo seu efeito ao longo do tempo, possivelmente, devido a oxidação da azida em amônia. Por isso, a supressão da atividade microbiana pode não ser completa. Rozycki e Bartha (1981) ressaltam que a perda gradual do efeito inibidor da azida sobre os micro-organismos pode resultar na recuperação parcial da atividade microbiana, proporcionando interpretações errôneas na distinção entre a degradação por processos abióticos e bióticos. Cabe mencionar, que de acordo com Trevors (1996), a azida, quando utilizada como inibidor microbiano, deve ser adicionada ao solo várias horas antes do início do experimento. No presente estudo, a adição da azida foi realizada cerca de 2 horas antes da montagem dos respirômetros. Tal fato pode ser a causa da considerável presença de micro-organismos heterotróficos totais no dia 0 (dia da montagem).

3.5.3 Decaimento dos hidrocarbonetos (n-alcanos C_{10}-C_{36}) e produção de CO_2

A Tabela 19 apresenta os teores médios da fração de n-alcanos (ΣC_{10}-C_{36}) quantificada no início e final dos ensaios respirométricos para os tratamentos testados.

Ao final de 29 dias observou-se remoção de n-alcanos em todos os tratamentos testados, inclusive no controle abiótico. Entretanto, maiores remoções de n-alcanos ocorreram nos tratamentos bioaumentados, particularmente naqueles que receberam inóculos aclimatados (BKNA e BRES).

Comparando-se os tratamentos bioaumentados com consórcio comercial KMA (BKNA e BKA) observa-se que a aclimatação exerceu um efeito positivo no desempenho deste consórcio quanto à remoção dos hidrocarbonetos. O bioaumento com inóculo aclimatado (BKA) apresentou uma eficiência de remoção de n-alcanos de 34,89%, ou seja, duas vezes maior que a do bioaumento com inóculo sem aclimatação (BKNA), que foi apenas de 16,76%. Tal fato também pode ser corroborado pela pequena diferença observada na remoção dos hidrocarbonetos entre o bioaumento BKNA e a atenuação natural.

Tabela 19 - Teores médios dos n-alcanos (ΣC_{10}-C_{36}) em mg kg^{-1} de solo, no início e final dos ensaios respirométricos.

	PA		ATN		BKNA		BKA		BRES	
n-alcano	**0 dia**	**29 dias**	**0 dia**	**29 dias**	**0 dia**	**29 dias**	**0 dia**	**29 dias**	**0 dia**	**29 dias**
C10	2,04	0,82	1,88	0,51	2,94	0,46	2,75	0,35	2,35	0,58
C11	14,42	6,11	13,24	7,74	17,51	6,79	16,25	5,68	14,45	4,80
C12	20,00	13,76	18,60	16,06	23,06	14,59	22,20	11,93	20,12	9,91
C13	23,69	20,34	22,62	22,63	27,96	22,70	26,51	17,85	25,87	13,48
C14	26,52	25,30	26,74	26,60	29,34	26,40	29,73	21,42	28,73	15,93
C15	24,60	24,86	26,40	26,12	26,62	25,66	27,73	20,36	27,78	15,02
C16	23,31	23,61	26,74	23,20	25,26	22,28	26,22	17,95	25,90	13,84
C17	20,29	20,70	23,36	19,93	21,72	19,30	22,59	15,37	22,38	12,10
C18	16,40	16,67	18,88	15,78	17,28	15,22	18,14	12,23	17,93	9,92
C19	15,44	15,63	17,60	14,82	16,23	14,44	17,08	11,54	16,93	9,91
C20	10,85	11,15	12,70	10,53	11,38	11,75	12,12	9,21	11,92	7,87
C21	8,17	8,37	9,48	8,00	8,51	8,87	9,10	6,85	9,03	5,90
C22	6,60	6,71	7,50	6,42	6,89	6,43	7,33	4,98	7,18	4,31
C23	4,60	4,81	5,44	4,59	5,02	4,67	5,22	3,55	5,18	3,21
C24	3,71	3,80	4,22	3,71	3,98	3,84	4,08	2,84	4,13	2,56
C25	3,02	2,99	3,34	3,06	3,19	3,29	3,49	2,44	3,37	2,31
C26	1,92	1,68	1,78	1,67	1,64	1,76	1,84	1,27	1,83	1,31
C27	1,67	1,23	1,34	1,28	1,34	1,44	1,41	1,04	1,37	0,97
C28	1,38	0,79	0,82	0,79	0,74	0,86	0,86	0,58	0,87	0,65
C29	0,31	0,39	0,38	0,36	0,34	0,44	0,47	0,32	0,40	0,32
C30	0,19	0,24	0,24	0,24	0,21	0,32	0,25	0,21	0,25	0,23
C31	1,02	0,51	0,64	0,12	0,91	0,34	0,45	0,20	0,35	0,24
C32	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,33	N.D.
C33	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,30	N.D.
C34	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C35	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C36	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total	230,15	210,49	243,94	214,15	252,09	209,83	255,80	166,57	248,97	134,02
Pri	9,40	9,54	11,42	9,14	9,89	9,14	10,35	6,94	10,93	7,25
Fit	6,73	7,11	7,68	6,51	8,43	6,49	7,47	5,17	7,25	5,25

Nota: N.D. = não detectado; Pri = pristano; Fit = fitano.

O bioaumento BRES, por sua vez, apresentou uma eficiência na remoção de n-alcanos de 46,17%, valor levemente superior a do bioaumento com o consórcio comercial BKA

aclimatado. Porém, comparado ao bioaumento com o consórcio KMA não aclimatado (BKNA), a eficiência foi aproximadamente três vezes maior.

A Tabela 20 apresenta a quantidade de CO_2 produzida diariamente em cada condição experimental durante os 29 dias de incubação. A partir dos dados apresentados nessa tabela, foi calculada a quantidade de CO_2 produzida por biodegradação, conforme seção 2.6.10. A Figura 28 ilustra os dados apresentados nesta Tabela. A Figura 29 ilustra a produção acumulada de CO_2 produzida por biodegradação ao longo do período de incubação.

Tabela 20 – Quantidade diária de CO_2 produzida durante os 29 dias de incubação. Média de triplicatas.

Dia	**Quantidade diária de CO_2 mg $50g^{-1}$ solo**					
	CB	**PA**	**ATN**	**BKNA**	**BKA**	**BRES**
1	8,44 ± 0,25	2,84 ± 0,58	4,51 ± 0,67	6,26 ± 0,50	3,13 ± 0,91	13,97 ± 0,28
2	5,38 ± 0,16	1,50 ± 0,21	13,04 ± 0,43	23,74 ± 0,19	8,27 ± 0,86	25,87 ± 0,43
3	3,01 ± 0,74	1,22 ± 0,12	10,74 ± 1,68	23,55 ± 1,43	25,62 ± 0,69	20,47 ± 0,25
4	1,83 ± 1,33	1,39 ± 0,34	10,19 ± 0,13	20,17 ± 0,77	21,78 ± 1,10	17,89 ± 2,15
5	1,64 ± 0,86	0,64 ± 0,56	7,04 ± 0,37	15,08 ± 0,86	14,58 ± 1,05	12,66 ± 0,67
6	0,71± 0,44	0,36 ± 0,44	4,98 ± 0,75	10,10 ± 0,96	11,95 ± 0,98	10,53 ± 0,81
7	1,35 ± 0,62	1,21 ± 0,65	5,34 ± 2,23	10,31 ± 0,33	10,81 ± 0,49	9,18 ± 0,96
8	0,93 ± 0,66	0,79 ± 0,66	6,76 ± 0,33	10,92 ± 0,12	11,71 ± 1,09	11,14 ±1,33
9	1,00 ± 0,49	0,14 ± 1,29	6,40 ± 1,48	10,03 ± 0,43	11,38 ± 0,33	10,24 ± 1,44
10	1,33 ± 0,76	1,55 ±0,50	8,09 ± 0,00	10,53 ± 0,69	11,25 ± 1,59	12,11 ± 1,90
11	0,97 ± 0,02	0,66 ± 0,02	6,11 ± 0,15	8,47 ± 0,59	8,54 ± 0,67	9,69 ± 1,06
12	1,55 ± 0,23	0,83 ± 0,39	8,28 ± 0,17	9,80 ± 0,13	12,44 ± 0,47	12,02 ± 1,39
13	2,92 ± 0,34	2,58 ± 0,78	7,55 ± 0,04	8,70 ± 0,55	9,99 ± 0,72	10,60± 1,63
14	1,36 ± 0,17	1,02 ± 0,23	6,97 ± 0,17	7,85 ± 0,82	8,23 ± 1,26	9,56 ± 0.74
15	0,73 ± 0,05	0,34 ± 0,48	5,00 ± 0,12	6,32 ± 0,53	6,83 ± 0,32	7,63 ± 1,26
16	1,13 ± 0,12	1,20 ± 0,12	4,79 ± 0,49	5,35± 0,53	6,05 ± 0,32	6,34 ± 1,74
17	1,42 ± 0,99	1,49 ± 0,43	4,84 ± 1,51	5,90 ± 1,10	7,04 ± 0,74	7,82 ± 2,20
18	2,16 ± 0,00	2,30 ± 0,33	7,33 ± 0,78	7,62 ± 0,25	7,69 ± 1,81	10,28 ± 0,86
19	1,15 ± 0,82	1,72 ± 0,99	4,96 ± 0,75	5,75 ± 0,25	6,11 ± 0,87	7,91 ± 0,87
20	1,48 ± 0,00	1,27 ± 0,21	5,49 ± 0,21	5,98 ± 0,68	7,53 ± 1,24	8,38 ± 1,63
21	0,92 ± 0,12	0,77 ± 1,04	5,28 ± 0,21	6,97 ± 0,56	6,55 ± 1,59	7,39 ± 1,04
22	0,91 ± 0,12	1,67 ± 0,55	4,18 ± 1,27	5,50 ± 0,44	6,13 ± 0,84	7,59 ± 1,12
23	1,18 ± 0,12	1,67 ± 0,21	3,83 ± 0,99	4,95 ± 0,48	5,23 ± 0,96	6,90 ± 1,70
24	1,11 ± 0,12	1,11 ± 0,44	3,41 ± 0,99	4,53 ± 0,48	4,81 ± 0,96	6,48 ± 0,75
25	0,63 ± 0,21	0,77 ± 0,95	3,03 ± 1,00	4,15 ± 0,49	4,44 ± 0,97	6,12 ± 0,76
26	1,67 ± 0,21	1,60 ± 0,60	4,74 ± 0,24	3,83 ± 1,34	5,29 ± 0,94	8,71 ± 1,62
27	0,56 ± 0,12	0,28 ± 1,20	4,93 ± 0,32	2,46 ± 0,61	3,59 ± 1,12	7,25 ±1,61
28	0,43 ± 0,22	0,50 ± 0,82	3,88 ± 0,22	2,80 ± 0,65	3,74 ± 0,69	7,19 ± 1,19
29	1,42 ± 0,12	0,43 ± 0,93	3,63 ± 0,56	2,85 ± 0,33	3,27 ± 0,25	6,40 ± 1,85
Total	49,32 ± 1,70	33,85 ± 0,55	175,30 ± 0,63	250,48 ± 0,62	254,00 ± 0,89	298,32 ± 1,24

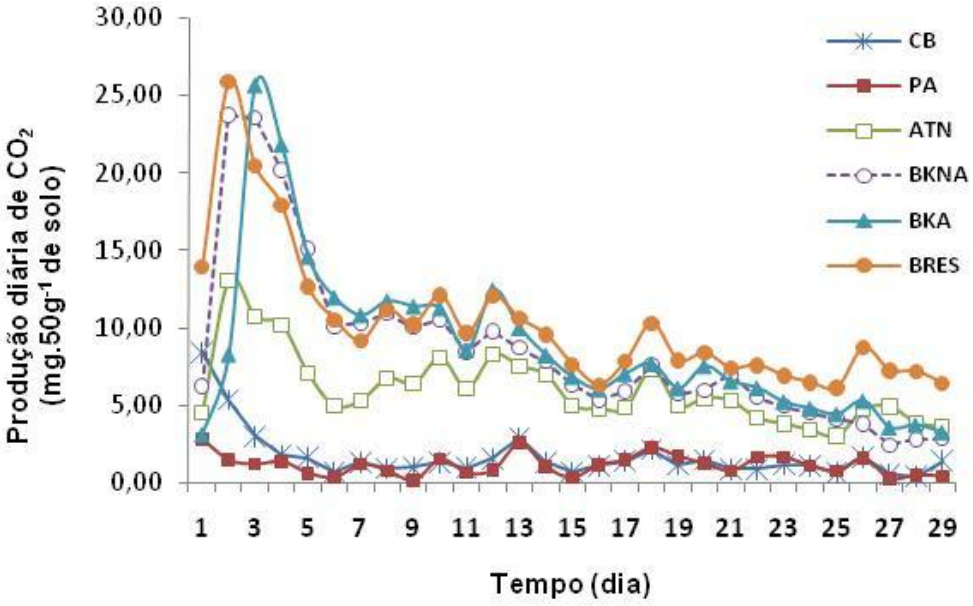


Figura 28 – Produção diária de CO_2 durante os 29 dias de incubação.

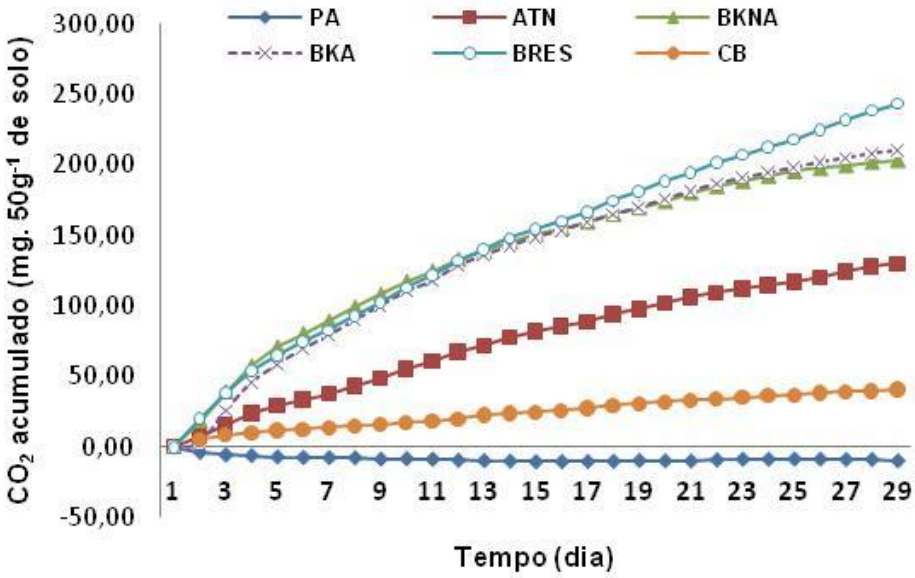


Figura 29 – Quantidade acumulada de CO_2 produzida por biodegradação durante os 29 dias de incubação.

A partir das Figuras 28 e 29 observa-se que a incorporação do óleo diesel B5 ao solo, associado ou não a adição de inóculo, proporcionou alterações na produção e acumulação do CO_2 quando comparada ao solo controle sem contaminação e sem inóculo (CB). O tratamento BRES foi o que apresentou a maior produção acumulada de CO_2 por biodegradação aos 29 dias de incubação (243,47 mg 50g^{-1}), seguido pelo tratamento BKA (209,99 mg 50g^{-1}) e BKNA (203,34 mg 50g^{-1}). A atenuação natural (ATN), por sua vez, apresentou uma produção

acumulada de CO_2 por biodegradação de 129,91 mg $50g^{-1}$ e o controle abiótico (PA) apresentou valor negativo de 9,87 mg $50g^{-1}$, fato que será comentado mais adiante.

No gráfico de produção acumulada de CO_2 (Figura 29) observa-se curvas de inclinação mais elevada nos primeiros 4 dias para os tratamentos BKNA, BKA, BRES e atenuação natural, sugerindo que não houve uma fase de adaptação dos micro-organismos (fase *lag*) nos referidos tratamentos. Tal fase, por sua vez, corresponde ao período de adaptação enzimática, na qual não ocorre aumento do número de micro-organismos (ANDRADE, 2008). Ressalta-se, no entanto, que esses tratamentos, com exceção do BRES, apresentaram após 24 horas de incubação, uma produção de CO_2 menor que a do respirômetro-controle (CB) (Tabela 20), o que pode sugerir um curto período de aclimatação, no qual os micro-organismos estariam rearranjando seu sistema enzimático, a fim de dar início à metabolização do substrato disponível (ANDRADE, 2008).

Em relação aos tratamentos BKA e BRES, a inexistência da fase *lag* era um fato esperado, já que os inóculos foram previamente aclimatados ao óleo diesel B5 antes de serem inoculados, justamente com o intuito de acelerar o início do processo de biodegradação. Quanto ao tratamento BKNA e à atenuação natural, o período de adaptação microbiana praticamente inexistente, sugere em tais condições, a presença de micro-organismos fisiologicamente hábeis a degradação desse substrato.

A baixa produção de CO_2 ocorrida nos tratamentos no primeiro dia após a incubação (Tabela 20) comparada ao controle CB, acarretou valores negativos na quantidade efetiva de CO_2 produzida por biodegradação. Fato semelhante foi observado por Camargo et al (2009) quando estes avaliaram a aplicabilidade do método respirométrico de Bartha para analisar a atividade microbiana sob a interferência da vinhaça. Assim como no trabalho de Camargo et al (2009), o primeiro resultado de respirometria (1ª leitura titulométrica) no presente estudo foi desconsiderado, uma vez que a relevância do mesmo na curva acumulada de biodegradação era inviável.

A partir do 2º dia de incubação até o 29º, o controle abiótico continuou a apresentar, na maior parte do experimento, evoluções diárias de CO_2 bem menores que as do controle, fato que resultou no final do período de incubação em uma produção efetiva de CO_2 por biodegradação negativa. Tal comportamento indica que a despeito das UFC contadas, houve um efeito tóxico da azida quanto à atividade microbiana, embora a quantidade adicionada não tenha sido suficiente para suprimir a atividade por completo. Costa (2009) avaliou a biodegradação aeróbia de lixiviado de resíduos sólidos urbanos (RSU) em Latossolo vermelho-escuro por respirometria e verificou que as amostras de solo contaminadas por

lixiviado de RSU e cloreto de mercúrio apresentaram durante todo o período de incubação (41 dias) produção de CO_2 menor que a das amostras de solo contaminado por lixiviado sem a referida substância, concluindo que os respirômetros de Bartha também se mostram adequados quando se pretende avaliar o efeito da adição de substâncias tóxicas como o cloreto de mercúrio sobre a população microbiana.

Dentro desse contexto, é importante mencionar, que embora a quantidade de azida adicionada tenha sido insuficiente para eliminar por completo a atividade microbiana, quantidades elevadas dessa substância podem causar erros na quantificação do CO_2, sendo o seu uso considerado inadequado como agente inibidor da respiração do solo por Rozycki e Bartha (1981) e Trevors (1996). Segundo Rozycki e Bartha (1981) a oxidação de uma elevada quantidade de azida na solução do solo gera quantidades significativas de amônia, que, por ser volátil, pode ser absorvida na solução de hidróxido de potássio utilizada para capturar e quantificar o CO_2 gerado na respiração. Esses mesmos autores reportam que concentrações de azida de sódio acima de 5% ocasionaram elevada produção de CO_2 quando comparada ao solo sem essa substância, sendo a produção do gás proporcional à quantidade da azida adicionada.

A partir das análises dos intervalos de confiança para as médias de produção acumuladas de CO_2 através do tempo (dias de incubação), verificou-se que os tratamentos bioaumentados BKNA, com inoculo sem aclimatação, BKA e BRES, com inóculos aclimatados, foram estatisticamente diferentes ($p<0,05$) da atenuação natural melhorada (ATN), do controle abiótico (PA) e do controle sem contaminação (CB), indicando uma contribuição positiva dos inóculos na atividade degradadora do óleo diesel B5 avaliada em termos de produção de CO_2.

O controle sem contaminação apresentou significância estatística ($p<0,05$) durante todo o período de incubação em relação ao controle abiótico, embora na Figura 28, ambos pareçam apresentar o mesmo comportamento. Tal fato confirma que a adição da azida de sódio produziu significativas alterações na produção de CO_2.

Significância estatística ($p<0,05$) durante todo o período de incubação também foi observada entre o controle sem contaminação e a atenuação natural melhorada, demonstrando que a adição do óleo diesel B5 já foi suficiente para produzir alterações substanciais na atividade respiratória do solo.

Os tratamentos bioaumentados com o consórcio comercial KMA aclimatado (BKA) e não aclimado (BKNA) apresentaram diferenças significativas na produção de CO_2 apenas nos 15 primeiros dias, o que pode ser observado pela inclinação mais elevada da curva de

produção acumulada de CO_2 do tratamento BKNA (Figura 29). Nesse período, a quantidade acumulada de carbono biodegradado foi de 301,73 mg $50g^{-1}$ de solo no tratamento BKNA e de 297, 40 mg $50g^{-1}$ de solo no tratamento BKA. Do 16º dia ao 29º dia a produção acumulada de CO_2 foi considerada similar em termos estatísticos. A quantidade acumulada de carbono biodegradado nesse período foi de 104,95 mg $50g^{-1}$ de solo no tratamento BKNA e de 122,25 mg $50g^{-1}$ de solo no tratamento BKA. Ao final do período de incubação as quantidades acumuladas de carbono biodegradado desses tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si ($p<0,05$).

O tratamento bioaumentado com a cultura microbiana RES (BRES) apresentou, ao final do período de incubação, significativa produção de CO_2 ($p<0,05$) comparado aos tratamentos bioaumentados com o consórcio comercial KMA (BKA e BKMA).

Em relação ao tratamento BKNA, que recebeu inóculo não aclimatado, verificou-se diferenças significativas na produção de CO_2 entre tal tratamento e o BRES nos primeiros 4 dias após a incubação. Do 4º dia ao 12º dia as produções de ambos os tratamentos foram consideradas similares, sem significância entre si. Após o 12º dia, a produção acumulada de CO_2 voltou a apresentar diferenças estatísticas, fato que perdurou até o final do período de incubação ($p<0,05$), podendo ser observado pela inclinação mais elevada da curva de produção acumulada de CO_2 do tratamento BRES (Figura 29). Possivelmente, o desempenho superior do tratamento BRES a partir do 12º dia esteja relacionado a uma melhor adaptação do inóculo as condições do meio.

Em relação ao tratamento BKA, que recebeu inóculo aclimatado, o tratamento BRES apresentou produção de CO_2 superior estatisticamente significante durante todo o período de incubação.

As eficiências de biodegradação obtidas ao final do período de incubação, a partir da evolução de CO_2 ($C\text{-}CO_2$), assim como os percentuais de remoção de n-alcanos, são apresentados lado a lado na Tabela 21 para fins de comparação.

Em relação ao controle dos processos abióticos (PA), embora nenhuma remoção aparente de carbono tenha ocorrido por respirometria, um pequeno decaimento de n-alcanos (19,66 mg kg^{-1} de solo) foi observado ao final do período de incubação em relação ao dia 0. Fato semelhante foi observado por Trindade (2002) quando o mesmo comparou, através de ensaios respirométricos, as eficiências de biodegradação de um solo contaminado recentemente com outro contaminado a cerca de três anos.

Tabela 21 – Eficiência de biodegradação (EB) e porcentagem de remoção dos n-alcanos nos diferentes tratamentos, ao final do período de 29 dias.

Tratamento	Eficiência de biodegradação calculada com base na produção de CO_2 (% EB)	% Remoção de n-alcanos
PA	-1,73	8,54
ATN	20,54	12,21
BKNA	34,38	16,76
BKA	34,59	34,89
BRES	39,04	46,17

Levando-se em consideração a elevada concentração de micro-organismos detectada ao final dos 29 dias, é possível que os mesmos tenham utilizado essa pequena quantidade de hidrocarbonetos para manutenção celular. No entanto, a remoção dos hidrocarbonetos também pode ter ocorrido por volatilização e, nesse caso, não resultaria em produção de CO_2. Cabe ressaltar que as evoluções diárias de CO_2 no PA, já discutidas anteriormente, foram menores que as observadas no controle do solo sem contaminação, sugerindo que não houve remoção do contaminante. Nesse caso, as evoluções diárias de CO_2 observadas, mesmo baixas, poderiam ser resultantes da manutenção celular apenas pelo consumo do carbono orgânico já presente no solo.

A partir dos dados apresentados na Tabela 21, observa-se que o controle dos processos abióticos e os tratamentos por bioaumento BRES e BKA apresentaram porcentagens de remoção de hidrocarbonetos superiores as eficiências de biodegradação; ou seja, maior degradação de n-alcanos em mg kg^{-1} do que a produção de CO_2. Já a atenuação natural e o bioaumento BKNA apresentaram comportamentos opostos: menores remoções de n-alcanos para maior produção de CO_2.

Em relação ao tratamento BKA, a porcentagem de remoção de n-alcanos (34,89%) foi levemente superior à eficiência de biodegradação (34,59%), medida com base na produção de CO_2. Já o tratamento BRES apresentou diferença maior entre a remoção de hidrocarbonetos (44,16%) e a eficiência de biodegradação (39,04%). Segundo Mariano (2006) e Verichia (2008), embora a taxa de degradação dos hidrocarbonetos esteja diretamente relacionada à produção de CO_2, a eficiência de biodegradação está relacionada com a mineralização dos hidrocarbonetos e, portanto, não considera a formação de subprodutos intermediários. Outro fator que deve ser levado em conta, de acordo com Verichia (2008), diz respeito à geração de compostos voláteis durante a formação de subprodutos intermediários, os quais não são

detectados pela respirometria, pois não geram CO_2, mas contribuem para a redução da massa do contaminante.

O efeito mais pronunciado dos tratamentos BKA e BRES na remoção de n-alcanos deve ser resultante do processo de aclimatação dos inóculos ao óleo diesel B5, antes da introdução dos mesmos no solo, como mencionado na seção *2.4.3*. Em geral, os micro-organismos capazes de se beneficiar com a seleção imposta na aclimatação tendem a degradar o composto mais rapidamente quando são novamente expostos ao mesmo (MELO; AZEVEDO, 2008; SILVA; MELO; FAY, 2006).

A eficiência levemente superior do tratamento BRES na remoção de hidrocarbonetos, por sua vez, sugere a presença de micro-organismos fisiologicamente mais adaptáveis ao substrato e as condições do meio. Embora ambos os tratamentos tenham recebido uma população microbiana exógena previamente aclimatada, a cultura microbiana RES foi obtida de um solo com histórico de contaminação que por ocasião da sua obtenção para preparo do inóculo apresentava baixo nível de contaminação por hidrocarbonetos, o que neste caso favoreceria a seleção de micro-organismos fisiologicamente mais adaptáveis ao substrato (PEIXOTO; ROSADO; TAKETANI, 2008). No entanto, tal fato só poderia ser confirmado por um período mais longo do experimento.

Quanto à atenuação natural e ao bioaumento sem aclimatação, BKNA, a maior evolução de CO_2 comparada à menor degradação quantificada de n-alcanos (em mg kg^{-1}), sugere que outra fonte de carbono facilmente assimilável tenha sido utilizada preferencialmente. Ressalta-se, no entanto, que a diferença entre esses dois parâmetros de biodegradação foi mais pronunciada no tratamento BKNA. Acredita-se que, especialmente nesse tratamento, o biodiesel possa ter sido mais prontamente biodegradado em relação aos n-alcanos do diesel, resultando, desta forma, em uma maior produção de CO_2, e, portanto, valores superiores do indicador EB. Como apresentado na seção *1.3.4*, sugere-se que a biodegradação aeróbia do biodiesel ocorra primeiramente pela clivagem dos ésteres de ácidos graxos, com a formação de um ácido graxo e um álcool associado, seguida da quebra do ácido graxo por β oxidação. Na β oxidação, o ácido graxo após remoção gradativa de dois átomos de carbono na forma de acetil-CoA, entra no ciclo de Krebs para completa mineralização a CO_2 e H_2O (MAIER; PEPPER; GERBA, 2000). Contudo, o tempo de incubação foi curto para se avaliar tal fato com clareza.

Dentro desse contexto, cabe ressaltar, que alguns trabalhos têm sugerido que na presença de ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e diesel fóssil, os micro-organismos utilizam os ésteres como fonte de energia para promover a degradação do diesel fóssil atacando,

aparentemente, os ácidos graxos do biodiesel e as cadeias alifáticas do diesel ao mesmo tempo, ao invés de atacar preferencialmente os ácidos graxos (PASQUALINO et al., 2006; ZHANG et al., 1998). Tal fato, no entanto, não foi observado por Mariano et al (2008).

Apesar das eficiências de biodegradação (EB) e as taxas de remoção de n-alcanos terem sido relativamente baixas, mesmo nos tratamentos mais eficientes, deve-se levar em consideração que ao final do período de monitoramento o patamar de estabilização quanto à produção de CO_2 não havia sido ainda alcançado, particularmente nos tratamentos bioaumentados, tendo sido observada atividade microbiana e elevada quantidade de micro-organismos. Tal fato sugere fortemente a possibilidade de obtenção de maiores eficiências de biodegradação em períodos maiores do que os 29 dias monitorados.

3.6 Teste de biodegradabilidade: indicadores de oxirredução DCPIP e TTC

No presente estudo os indicadores redox DCPIP e TTC foram utilizados para avaliar a capacidade do consórcio comercial KMA, da cultua microbiana RES e da microbiota autóctone do solo de estudo (cultura EX) em biodegradar o óleo diesel B5, o diesel puro e o biodiesel de soja. Os resultados referentes aos ensaios de biodegradabilidade com diesel B5 estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 – Teste de biodegradabilidade do óleo diesel B5 usando os indicadores DCPIP e TTC.

Ensaio	**DCPIP**	**TTC**
	Descoloração	**Coloração**
KMA	Não	Não
RES	Sim (após 3 dias) Azul claro	Sim (após 1 dia) Levemente rosada
EX	Sim (após 3 dias) Azul claro	Sim (após 3 dias) Levemente rosada
Controle positivo[1]	Sim (após 1 dia) Coloração azul após 48 h	Sim (após 1 dia) vermelha
Controle negativo	Não	Não
Controle branco	Não	Não

Nota: (1) Resultados de cada inóculo testado separadamente (meio com glicose 0,1% v/v + inóculo-teste + indicador).

As Figuras 30 e 31 ilustram os resultados de biodegradabilidade do consórcio KMA, da cultura microbiana RES e da cultura EX (Tabela 22) após 14 dias de incubação.

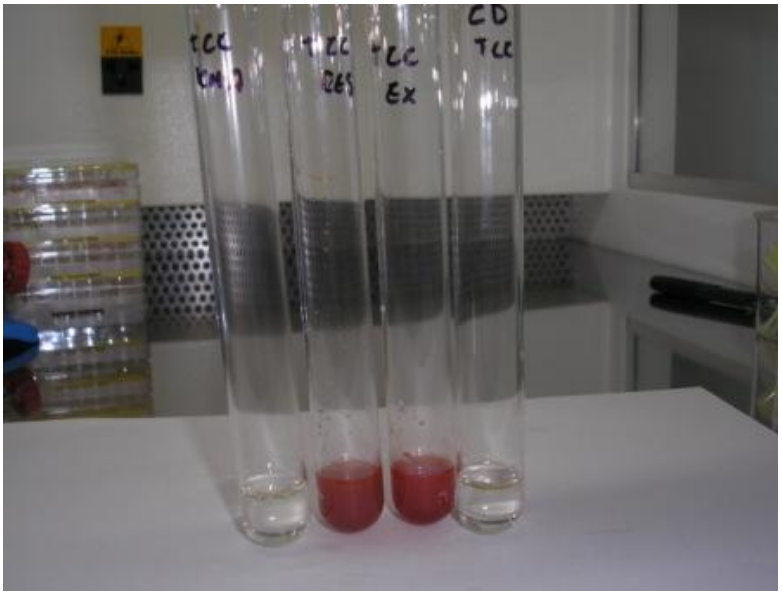


Figura 30 – Teste de biodegradabilidade do óleo diesel B5 na presença de TTC após 14 dias de incubação. Da esquerda para direita: consórcio comercial KMA; cultura microbiana RES; cultura microbiana EX; controle branco.

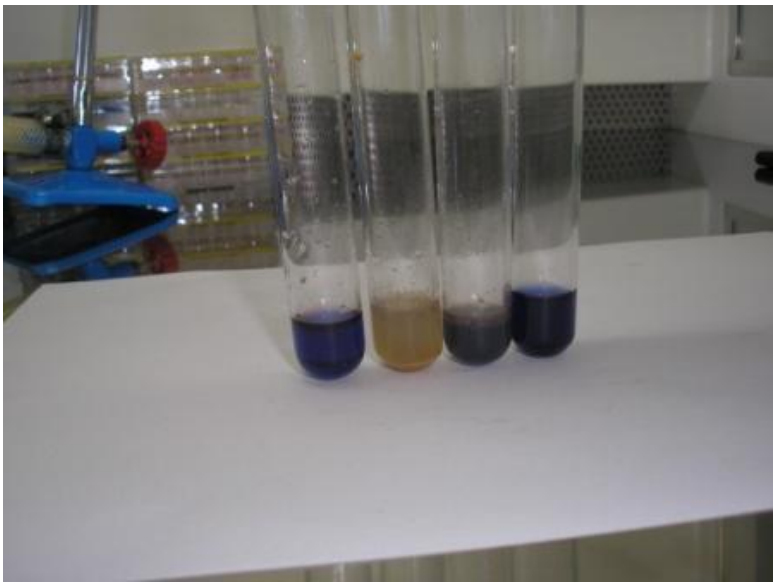


Figura 31 – Teste de biodegradabilidade do óleo diesel B5 na presença de DCPIP após 14 dias de incubação. Da esquerda para direita: consórcio comercial KMA; cultura microbiana RES; cultura microbiana EX; controle branco.

Na Tabela 23 estão apresentados os resultados dos ensaios de biodegradabilidade com diesel puro e biodiesel de soja na presença de TTC.

Tabela 23 - Teste de biodegradabilidade com diesel puro e biodiesel de soja na presença do indicador TTC.

Ensaio	Diesel puro	Biodiesel
	Coloração TTC	Coloração TTC
KMA	Não	Sim (após 2 dia) Levemente rosada
RES	Sim (após 3 dia)	Sim (após 1 dia) Levemente rosada
EX	Sim (após 3 dia)	Sim (após 1 dia)
Controle branco (*)	Não	Não

Nota: (*) Resultados tanto com diesel puro quanto com biodiesel (meio + indicador + substrato).

As Figuras 32 e 33 ilustram os resultados de biodegradabilidade do consórcio KMA, da cultura mista RES e da cultura EX (Tabela 23) após 14 dias de incubação.

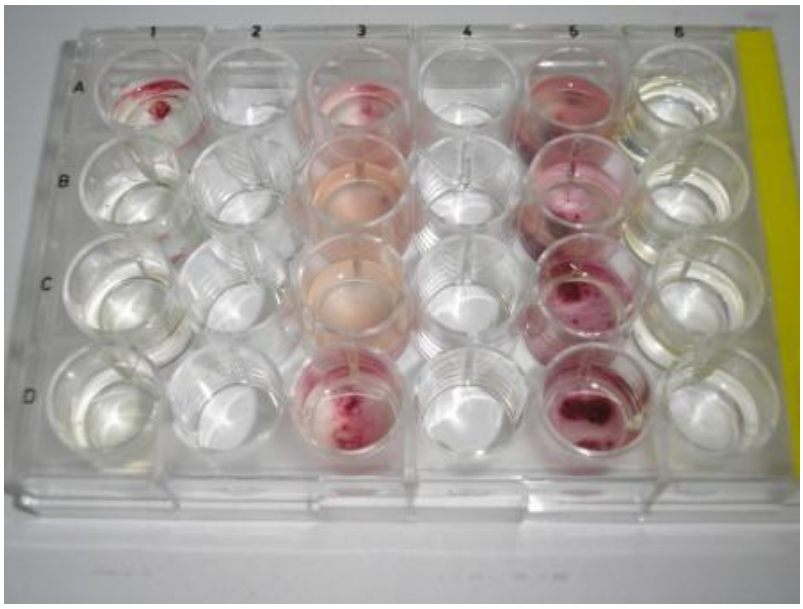


Figura 32 – Teste de biodegradabilidade do óleo diesel puro na presença de TTC após 14 dias de incubação. A, B, C e D representam as quadruplicatas de cada cultura testada. Da esquerda para direita: (1) consórcio comercial KMA; (3) cultura microbiana RES; (5) cultura microbiana EX; (6) controle branco; (1A) coloração rosácea provavelmente resultante de alguma contaminação.

Figura 33 – Teste de biodegradabilidade do biodiesel de soja na presença de TTC após 14 dias de incubação. A, B, C e D representam as quadruplicatas de cada cultura testada. Da esquerda para direita: (1) consórcio comercial KMA; (3) cultura microbiana RES; (5) cultura microbiana EX; (6) controle branco.

De acordo com os resultados dos ensaios de biodegradabilidade (Tabelas 22 e 23) somente as culturas microbianas RES e EX apresentaram potencial de biodegradar o óleo diesel B5, o diesel puro e o biodiesel quando colocadas em meio mineral contendo tais combustíveis como única fonte de carbono. Resultados positivos para ambas as culturas foram visualmente detectados já no primeiro dia após a incubação no meio contendo biodiesel e TTC. A cultura RES também ocasionou, no mesmo período, mudança de coloração no meio contendo óleo diesel B5 e TTC. Em relação ao diesel puro, as duas culturas ocasionaram mudança da coloração do meio após 3 dias de incubação.

Mariano (2006) testando com DCPIP o potencial de diferentes micro-organismos autóctones de solos e águas subterrâneas contaminados em degradar óleo diesel puro, também observou resultados positivos (descoloração) após os 3 primeiros dias de incubação. Já Vieira et al (2007) investigando a capacidade de diferentes bactérias isoladas de ambientes contaminados na biodegradação de biodiesel através da descoloração do DCPIP observaram que 93% dos micro-organismos apresentaram capacidade de degradação em 24-48 h.

O tempo desprendido para a mudança de coloração do meio tem sido um parâmetro utilizado para comparar a habilidade relativa de diferentes culturas em degradar um determinado composto (MARIANO, 2006; GOMES, 2004). Contudo, no presente ensaio, tal parâmetro não pôde ser utilizado como um diferenciador entre as culturas testadas no que diz

respeito à rapidez do processo de oxidação biológica, uma vez que os inóculos não foram adicionados em concentrações iguais, como mencionado na seção *2.5.2*.

O consórcio comercial KMA, diferentemente das culturas RES e EX, não demonstrou habilidade em degradar o óleo diesel B5 e o diesel puro quando colocado em meio mineral contendo tais combustíveis como única fonte de carbono. Durante os 14 dias de ensaio, não houve nenhuma mudança de coloração do meio contendo DCPIP e/ou TTC. No entanto, esse consórcio apresentou habilidade de degradar o biodiesel de soja, quando este foi usado como única fonte de carbono. Tal resultado, por sua vez, corrobora para a hipótese do tratamento bioaumentado com esse consórcio não aclimatado (BKNA) ter consumido mais prontamente o biodiesel, resultando em uma eficiência respirométrica maior que a eficiência em termos de remoção de n-alcanos.

O potencial das culturas microbianas RES e EX em degradar tanto o óleo diesel B5, quanto o diesel puro como únicas fonte de carbono, pode estar relacionado ao fato destas terem sido obtidas de solos que já apresentavam teores de hidrocarbonetos de petróleo, conforme observado na etapa de caracterização dos mesmos, e, por consequência, a presença de uma microbiota fisiologicamente adaptada a degradar esses compostos, já que em solos contaminados, micro-organismos tendem a se adaptar e adquirir a capacidade de utilizar a substância contaminante como fonte de carbono e energia para o seu metabolismo (MELO; AZEVEDO, 2008; TRINDADE, 2002).

Em relação ao consórcio KMA, sua inabilidade em degradar tanto o óleo diesel B5 quanto o diesel puro pode residir no fato do mesmo não apresentar o aparato enzimático necessário ao reconhecimento inicial e a transformação desses compostos em intermediários das rotas comuns de geração de energia do metabolismo microbiano (JACCQUES, 2005; MAIER; PEPPER, GERBA, 2000). Como mencionado na seção *2.3* o consórcio KMA consiste em um produto biológico desenvolvido originalmente com a função de acelerar o processo de compostagem de resíduos orgânicos, criando vantagens no tempo de maturação e na qualidade do composto original. Os resultados negativos obtidos nesse teste confirmam a baixa eficiência desse consórcio na remoção de n-alcanos observada durante o experimento respiromêtrico, na condição onde o mesmo não foi aclimatado (BKNA).

Cabe mencionar, que embora o consórcio comercial KMA puro não tenha apresentado potencial em degradar óleo diesel B5 neste teste, o mesmo promoveu um decaimento mais rápido dos n-alcanos, particularmente do 7º dia ao 14º dia, no experimento de biodegradação conduzido em microcosmos na presença desse contaminante. Acredita-se que tal

comportamento seja resultado de uma complementaridade metabólica positiva entre os micro-organismos presentes nesse consórcio e a população nativa do solo.

Richard e Vogel (1998), por exemplo, estudaram um consórcio de bactérias degradadoras de óleo diesel no solo e verificaram que das setes espécies desse consórcio, quatro não utilizavam diretamente o óleo diesel como fonte de carbono e energia. No entanto, a presença destes aumentava a produção de CO_2 pelo consumo de intermediários produzidos pelas demais espécies.

Komukai-Nakamura et al (1996) avaliaram a biodegradação de um petróleo leve árabe pelo consórcio constituído dos gêneros microbianos *Acinotobacter* sp T4 e *Pseudomonas putida* PB4, e observaram a seguinte sequência no processo de biodegradação: (i) crescimento e degradação dos n-alcanos e outros hidrocarbonetos por *Acinotobacter* sp T4 com acúmulo de metabólitos; (ii) crescimento de *Pseudomonas putida* PB4 sobre esses metabólitos; (iii) degradação dos compostos aromáticos por *Pseudomonas putida* PB4. Já Mukred et al (2008) relataram que de um consórcio constituído por 8 espécies com efetiva capacidade de degradar óleo cru, apenas 5 foram capazes de crescer em culturas puras usando uma variedade de hidrocarbonetos. E quando do consórcio foram retiradas 3 dessas espécies a eficácia do mesmo foi reduzida significativamente demonstrando que a atividade e/ou sobrevivência de uma espécie pode depender da presença de outra no meio.

A habilidade do consórcio KMA em degradar somente biodiesel de soja quando colocado em meio mineral contendo tal combustível como única fonte de carbono, pode estar relacionado ao fato do biodiesel ser mais biodegradável do que o diesel, conforme ressaltado por Zhang et al (1998). Segundo esses autores, os ésteres de ácidos graxos do biodiesel são mais facilmente reconhecidos e atacados por enzimas, principalmente pelas desidrogenases, do que os n-alcanos do diesel. Esses autores destacam que a susceptibilidade do grupamento éster ao ataque enzimático está relacionada à presença dos átomos de oxigênio. O diesel, por ser constituído por uma grande quantidade de n-alcanos (normais, cíclicos e ramificados), sem a presença de oxigênio na cadeia hidrocarbônica, exige a presença de micro-organismos capazes de produzir enzimas que reconheçam essas moléculas. Segundo Maier, Pepper e Gerba (2000) a maior susceptibilidade à biodegradação dos n-alcanos lineares em relação aos ramificados e aos demais hidrocarbonetos está relacionada a semelhanças estruturais dos mesmos comparados aos ácidos graxos e n-alcanos de origem vegetal.

Diferentes estudos têm reportados uma maior rapidez dos micro-organismos na descoloração de indicadores redox na presença de biodiesel em comparação a outros combustíveis, especialmente o diesel. Soares Jr, Mariano e Angelis (2009), investigaram o

potencial da levedura *Candida viswanathi* em biodegradar misturas de diesel/biodiesel utilizando o DCPIP e verificaram que não houve grande diferença entre as misturas B2, B5 e B20, que apresentaram a seguinte ordem crescente no tempo de descoloração: B20 (17 h) > B5 (18 h) > B2 (24 h). O menor tempo de descoloração ocorreu para o biodiesel (8 h) e o maior tempo para o diesel (29 h).

Tomasella, Mariano e Angelis (2009) avaliaram a capacidade de quatro inóculos biodegradarem misturas de combustíveis, dentre eles diesel e biodiesel, através da mudança de coloração do indicador DCPIP. Os resultados finais mostraram que dos quatro inóculos, três apresentaram a seguinte ordem de descoloração do DCPIP, indicando potencial de degradação: biodiesel > diesel B20 > diesel. Em relação ao quarto inóculo, houve uma pequena diferença no tempo requerido para descoloração dos três combustíveis analisados, sendo que o menor tempo ocorreu na presença do biodiesel (22 h); tanto o diesel puro quanto o diesel B20 apresentaram o mesmo tempo de descoloração (26 h).

Mariano et al (2008), utilizando o DCPIP, avaliou o potencial de dois consórcios microbianos na biodegradação de diesel e de diferentes misturas de diesel/biodiesel, sendo um dos consórcios proveniente do solo de um posto de combustível e o outro de uma área não contaminada. O consórcio referente ao posto de combustível apresentou o seguinte potencial de biodegradabilidade, em ordem crescente: biodiesel (22 h) > B50 (24 h) > B20 (27 h) > B5 (29 h) > diesel (36 h). Já o consórcio proveniente da área não contaminada apresentou, na mesma ordem, o seguinte potencial: biodiesel (20 h) > B50 (20 h) > B20 (24 h) > B5 (44 h) > diesel (68 h).

Durantes os 14 dias de incubação observou-se diferentes mudanças de coloração e/ou descoloração dos indicadores. A cultura microbiana RES, por exemplo, ocasionou uma descoloração intermediária do DCPIP (azul claro) no meio contendo óleo diesel B5 após 3 dias de incubação e total descoloração do mesmo com 7 dias. A cultura RES também ocasionou descoloração intermediária do DCPIP para o mesmo combustível após 3 dias de incubação, porém não houve descoloração total do indicador, permanecendo o meio com um tom ainda azulado, porém, bastante diferente do controle positivo e branco. O consórcio KMA e a cultura RES ocasionaram uma coloração intermediária (rosácea) do meio contendo biodiesel e TTC até os 14 dias de incubação. Já a cultura microbiana EX para o mesmo combustível e indicador ocasionou uma coloração mais avermelhada do meio após 3 dias de incubação. Descolorações intermediárias do DCPIP também foram observadas por Vaz e Vieira (2009), ao testarem o potencial de 41 bactérias em degradar misturas de diesel/biodiesel. Segundo esses autores, durante o processo de oxirredução, a descoloração do

DCPIP pode variar de uma perda total da coloração azul escuro inicial até uma coloração marrom. Quanto ao TTC, a coloração pode variar de rosa claro a vermelho intenso, dependendo da taxa de catabolismo dos micro-organismos envolvidos (BOCHNER; SAVAGEAU, 1977; HERNÁNDEZ et al. 2008). Alguns autores têm relatado, principalmente em testes de viabilidade de sementes, que alguns fatores como pH, temperatura e concentração do corante podem interferir na redução do TTC (BELOTI et al., 1999; DIAS; SILVA, 1998; ZONTA et al., 2009).

Conforme mostrado na Tabela 22, após os dois primeiros dias de incubação, o controle positivo que já tinha apresentado descoloração do meio contendo óleo diesel B5 e DCPIP apresentou-se novamente azulado para as três culturas testadas. Sugere-se que tal fato tenha ocorrido devido a uma baixa concentração do substrato adicionado ao meio (glicose 0,1%), não sendo a mesma suficiente para evitar novamente a oxidação do DCPIP, já que a reação neste caso pode ser reversível. Possivelmente, tal fato não foi observado em relação ao indicador TTC uma vez de acordo com Bochner e Savageau (1976) a redução deste indicador é irreversível.

Ao final dos 14 dias de incubação, não foi observada diferença nos resultados de biodegradabilidade entre os indicadores utilizados. O potencial de biodegradabilidade das culturas microbianas testadas foi confirmado pelos dois indicadores. Schultz et al (2009), no entanto, avaliaram a capacidade de diferentes micro-organismos em degradar biodiesel pela utilização dos mesmo indicadores e verificaram diferenças na detecção, sugerindo a utilização dos dois indicadores redox na seleção de micro-organismos com potencial degradador de biodiesel.

Diferença entre os testes com os dois indicadores foi observada apenas entre o tempo desprendido pela mesma cultura na mudança de coloração do meio. A cultura RES, por exemplo, ocasionou mudança de coloração do meio contendo óleo diesel B5 e TTC um dia após a incubação, enquanto que a descoloração do meio com DCPIP somente foi observada após 3 dias de incubação. Sugere-se que tais diferenças estejam relacionadas ao próprio processo enzimático envolvido na redução desses indicadores (BOCHNER; SAVAGEAU, 1977; DIAS; SILVA, 1998).

Um fator importante que deve ser considerado na aplicação dos testes de biodegradabilidade usando indicadores redox é o tempo de incubação do ensaio. De modo geral, esses ensaios têm sido conduzidos por um período de 24-48 h, sendo este o intervalo médio apresentado na mudança de coloração do meio. No entanto, verificou-se que os micro-organismos apresentam diferenças quanto ao tempo inicial desprendido no processo de

oxidação biológica. Mariano (2006), por exemplo, ao testar a habilidade relativa de 9 culturas microbianas em degradar óleo diesel comercial e intemperizado com DCPIP, verificou que somente o consórcio microbiano R, oriundo da água residuária da refinaria Replan, consegui biodegradar óleo diesel intemperizado, após 15 dias de incubação. Os demais degradaram somente o óleo diesel comercial em um período médio de 3 dias. Gomes (2004) testou o potencial degradador de isolados microbianos com querosene e verificou que os quatros primeiros isolados selecionados para posteriores testes de biodegradação ocasionaram a descoloração do indicador DCPIP após 15, 67, 172 e 240 h.

No presente ensaio, o período de incubação adotado (7-14 dias) foi o mesmo utilizado por Vaz e Vieira (2009) na avaliação do potencial degradador de diferentes microorganismos em misturas de diesel/biodiesel. De acordo com esses autores o referido período pode ser necessário à ativação do sistema enzimático visando à degradação do contaminante alvo.

4 CONLUSÕES E SUGESTÕES

No tocante ao experimento de biodegradação realizado em microcosmos com o consórcio comercial de micro-organismos eficazes KMA, conclui-se que:

- As estratégias de bioestímulo com ajuste de pH e adição de nutrientes e de bioestímulo associado ao bioaumento com consórcio KMA, mostraram-se promissoras na remoção de n-alcanos no solo contaminado por óleo diesel B5;
- A introdução do consórcio KMA no solo promoveu um decaimento mais rápido dos n-alcanos, particularmente do 7º ao 14º dia do experimento em relação ao controle de processos abióticos, ao bioestímulo por ajuste de pH e ao bioestímulo por ajuste de pH e de nutrientes, indicando que houve complementaridade metabólica positiva entre os membros do consórcio e a população autóctone do solo. Contudo, não foi constatada significância estatística na remoção dos hidrocarbonetos ao final do experimento (63 dias) entre os tratamentos bioaumentados com o consórcio microbiano comercial e o tratamento por bioestímulo com ajuste de pH e de nutrientes;
- A quantificação da população microbiana heterotrófica total como indicador dos processos microbiológicos em curso não mostrou-se suficientemente sensível para indicar diferenças nos processos de biodegradação entre os diferentes tratamentos adotados. Entretanto, do ponto de vista qualitativo, foi possível observar mudanças morfológicas das colônias e predominância de certos grupos, como fungos, em determinados intervalos de tempo de tratamento. A quantificação também foi útil para evidenciar a rápida colonização do solo após esterilização térmica, evidenciando a inadequação deste método de esterilização na avaliação da degradação de contaminantes por processos abióticos;
- Embora tenha sido observado um decaimento de hidrocarbonetos aparentemente superior no solo contaminado com óleo diesel B5 (5% p/p de biodiesel de soja adicionado ao diesel), quando comparado ao solo contaminado apenas por diesel puro, tal diferença não foi estatisticamente significativa. Sugere-se uma investigação mais detalhada para avaliar a influência do biodiesel sobre a taxa de remoção de hidrocarbonetos, não apenas de n-alcanos, mas também de HPAs, em solos contaminados por diesel aditivado de biodiesel, utilizando uma série de concentrações crescentes de biodiesel.

Em função do considerável aumento de n-alcanos observado em todos os tratamentos na primeira semana após início do experimento, e na segunda semana, particularmente, no controle dos processos abióticos e no bioestímulo apenas por ajuste de pH, sugere-se a

condução de novos experimentos, sob as mesmas condições, associada à análise de compostos intermediários como tentativa de elucidar as causas ou possíveis causas desse aumento. Tal investigação, por si só, representaria um projeto de pesquisa, dada a complexidade do tema.

Quanto ao experimento de biodegradação em respirômetros de Bartha, os resultados obtidos permitiram formular as seguintes conclusões:

- A respiração do solo, medida pela evolução de CO_2, aumentou com a adição do óleo diesel B5, não sendo observado efeito tóxico deste sobre a comunidade microbiana;
- O bioaumento do solo com diferentes inóculos microbianos previamente aclimatados ao óleo diesel B5 apresentou aumentos significativos quanto à remoção de n-alcanos nos solos contaminados;
- Foram observadas diferenças entre as eficiências de biodegradação com base nos dados respirométricos e as eficiências de biodegradação com base na remoção de hidrocarbonetos n-alcanos. Recomenda-se que os testes respirométricos, quando utilizados na avaliação da biodegradação de contaminantes orgânicos, sejam acompanhados por métodos que permitam a quantificação analítica dos mesmos;
- O consórcio comercial de micro-organismos eficazes KMA apresentou-se mais promissor na remoção de hidrocarbonetos de petróleo no solo, quando previamente aclimatado do que quando aplicado na forma como é comercializada;
- A azida de sódio adicionada ao controle abiótico como agente esterilizante, na concentração de 0,3% (p/p), produziu alterações significativas na atividade respiratória do solo, mas não foi suficiente para suprimir a mesma por completo.

Em relação ao teste de biodegradabilidade usando os indicadores redox DCPIP e TTC, conclui-se que:

- Não houve diferença nos resultados de biodegradabilidade entre os indicadores utilizados;
- A população autóctone do solo em estudo e a cultura microbiana extraída de um solo com histórico de contaminação e baixo teor de hidrocarbonetos, apresentaram potencial para biodegradar óleo diesel B5, diesel puro e biodiesel de soja, como únicas fontes de carbono, corroborando com o pressuposto de que, solos contaminados ou com baixo teor de contaminação são uma boa fonte para obtenção de microbiota adaptada, capaz de utilizar o contaminante como fonte de carbono e energia;
- O consórcio comercial de micro-organismos eficazes da Korin na forma como é comercializado não apresentou potencial para biodegradar óleo diesel B5 e diesel puro

como únicas fontes de carbono. Contudo, tal consórcio apresentou potencial para biodegradar biodiesel de soja.

Em síntese, hidrocarbonetos de petróleo da fração dos n-alcanos (C_{10}-C_{36}) do óleo diesel B5, podem ser removidos do solo por tratamento biológico, através de estratégias de estabelecimento de condições ideais ao metabolismo microbiano.

Os resultados do presente trabalho indicam que houve uma complementaridade metabólica entre a população nativa e os membros do consórcio comercial de microorganismos eficazes da Korin (KMA), cuja inoculação no solo promoveu um decaimento mais rápido de n-alcanos nas primeiras semanas do experimento comparado as condições sem inoculação. Entretanto, o mesmo não mostrou habilidade para degradar o óleo diesel B5, quando colocado em meio mineral contendo tal combustível como única fonte de carbono.

Dentre as estratégias estudadas e condições adotadas, o bioestímulo por ajuste de pH e adição de nutrientes mostrou efeitos mais positivos na biorremediação de solo contaminado por óleo diesel B5 do que o bioestímulo associado ao bioaumento com consórcio comercial KMA.

O método respirométrico padronizado pela NBR 14283 (ABNT, 1999) mostrou-se um indicador mais sensível na determinação do potencial de biodegradação associado à atividade microbiana do solo do que a contagem de UFC, uma vez que a produção de CO_2 apresenta uma correlação mais direta com o processo de degradação biológica. Contudo, a eficiência de biodegradação pela evolução de CO_2 deve, sempre que possível, ser avaliada em conjunto com a quantificação do composto de interesse.

Tanto nos ensaios em microcosmos quanto nos respirométricos, não foi possível estimar a contribuição dos processos abióticos, tendo em vista evidências da existência de atividade microbiana no solo esterilizado térmica ou quimicamente.

A utilização dos dois indicadores redox adotados mostrou ser uma estratégia simples e rápida para detecção de micro-organismos com potencial degradador de diesel aditivado com biodiesel. Recomenda-se, no entanto, cautela quanto ao tempo de incubação dos ensaios, uma vez que os micro-organismos apresentam diferenças quanto ao tempo inicial desprendido no processo de oxidação biológica e, consequentemente, na mudança de coloração do meio.

REFERÊNCIAS

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; SCHAEFER, C. E. *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, v. 1, p. 299-352, 2001.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ASTDR). *Total Petroleum Hydrocarbons*. 1999. Disponível em:<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp123.html>. Acesso em: 20 mar. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). *Resolução nº 35, de 09 de novembro de 2007*. Disponível em:< http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>. Acesso em: 27 fev. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). *Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis.* Rio de Janeiro, 2009a, 218 p. Disponível em: < http://www.anp.gov.br/?id=548>. Acesso em: 16 fev. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). *Boletim mensal do biodiesel*. dez., 2009b. Disponível em:<http://www.anp.gov.br/?id=472>. Acesso em: 16 fev. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). *Biodiesel – Introdução*. Disponível em:< http://www.anp.gov.br/?id=472>. Acesso em: 17 fev. 2010a

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). *Boletim mensal do biodiesel*. dez., 2010b. Disponível em:<http://www.anp.gov.br/?id=472>. Acesso em: 16 fev. 2010.

AGUIAR, Cristiane Rosas Chafim. *Desempenho de soja e braquiária na fitorremediação de solos contaminados com petróleo*. 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

ALAMRI, S. A. Use of microbiological and chemical methods for assessment of enhanced hydrocarbon bioremediation. *Journal of Biological Science*, v. 9, n. 1, p. 37-47, 2009.

ALUYOR, E. O.; OBAHIAGBON, K. O.; ORI-JSEU, M. Biodegradation of vegetable oils: a review. *Scientific Research and Essay*, v. 4, n. 6, p. 543-48, June, 2009.

ALVAREZ, P. J. Princípios e aplicações da biorremediação de BTEX. In: MOERI, Ernesto; COLELHO, Rodrigo; MARKER, Alessandra (Ed.) *Remediação e revitalização de áreas contaminadas. Aspectos técnicos, legais e financeiros*. São Paulo: Signus, 2004. Parte 2, p. 93-107.

AMBIENTEBRASIL. *Portal de notícias e conteúdo sobre meio ambiente do Brasil*. Disponível em:< http://noticias.ambientebrasil.com.br/clipping/2009/11/27/50073-conama-aprova-medidas-para-gestao-de-areas-contaminadas.html>. Acesso em: 04 dez. 2009.

ANDRADE, Daniela Marques. *Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina*. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catariana, Florianópolis, 2008.

ANDREO, Ana Paula. *Ensaios de respirometria: monitoração do CO_2 utilizando um sistema de FIA com detecção condutométrica*. 1999. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil na Área de Saneamento e Ambiente) - Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1999.

ARAÚJO, A. E.; SILVA, C. A. D.; AZEVEDO, D. M. P.; FREIRE, E. C.; RAMALHO, F. S.; ANDRADE, F. P.; FERREIRA, G. B.; SANTANA, J. C. F.; MEDEIROS, J. C.; SILVA, K. L. Cultivo de Algodão Irrigado. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. Disponível em:< http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoIrrigado/>. Acesso em: 13 mar. 2010.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. *Bioscience Journal*, v. 23, n. 3, p. 66-75, July/Sept., 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORAMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR 14283:* Resíduos em solos – determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro, 1999. 8 p.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, v. 45, n. 1, p. 180-209, Mar., 1981.

AZAMBUJA, E.; CANCELIER, D. B.; NANNI, A. S. Contaminação dos solos por LNAPL: discussão sobre diagnóstico e remediação. In: SIMPÓSIO DE PRÁTICA DE ENGENHARIA GEOTÉCNICA DA REGIÃO SUL, 2000, Porto Alegre. *Anais*... Porto Alegre: GEOSUL, 2000.

BAIRD, Colin. *Química Ambiental*. 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.

BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiology Methods*, v. 32, n. 2, p. 155-164, Apr., 1998.

BALIEIRO, F. C.; CEDDIA, M. B.; PEREIRA, M. G.; RESENDE, A. S.; FRANCO, A. A. Biomassa de raízes e regime hídrico do solo em plantio de *Pseudomanea guachapele* (Kunth) Harms em um planossolo háplico. *Floresta*, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 221-230, maio/ago., 2005.

BAPTISTA, Sandro José. *Seleção das melhores condições de biodegradação de petróleo em solo argisolo*. 2003. 163 f. Dissertação (Mestrado em Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

BARNWAL, B. K.; SHARMA, M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 9, n. 4, p. 363-378, Aug., 2005.

BARROS, D.; OLIVEIRA, V.; SANTANA, M. F. E.; CARVALHO, D. D. Caracterização ambiental dos postos de revenda de combustíveis no Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, XV, 2008, Natal. *Anais*... Natal: ABAS, 2008.

BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FREITAS, J. C.; NERO, L. A.; SOUZA, J. A.; SANTANA, E. H. W.; FRANCO, B. D. G. M. Frequency of 2,3,5 thriphenyltetrazólio chloride (TTC) non-reducing bactéria in pasteurized milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 30, n. 2, p. 137-140, Apr./June, 1999.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, C.; FRANKENBERGER Jr., W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, suppl. 1, p. 65-8, Nov., 2003.

BENTO, Douglas Mayer. *Análise química da degradação dos hidrocarbonetos de óleo diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS*. 2005. 112 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2005.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 9, p. 1049-1055, June, 2005.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; CLAIRE, C. Biossurfactantes. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. Cap. 7, p. 151-184.

BOCHNER, B. R.; SAVAGEAU, M. A. Generalized indicator plate for genetic, metabolic and taxonomic studies with microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 33, n. 2, p. 434-444, Feb., 1977.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 63-67, Aug. 2000.

BORGES, W.; LAGO, A.; FACHIN, S.; ELIS, V.; SANTOS, E. GPR utilizado na detecção da geometria de cavas usadas para disposição de resíduos de óleos lubrificantes. *Revista Brasileira de Geofísica*, v. 24, n. 4, p. 483-494, Oct./Dec., 2006.

BOUCHEZ, T.; PATUREAU, D.; DABERT, P.; JURETSCHKO, S.; DORÉ, J.; DELGENÈS, P.; MOLETTA, R.; WAGNER, M. Ecology study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology*, v. 2, n. 2, p. 179-190, Apr., 2000.

BRAUN, S.; APPEL, L. G.; SHMAL, M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel – a questão dos particulados. Estratégias atuais para redução e controle das emissões e tendências futuras. *Química Nova*, v. 27, n. 3, p. 472-482, May/June, 2003.

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

CAMARGO, J. A.; PEREIRA, N.; CABELLO, P. R.; TERAN, F. J. C. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para análise da atividade microbiana de solos sob aplicação de vinhaça. *Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia*, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 6, p. 264-271, maio/ago., 2009.

CANHOS, V. P.; COUTINHO, H. L. C.; VAZOLLER, R.; RUMJANEK, N.; ROSADO, A.; BARROS, E.; AZEVEDO, J. L PELLIZARI, V.; MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O.; MORAIS. G.; SCHENBERG, A. C. *Estratégia nacional de diversidade biológica. Microorganismos e biodiversidade de solos*. 1998. Disponível em:<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/doc/gtt10.pdf>. Acesso em: 24 out. 2008.

CARRETEIRO, R. P.; BELMIRO, P. N. A. *Lubrificantes e lubrificação industrial*. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência - IBP, 2006. 504 p.

CASTRO, R. A.; CARVALHO, F. P. J. C.; KRENZCYNSKI, M. C.; GONÇALVES, C. M.; OLIVEIRA, S.C.T.; CARVALHO, F. J. T. C.; CREPLIVE, M.; JOANELLO, Jr., L.A.; CONEGLIAN, D. Utilização do nitrato de potássio e peróxido de hidrogênio para biorremediação "*In situ*" de solos contaminados por petróleo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS, 4, 2005, Salvador, BA. *Anais*…Salvador: PDPETRO, 2005.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, v. 3, n. 1-2, p. 351-368, June, 1992.

CHAGAS-SPINELLI, Alessandra Carla Oliveira. *Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel*. 2007. 174 f. Tese (Doutorado em Geociências) - Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

CHEFETZ, B.; STIMLER, K.; SHECHTER, M.; DRORI, Y. Interactions of sodium azide with triazine herbicides: effect on sorption to soil. *Chemosphere*, v. 65, n. 2, p. 352-57, Oct., 2006.

CHIARANDA, H. S.; SCHAMBECK, C. M.; CORSEUIL, H. X. Avaliação da atenuação natural do biodiesel de soja puro (B100) e da mistura diesel/biodiesel (B20) em sistemas subsuperficiais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 25º, 2009, Recife. *Anais*... Recife: ABES, 2009.

CHIEREGATI, L. B.; SILVA, T. C. F.; RIZK, M. C. Caracterização e monitoramento do processo de biorremediação de um solo contaminado por óleo diesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 24, 2007, Belo Horizonte. *Anais*… Belo Horizonte: ABES, 2007.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor - Revista de Ciências Exatas e Engenharias*, Rio Grande, v. 13, p. 85-103, 2003.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). *CETESB L1. 022:* utilização de produtos biotecnológicos para tratamento de efluentes líquidos, resíduos sólidos e recuperação de locais contaminados. São Paulo, 1994 19 p.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). *Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo*. São Paulo: CETESB, 2001a.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). *Manual de Gerenciamento de áreas contaminadas* - Investigação para remediação. São Paulo: CETESB, 2001b. Disponível em: < http://www.cetesb.sp.gov.br/ Solo/areas_contaminadas/manual.asp>. Acesso em: 10 mar. 2008.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). *Relatório de emergências químicas atendidas*. São Paulo: CETESB, 2008, 81p. Disponível em:< http://www.cetesb.sp.gov.br/> Acesso em: 7 ago. 2009.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). *Emergências químicas - estatística do período de 1978 até agosto de 2009*. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/estatisticas/estatisticas.asp>. Acesso em: 7 ago. 2009.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). *Relação de áreas contaminadas:* texto explicativo. Disponível em:< http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp>. Acesso em: 24 jun. 2010.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DO TRANSPORTE (CNT). Boletim Ambiental do Despoluir. *CNT Transporte Atual***,** Brasília, ano 15, n. 174, fev., 2010. Edição Informativa do Sistema CNT.

CONSELHO NACIONAL DE POLÍTICA ENERGÉTICA (CNPE). Resolução n° 6, de 16 de setembro de 2009. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 26 out. 2009. Seção 1, p. 16.

CORONADO, C. R.; CARVALHO Jr., A.; YOSHIOKA, J. T.; SILVEIRA, J. L. Determination of ecological efficiency in internal combustion engines: the use of biodiesel. *Applied Thermal Engineering*, v. 29, n. 10, p. 1887-1892, July, 2009.

CORSEUIL, H. X.; MORENO, F. N. Phytoremediation potential of willow trees for aquifers contaminated with ethanol-blended gasoline. *Water Research*, v. 35, n. 12, p. 3013-17, Aug., 2001.

CORSEUIL, Henry. X. *Diretório dos grupos de pesquisa do Brasil*. Disponível em:< http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/detalhegrupo.jsp?grupo=0043307JCBUONX>. Acesso em: 4 jan. 2010.

COSTA, G. M.; BRITO, T. O.; SODRÉ, E. D.; MARQUES, M.; CORRÊA, S. M. Design, construção e operação de biorreator aeróbio em escala piloto para biorremediação de solos contaminados com petróleo e derivados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 24, 2007, Belo Horizonte. *Anais*… Belo Horizonte: ABES, 2007.

COSTA, A. H. R.; NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina e etanol. *Engenharia Sanitária e Ambiente*, v. 14, n. 2, p. 265-274, abr./jun., 2009.

COSTA, Melissa Riani. *Uso da respirometria para avaliação da biodegradação aeróbia de lixiviado de resíduos sólidos urbanos em latossolo vermelho-escuro*. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) - Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2009.

CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F.; ROSADO, A. S.; ROSÁRIO, M. *Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 45 p. (Tecnologia Ambiental, 47).

CUNNINGHAM, C. J.; PHILP, J. C. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in *ex situ* treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination & Reclamation*, v. 8, n. 4, p. 261-69, 2000.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status e perspectiva na academia e na indústria. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

D'AGOSTINHO, Adriana. *Estudo preliminar do comportamento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em solo por isoterma de sorção*. 2004. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de tecnologia Nuclear-Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DEJONGHE, W.; BOON, N.; SEGHERS, D.; TOP, E. M.; VERSTRAETE, W. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: mssing links. *Environmental Microbiology*, v. 3, n. 11, p. 649-657, Nov., 2001.

DEL ROSSO, Clarisse Barbosa. *Avaliação dos aportes de hidrocarbonetos à lagoa dos Patos (RS – Brasil)*. 2005. 107 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia física, Química e Geológica) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2005.

DeMello, J. A.; CARMICHAEL, C. A.; PEACOCK, E. E.; NELSON, R. K.; AREY J. S.; REDDY, C. M. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: an initial study. *Marine Pollution Bulletin*, v. 54, n. 7, p. 894-904, July, 2007.

DEMIRBAS, A. Political, economic and environmental impacts of biofuels. *Applied Energy*, v. 86, suppl. 1, p. S108-S117, Nov., 2009.

DEOTTI, Leonardo de Oliveira Guerra. *Controle de pH na técnica de biorremediação eletrocinética*. 2005. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Civil) - Instituto Alberto Luiz Coimbra, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

DIAS, M. C. L. L.; SILVA, W. R. *Teste de tetrazólio em sementes de café*. Londrina, Paraná: IAPAR, 1998. 16 p. (Boletim técnico, 59).

DIAS, Fábio Guimaro. *Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo*. 2007. 106 f. Tese (Doutor em Ciências de alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. *Manual de métodos de análise de solos*. 2 ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997. 212 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). *Mapa da distribuição de planossolos no Brasil e no Estado do Rio de Janeiro.* Rio de Janeiro, 2010. 2 mapas, color. Escala 1:5.000.000.

ENELL, A.; REICHENBERG, F.; WARFVINGE, P.; EWALD, G. A column method for determination of leaching of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged contaminated soil. *Chemosphere*, v. 54, n. 6, p. 707-715, Feb., 2004.

ENVIRONMENTAL SECURITY TECHNOLOGY CERTIFICATION PROGAM (ESTCP). *Bioaugmentation for remediation of chlorinated solvents: technology development, status and research needs*. 2005. Disponível em:< http://www.clu-in.org/techfocus/>. Acesso em: 27 fev. 2010.

ESPÍRITO SANTO, Lidiane Silva do. *Biodegradabilidade de óleo diesel por microorganismos nativos da areia da praia de Suape-Pe e predição de um modelo relacionado ao derramamento do poluente.* 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

FABIAN, A. J.; OTTONI FILHO, B. T. Determinação de capacidade de campo in situ ou através de equações de regressão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 35, n. 5, p. 1026-1036, maio, 2000.

FANTROUSSI, S. E; AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, n. 3, p. 268-275, May, 2005.

FAVERO, J. L.; MUNIZ, A. R.; SANTOS, R. P. B. Análise teórico-experimental da dispersão de poluentes líquidos no solo. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 4, p. 410-16, out./dez., 2007.

FAY, E. F.; SILVA, C. M. M.; MELO, I. S. Degradação abiótica de xenobióticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2008. Cap. 20, p. 463-477.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 19-23, jan./fev., 2005.

FERREIRA, S. L.; SANTOS, A. M.; SOUZA, G. R; POLITO, W. L.; MÓDOLO, D. L. Análise por cromatografia gasosa de BTEX nas emissões de motor de combustão interna alimentado com diesel e mistura diesel-biodiesel (B10). *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 539-545, 2008.

FERRERA-CERRATO, R.; ROJAS-AVELIZAPA, N. G.; POGGI-VARALDO; H. M.; ALARCÓN, A.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Processos de biorremediación de suelo y água contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v. 48, n. 2, p.179-187, abr./jun., 2006.

FIGUEIREDO, A. M. G.; MORCELLI, C. P. R.; SÍGOLO, J. B. Determinação de metáis em solos próximos à Rodovia dos Bandeirantes, São Paulo, por ativação neutrónica. In: INAC - INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE, 2005, Santos, São Paulo. *Anais*… São Paulo: ABEN, 2005.

FILHO, Manuel Alves. A legião microbiana avança contra os poluentes. *Jornal da Unicamp*, São Paulo, 215 ed., 2-8 de jun. 2003.

FILHO, Manuel Alves. Quando a natureza socorre a natureza. *Jornal da Unicamp*, São Paulo, 289 ed., 2 maio a 5 jun. 2005.

FINOTTI, A. R.; CAICEDO, N. O. L. Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados de petróleo: toxicidade e legislação brasileira. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 6, n. 2, p. 29-46, abr./jun., 2001.

FORNO, Rafaela Ghellere Dal. *Avaliação da poluição do solo por derivados de petróleo e sua remediação*. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do solo) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FORTES NETO, P.; FERNANDES, S. A. P.; JAHNEL, M. C. Microbiota do solo como indicadora da poluição do solo e do ambiente. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. Cap. 14, p. 259-274. Publicação online. Disponível em:< http://www.iac.sp.gov.br/btonline/Livro_Microbiota_do_Solo_e_Qualidade_Ambiental.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2010.

FRITSCHE, W.; HOFRICHTER, M. 2000. *Aerobic degradation by microorganism*s. In: KLEIN, J. Enviromental Processes II. Second Edition. WILEY-VCH Verlag GmbH: Federal Republic of Germany, 2000. Vol. 11b, cap. 6, p. 145 - 168. Disponível em:<http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf>. Acesso em 13 jul. 2009.

FRONZA, Lice. *Capacidade de Liberação de Hidrocarbonetos dos Sedimentos de Áreas Contaminadas do Estuário da Lagoa dos Patos - RS*. 2006. 174 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

FURTADO, M. R. Ataque microbiano remedia áreas contaminadas. *Química e Derivados*, n. 389, dez., 2001. Disponível em:< http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd389/biotecnologia1.htm1>. Acesso em: 15 fev. 2010.

GADD, G. M. *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press, 2001. 481 p.

GARON, D.; SAGE, L.; WOUESSIDJEWE, D.; SEIGLE-MURANDI, F. Enhanced degradation of fluorene in soil slurry by *Absidia cylindrospora* and maltosyl-cyclodextrin. *Chemosphere*, v. 56, n. 2, p. 159-166, July, 2004.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento***,** ano 8, n. 34, p. 36-43, jan./jun., 2005.

GENTRY, T. J.; RESING, C.; PEPPER, I. L. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 34, n. 5, p. 447-49, Sept., 2004.

GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R. N. Z. A., SALLEH, A. B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Biodeterioration & Biodegradation*, v. 54, n. 1, p. 61-7, July, 2004.

GOMES, Edelvio de Barros. *Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo terminal portuário de Suape-PE*. 2004. 11 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

GOMES, A. P N.; LIMAS, M. M.; CORSEUIL, H. X. Biodegradação do biodiesel de mamona em águas superficiais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 24º, 2007, Minas Gerais. *Anais*... Belo Horizonte, MG: FITABES, 2007.

GOMES, Ana Paula Nogareti. *Biodegradação de biodiesel de soja, mamona e hidrocarbonetos monoaromáticos em ambientes aquáticos*. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GOOGLE MAPS. Serviço de pesquisa e visualização de mapas e imagens de satélite da Terra. Disponível em: < http://maps.google.com.br/maps?hl=pt-BR&tab=wl>. Acesso em: 10 jun. 2010.

GOUVEIA, Jorge Luiz Nobre. *Atuação de equipes de atendimento emergencial em vazamentos de combustíveis em postos e sistemas retalhistas*. 2004. 154 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

GÜNTHER, W R. Áreas contaminadas no contexto da gestão urbana. *São Paulo em Perspectiva*, v. 20, n. 2, p. 105-117, abr./jun., 2006.

HANSON, K. G.; DESAI, J.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*, v. 7, n. 10, p. 745-48, Oct., 1993.

HEITKAMP, M. A.; CERNIGLIA, C. E. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp in microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, n. 8, p. 1968-1973, Aug., 1989.

HERNÁNDEZ, M.; MORGANTE, V.; FLORES, C.; VILLALOBOS, P.; GONZÁLEZ, M.; MIRALLES, P.; DINAMARCA, A.; SEEGER, M. Modern approaches for the study of s-triazine herbicide bioremediation in agricultural soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 8, n. 8, p. 19-30, 2008.

HOLLYWOOD, K. A.; SHAID, I. T.; GOODACRE, R. Monitoring the succinate dehydrogenase activity isolated from mitochondria by surface enhanced raman scattering. *Journal of Physical Chemistry*, v. 114, n. 16, p. 7308-7313, Jan., 2010.

HOLMAN, H. Y.; TSANG, Y. W. *Effect of soil moisture on biodegradation of petroleum hydrocarbons*. In: Situ Aeration: air sparging, bioventing and related bioremediation processes [Pat. In Situ On-Site bioremediation. Int. Symp., San Diego, USA, April 24-27] 1995. 323-332 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). *Relatório Acidentes Ambientais 2006 e 2007*. Brasília: IBAMA, 2008, 47 p.

JACCQUES, Rodrigo Josemar Seminoti. *Biorremediação do antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo*. 2005. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

JACCQUES; R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 37, n. 4, p.1192-1201, jul./ago., 2007.

JACCQUES; R. J. S.; OKEKE, B. C.; BENTO, F. M.; TEXEIRA, A. S.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F. A. O. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminates soil. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 7, p. 2637-2643, May, 2008.

JOO, Hung-Soo.; NDEGWA, P. M.; SHODA, M.; PHAE, Chae-Gun. Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste. *Environmental Pollution*, v.156, n. 3, p.891-896, Dec., 2008.

JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, v. 107, n. 2, p. 245-254, Feb., 2000.

JUHASZ, A. L.; NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 45, n. 1-2, p. 57-88, Jan., 2000.

KAIPPER, Beatriz Inês Almeida. *Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel*. 2003. 178 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

KANALY, R. A.; HARAYMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons bay bacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 8, p. 2059-2067, 2000.

KÄSTNER, M.; BREUER-JAMMALI, M.; MAHRO, B. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 1, p. 359-362, Jan., 1998.

KHALIL, C. N. As tecnologias de produção de biodiesel. In: FERREIRA, J. R.; CRISTO, C. M. P. N (Coord.). *O futuro da indústria*: biodiesel. Brasília: MDIC-ST/IEL, 2006. Cap. 6, p. 83-90 (Política Industrial, Tecnologia e de Comércio Exterior, 14).

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Enviornmental Management,* v. 71, n. 2, p. 95-122, 2004.

KHAN, N.; WARLTH, A.; LUK, G. A. Comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends and diesel on aquatic organisms. *Journal Air & Waste Manage*, v. 57, n. 286-296, 2007.

KING, R. B.; LONG, G. M.; SHELDON, J. K. *Pratical environmental bioremediation - the field guide*. 2th ed. CRC PRESS, 1997, 208 p.

KNOTHE, G. R. Historical perspectives on vegetable oil-based diesel fuels. *International News on Fats, Oils and Related Materials*, v. 12, p. 103-107, 2001.

KOMUKAI-NAKAMURA, N.; SUGIURA, K.; YAMAUCHI-INOMATA, Y.; TOKI, H.; VENKATESWARAN, K.; YAMAMOTO, S.; TANAKA, H.; HARAYAMA, S. Construction of bacterial consortia that degrade arabian light crude oil. *Journal of fermentation and bioengineering*, v. 82, n. 6, p. 570-74, 1996.

KORIN MEIO AMBIENTE. Empresa especializada em gerenciamento ambiental. Disponível em: http://www.kmambiente.com.br/produtos.html>. Acesso em: 15 maio 2010.

KOSERSKI, G. R.; HESS, S. C. Estimativa dos poluentes emitidos pelos ônibus e microônibus de Campo Grande/MS, empregando como combustível diesel, biodiesel ou gás natural. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 11, n. 2, p. 113-7, abr./jun., 2006

LABORATÓRIO DE REMEDIAÇÃO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS (REMAS). Apresenta informações na área de remediação de solos e águas subterrâneas contaminados por substâncias orgânicas tóxicas. Disponível em:<http://www.remas.ufsc.br/conteudo.php?id=37>. Acesso em: 24 jan. 2010.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the Environmental. *Microbiological Reviews*, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

LEE, Y. B.; LORENZ, N.; DICK, K. L.; DICK, R. P. Cold storage and pretreatment incubation effects on soil microbial properties. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 71, n. 11, p. 1299-1305, July/August, 2007.

LEITE, Rosa Cristina Souza. *Degradação ambiental de óleo diesel aditivado e em mistura com biodiesel*. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2007.

LEMOS, J. L. S.; BARROS, C. A.; OLIVEIRA, S. D.; REICHE, A. P. *Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs)*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 58 p. (Tecnologia Ambiental, 46).

LIMA, Cristiane Andrade. *Quantificação do decréscimo do risco associado à biorremediação de um solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo*. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

LIMA, D. L.; LIMA, S. F.; SILVA, V. V.; SANT´ANA, A. E. G.; REBOUÇAS, L. M. C. Biomarcadores saturados em óleos da bacia Sergipe-Alagoas Brasil: distribuição e concentração. *Geochimica Brasiliensis*, v. 21, n. 1, p. 99-110, 2007.

LIU, PAO-WEN G.; WHANG, LIANG-MING; YANG, MING-CHIEH; CHENG, SHENG-SHUNG. Biodegradation of diesel-contaminated soil: a soil column study. *Journal of Chinese Institute of Chemical Engineers*, v. 39, n. 5, p. 419-428, 2008.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, L. S. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

LÓPEZ, D. A. R.; MUELLER, D. Uso de peróxido de cálcio na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos. *Caderno de Pesquisa série Biologia*, v. 21, n. 3, p. 61-72, 2009.

MACHADO, Angélica Patrícia da Silva. *Uso de técnicas de detecção rápida de fungos filamentosos na água*. 2006. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2006.

MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. *Environmental microbiology*. San Diego, California: Academic Press, 2000. 585p.

MAKAREVICIENE, V.; JANULIS, P. Environmental effect of rapeseed oil ethyl ester. *Renewable Energy*, v. 28, n. 15, p. 2395-2403, 2003.

MARCHAL, R; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J. P. Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & Gás Science and Technology*, v. 58, n. 4, p. 441-48, 2003.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, v. 40, n. 4, p. 339-346, 2000.

MARIANO, Adriano Pinto. *Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel*. 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 2006.

MARIANO, A. P.; BONOTTO, D. M.; ANGELIS, D. F.; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIEIRO, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 133-142, 2008.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. C.; BONOTTO, D. M. Investigation about the efficiency of the bioaugmentation technique when applied to diesel oil contaminated soils. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 5, p. 1297-1312, 2009.

MARQUES, W. F.; LOBO, K. M. S.; BEZERRA, D. A. C.; COUTINHO, H. D. M. Ecologia e fisiologia de microorganismos termofílicos. *Unimar Ciências*, Marília, São Paulo, v. 12, n. 1-2, p. 47-52, 2003.

MARQUES, G. G. Biodiesel: visão da indústria automobilística. In: FERREIRA, J. R.; CRISTO, C. M. P. N. *O futuro da indústria*: biodiesel. Brasília: MDIC-ST/IEL, 2006. Cap. 9, p. 127-136 (Política Industrial, Tecnologia e de Comércio Exterior, 14).

MARQUES, M. *Fitorremediação de solos multi-contaminados por HPAs e metais pesados a partir de óleo lubrificante usado*. Projeto aprovado pelo Edital Universal CNPq No 15/2007, Processo 475644/2007 no âmbito do Programa de Pesquisa Científica, Tecnológica e Inovação, MCT/CNPq, 2007.

MARQUES, M. *Diretório dos grupos de pesquisa no Brasil*. Disponível em: <http://dgp.cnpq.br/buscaoperacional/detalhegrupo.jsp?grupo=03267EG5SG9>. Acesso em: 03 mar. 2010.

MATHEW, M.; TAN, L. R.; SU, Q.; YANG, X.; BAXTER, M.; SENIOR, E. Bioremediation of 6% [w/w] diesel-contaminated mainland soil in Singapore: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Engineering in Life Sciences*, v. 6, n. 1, p. 63-67, 2006.

MAZZUCO, Lilian Maria. *Atenuação natural de hidrocarbonetos aromáticos em aqüíferos contaminados com óleo diesel*. 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MELLO, C. R.; OLIVEIRA, G. C.; RESCK, D. V. S.; LIMA, J. M.; DIAS JÚNIOR, M. S. Estimativa da capacidade de campo baseada no ponto de inflexão da curva de característica. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 26, n. 4, p. 836-841, jul./ago., 2002.

MELLO, F. O. T.; PAULILLO, L. F.; VIAN, C. E. F. O biodiesel no Brasil: panorama, perspectivas e desafio. *Informações Econômicas*, São Paulo, v. 37, n. 1, jan., 2007.

MELLO, G. S. L.; MORITA, D. M.; MANFREDINI, S.; RIVERA, I. N. G. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 1, p. 71-8, jan./fev., 2007.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Estratégias de isolamento de microorganismos envolvidos na degradação de xenobióticos. In:_____. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. Cap. 9, p. 99-216.

MILLER, N. J.; MUDGE, S. M. The effect of biodiesel on the rate of removal and weathering characteristics of crude oil within artificial sand columns. *Spill Science & Technology Bulletin*, v. 4, n. 1, p. 17-33, 2007.

MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, L. G. S.; SÉRVULO, E. F. C.; CARVALHO, D. D. *Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 95 p. (Tecnologia Ambiental, 50).

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa 62, de 22 de agosto de 2003. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14. Anexo IV.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Disponível em:< http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=ascom.noticiaMMA&idEstrutura=8&codigo=5373>. Acesso em: 04 dez. 2009.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M; VERGA-JAQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Applied Soil Ecology*, v. 27, n. 2, p. 165-175, 2004.

MOREIRA, C. A.; DOURADO, J. C. Análise de contaminantes de fase líquida não-aquosa (*NAPLs*) por aplicação do método eletromagnético indutivo (EM). *Revista Brasileira de Geofísica*, v. 23, n. 3, p. 213-220, 2005.

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

MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated whit aromatic compounds. *Microbiology Research*, v. 165, n. 5, p. 363-375, 2010.

MUKRED, A. M.; HAMID, A. A.; HAMZAH, A.; YUSOFF, W. M. W. Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water. *OnLine Journal of Biological Sciences*, v. 8, n. 4, p. 73-9, 2008.

NAMKOONG, W.; HWANG, EUI-YOUNG; PARK, JOON-SEOK; CHOI, JUNG-YOUNG. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution*, v. 119, n. 1, p. 23-31, 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *In situ bioremediation: when does it work?* National Academy Press, Washington, D.C. 1993. 208 p.

NETO, P. R. C.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 531-37, 2000.

NETTO, A. O. A.; NACIF, P. G. S.; RESENDE, J. O. Avaliação do conceito de capacidade de campo para um latossolo amarelo coeso do Estado da Bahia. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 23, p.661-667, 1999.

NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): Uma revisão metodológica. *Química. Nova*, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. Importância do etanol na atenuação natural de águas subterrâneas impactadas por gasolina. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 3, p. 259-265, jul./set., 2007.

OLIVEIRA, Sérgio André de. *Aplicação foliar de nitrato e microorganismos eficazes (EM) e seus efeitos sobre a participação de nutrientes em variedades de milho (Zea mays* L.*) cultivadas com resíduo industrial*. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2006.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. *Preservação e prospecção de recursos microbianos*. Multiciência, São Paulo. 2006. Disponível em: < http://www.multiciencia.unicamp.br/>. Acesso em 20 out. 2008.

OLIVEIRA, D. S.; BAISCH, P. R. M.; MACHADO, M. I. Degradação do petróleo em ambiente estuarino da lagoa dos Patos através de um derrame induzido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS, 4, 2007, Campinas, SP. *Anais*… Campinas: PDPETRO, 2007.

OLIVEIRA, T. B.; COSTA, G. M.; MARQUES, M.; CORRÊA, S. M. MACEDO, J. R. Biorremediação de solos contaminados por diesel e mistura de diesel/biodiesel-B5 em biorreatores aeróbios. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 24, 2007, Belo Horizonte. *Anais*… Belo Horizonte: ABES, 2007.

OLIVEIRA, J. B. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos: banco de dados. Embrapa Solos; 2008. Disponível em:< http://200.20.158.8/blogs/sibcs/>. Acesso em: 10 fev. 2010.

OTOTUMI, A.; VENTURA, M. U.; NEVES, P. M. O. J. Parâmetros agronômicos em couve-brócolos (*Brassica oleraceae* L. var. itálica) em sistema convencional, orgânico e natural. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 22, n. 2, p. 161-64, jul./dez., 2001.

OWSIANIAK, M.; CHRAZANOWSKI, L.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; HEIPIEPER, H. J. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: effect of the type blend and addition of biosurfactants. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 3, p. 1497-1500, 2009.

PAGGETTO, P. D. Brasil pode liberar venda de carros com motor a diesel. São Paulo: G1 Portal de notícias da Globo, 04 set., 2009. Disponível em:< http://g1.globo.com/Noticias/Carros/0,,MUL1287570-9658,00%20BRASIL+PODE+LIBERAR+VENDA+DE+CARROS+COM+MOTOR+A+DIESEL.html>. Acesso em: 13 fev. 2010.

PALA, Danielle Marins. *Estudo da biorremediação de solo impactado por petróleo*. 2002. 114 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Instituto Alberto Luiz Coimbra (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

PALUDO, Deise. *Intemperização de fontes de contaminação de óleo diesel em águas subterrâneas na presença e ausência de etanol*. 2007. 140 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PARENTE, E. J. S. Biodiesel no plural. In: FERREIRA, J. R.; CRISTO, C. M. P. N. *O futuro da indústria*: biodiesel. Brasília: MDIC-ST/IEL, 2006. Cap. 7, p. 91-104 (Política Industrial, Tecnologia e de Comércio Exterior, 14).

PASQUALINO, J. C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass and Bioenergy*, v. 30, n. 10, p. 874-79, 2006.

PEDROZO, M. F. N.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SHNEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. *Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo*. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2002. 246 p. (Cadernos de Referência Ambiental, 42).

PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; TAKETANI, R. G. Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Microbiologia Ambiental*. 2 ed. Jaguariúna – SP: Embrapa Meio Ambiente, 2008. Cap. 4, p. 83-106.

PEPPER, I. L.; GERBA, C. P.; BRUSSEAU, M. L. *Environmental and pollution science*. 2 ed. San Diego, Califórnia: Academic Press, 2006, 532 p.

PEREIRA, J. C. *Os microorganismos e os metais pesados no solo*. 2001. 14 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 132).

PEREIRA, Carolina Borges. *População bacteriana associada à degradação de hidrocarbonetos de petróleo*: uma abordagem molecular. 2006. 177 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

PEREIRA, Priscila Fernanda da Silva. *Perfil analítico da biodegradação de solos arenoso e argiloso contaminados por óleo cru*. 2008. 215 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PETROBRÁS. *Produtos automotivos*. Disponível em: < http://www.br.com.br/wps/portal/PortalDeConteudo>. Acesso em: 20 out. 2009.

PIEPER, D. H; REINEKE, W. Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, n. 3, p. 262-270, 2000.

PIRÔLLO, Maria Paula Santos. *Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos*. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 2006.

PLACHÁ, D.; RACLAVSKÁ, H.; MATÝSEK, D.; RÜMMELI, M. H. The polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soils in the Region of Valasske Meziric, the Czech Republic. *Gheocmical Transactions*, v. 10, n. 30, p. 1-21, 2009.

POUSA, G. P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. *Energy Policy*, v. 35, n. 11, p. 5393-98, 2007.

PROVIDENTI, M. A.; LEE, H..; TREVORS, J. T. K. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 12, n. 6, p. 379-395, 1993.

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

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sluge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, v. 90, n. 2, p. 159-168, 2003.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M. Biodiesel – um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, ano 6, n. 31, p. 28-37, jul./dez., 2003.

RATHMANN, R.; BENEDETTI, O.; PADULA, D. Análise da introdução do biodiesel na matriz energética brasileira sob as perspectivas do desenvolvimento sustentável e da inovação. In: SEMINÁRIOS EM ADMINISTRAÇÃO, IX, 2006, São Paulo. *Anais*... São Paulo: IX SEMEAD, 2006.

REID, B. J.; JONES, K. C.; SEMPLE, K. T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments: a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution*, v. 108, n. 1, p.103-112, 2000.

RICHARD, J. Y.; VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodegradation & Biodegradation*, v. 43, n. 2-3, p. 93-100, 1999.

RICHARD, T. L.; HAMELERS, H. V. M.; VEEKEN, A.; SILVA, T. Moisture relationships in composting Process. *Compost Science & Utilization.*, v. 10, n. 4, p. 286-302, 2002.

RICHTER, E. M.; RICHTER, A. S.; SCHAFHAUSER, E.; OLIVEIRA, J. Experiências validadas com bioterápicos e microorganismos eficazes (Embiotic®) na produção animal agroecológica. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 4, n. 2, p. 1290-1292, nov., 2009.

RIFFALDI, R.; LEVI-MINZI, R.; CARDELLI, R.; PALUMBO, S.; SAVIOZZI, A. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 170, p. 3-15, 2006.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de queima geral. *Química. Nova*, v. 30, n. 5, p. 1374-1380, 2007.

RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C.; SOBRAL, L. G. S. *Biorremediação de solos contaminados por petróleos: ênfase no uso de biorreatores*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007. 76 p. (Tecnologia Ambiental, 37).

ROMANTSCHUK, M.; SARAND, I.; PETÄNEN, T.; PELTOLA, R.; JONSSON-VIHANNE, M.; KOIVULA, T.; YRJÄLÄ, K.; HAAHTELA, K. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environmental Pollution*, v. 107, n .2, p. 179-185, 2000.

ROSA, Anabela. Porto. *Processos de biorremediação na mitigação do impacto ambiental, devido a eventuais derrames de óleo na bacia de campos – experimentos laboratoriais*. 2001. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Reservatório e de Exploração), Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, Macaé, Rio de Janeiro, 2001.

ROSA, A. P.; TRIGÜIS, J. A. Processo de biorremediação usando fertilizante NPK em eventuais derrames de óleo – experimentos laboratoriais. *Revista Brasileira de Geociências*, v. 36, n. 2, p. 232-242, 2006.

ROZYCKI; M.; BARTHA, R. Problems associated with the use of azide as an inhibitor of microbial activity in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 833-36, 1981.

SABATÉ, J.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A. M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 54, n. 1, p. 19-25, 2004.

SANT´ANA, A.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre os métodos rápidos Simplate^{R} TPC – CI e Petrifilm^{R} AC e os métodos convencionais de contagem em placas para enumeração de aeróbios mesófilos em sorvete. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 6, n. 1, p. 85-9, jan./jun., 2003.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; OLIVEIRA, J. B.; COELHO, M. R.; LUMBRELAS, J. F.; CUNHA, T. J. F. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2 ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.

SANTOS R. M.; LEITE, S. G. F.; SOBRAL, L G. S.; RIZZO, A. C. L. Remediação de solo contaminados por petróleo em biopilhas – escala piloto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS, 4, 2007, Campinas, SP. *Anais*…Campinas, São Paulo: PDPETRO, 2007.

SANTOS, Renata da Matta. *Avaliação da adição do pó da casca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo*. 2007. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SARKAR, D. M.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biossolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*, v. 136, n. 1, p. 187-195, 2005.

SCHMIDT, Celina Aída Bittencourt. *Aplicação da técnica eletrocinética em laboratório a dois tipos de solos argilosos*. 2004. 333 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Civil), Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SCHENK, T. Desenvolvimento e aplicação de técnicas microbiológicas progressivas para remediação de contaminantes orgânicos no solo e nas águas subterrâneas. In: MOERI, E.; COELHO, R.; MARKER, A. *Remediação e revitalização de áreas contaminadas*. São Paulo: Signus, 2004, 233 p.

SCHULTZ, F. M.; MEYER, D. D.; CERQUEIRA, V. S.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Utilização de indicadores redox (TTC e DCPIP) na seleção de microorganismos degradadores de biodiesel: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25, 2009, Porto de Galinhas. *Resumos*… Porto de Galinhas, PE, 2009. Disponível em:< http://sbmicrobiologia.org.br/PDF/cdsbm/trabalhos.htm>. Acesso em: 30 abr. 2010.

SEABRA, Paulo Negrais Carneiro. *Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados por petróleo*. 2005. 167 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

SEABRA, Paulo Negrais. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Microbiologia Ambiental*. 2 ed. Jaguariúna – SP: Embrapa Meio Ambiente, 2008. Cap. 24, p. 547-570.

SEKLEMOVA, E.; PAVLOVA, A.; KOVACHEVA, K. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation*, v. 12, n. 5, p. 311-16, 2001.

SEMPLE, K. T.; REID, B. J.; FERMOR, T. R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*, v. 112, n. 2, p. 269-283, 2001.

SEPÚLVEDA, T. V.; TREJO, J. A. V. *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México: INE-SEMARNAT, 2002. 64 p.

SILVA, B. C. P.; VIDAL, D. M.; QUEIROZ, P. I. B. Efeito da sorção no transporte de contaminantes orgânicos em solos argilosos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEOTECNIA, 4º, 1999, Salvador. *Anais*... Salvador: REGEO, 1999. v.1, p. 307-314.

SILVA, R. L. M.; BARRA, C. M.; MONTEIRO, T. C. N.; BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1599-1607, nov./dez., 2002.

SILVA, Edmilson Pinto. *Avaliação preliminar do potencial de aplicação da tecnologia de biopilhas para a biorremediação do solo de Guamaré- RN*. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2004.

SILVA JR, Waldir Veríssimo. *Probabilidade de cobertura de intervalos de confiança assintótico, p- bootstrap e t-bootstrap, para alguns parâmetros da distribuição Weibull*. 2005. 94 f. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharelado em Estatística) - Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2005.

SILVA, C. M. S.; MELO, I. S.; FAY, E. F. *Biotransformação de agrotóxicos e biorremediação*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006, 145-192 p. Disponível em:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/catalogo/REC000fdqazf0202wx5eo0a2ndxy9fvm4dm.html>. Acesso em: 13 mar. 2010.

SILVA, Maria Sofia Carmona Rodrigues Pereira. *Avaliação e remediação de zona contaminada por hidrocarbonetos. Caso de estudo: "contaminação em um armazém de lubrificantes"*. 2008. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente do perfil de Gestão e Sistemas Ambientais) - Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2008.

SILVA, I. S.; SANTOS, E. C.; MENEZES, C. R.; FARIA, A. F.; FRANCISCON, E.; GROSSMAN, M.; DURRANT, L. R. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 20, p. 4669-4675, 2009.

SINGER, A. C.; VAN DER GAST, C. J.; THOMPSON, L. P. Perspectives and vision for strain selection in biougmentation. *Trends in Biotechnology*, v. 23, n. 2, p. 74-7, 2005.

SINGH, A.; WARD, O. P. *Biodegradation and bioremediation*. 3 ed. Springer, 2004. 308 p.

SKIPPER, H. D.; WESTERMANN, D. T. Comparative effects of propylene oxide, sodium azide and autoclaving on selected soil properties. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 5, n. 4, p. 409-414, 1973.

SOARES JR, J..; MARIANO, A. P. ANGELIS, D. F. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 12, p. 2774-78, 2009.

SOUZA, C. C.; OLIVEIRA, F. A.; SILVA, I. F.; AMORIN NETO, M. S. Avaliação de métodos de determinação de água disponível em solo cultivado com algodão. *Pesquisa Agropecuária. Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 3, p. 337-341, mar., 2002.

SOUZA, C. D. R.; CHAAR, J. S.; SOUZA, R. C. R.; JEFFREYS, M. F.; SOUZA, K. S.; COSTA, E. J. C. et al. C. Caracterização físico-química das misturas binárias de biodiesel e diesel comercializados no Amazonas. *Acta Amazonica*, v. 39, n. 2, p. 383-88, 2009.

SPARKS, Donald. L. *Environmental soil chemistry*. 2th ed. San Diego, California: Academic Press, 2003. 352 p.

SPINELLI, Leandro de Freitas. *Biorremediação, toxicidade e lesão celular em derramamentos de gasolina*. 2005. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

STANFORD, N. P.; RODRIGUES, J. J. V.; HECK, R. J.; ANDRADE, D. E. G. T. Propriedades físicas e químicas dos solos. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T, (Ed.) *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005, 398 p.

STEFENS, Josemar Luis. *Caracterização molecular de compostos orgânicos biogênicos e antropogênicos em sedimentos da lagoa Rodrigo de Freitas Rio de Janeiro (RJ)*. 2006. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

STEIN, R. T.; SEGATTO, B. P.; MÖRCHBÄCHER, A. P.; TRAMONTINI, C.; BASTIANI, F.; KORNDÖRFER, K.; OLIVEIRA, E. C. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de solo próximas a BR 386 na cidade de Lajeado/RS. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 16, 2008, Blumenau, Santa Catarina. *Resumos*… Blumenau: SBQSUL, 2008.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. 70º aniversário do biodiesel em 2007: evolução histórica e situação atual no Brasil. *Química. Nova*, v. 30, n. 8, p. 2068-2071, 2007.

TAPAJÓS, Priscila Bandeira de Albrecht. *Estudo da mobilidade e da biodegradação de um óleo mineral em solo*. 2008. 205 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

TAYLOR, L. T.; JONES, D. M. Bioremediation of coal tar PAH in soils using biodiesel. *Chemosphere*, v. 44, n. 5, p. 1131-36, 2001.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTEXS e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*, v. 27, n. 3, p. 441-46, 2004.

THOMÉ, A.; KNOP, A. Movimento de contaminantes no solo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE USO DA ÁGUA NA AGRICULTUA, 2, 2006, Passo Fundo, Rio Grande do Sul. *Anais*… Rio Grande do Sul: UPF, 2006. v. 1, p. 1-14. Disponível em: <http://www.upf.br/coaju/download/contaminantesII.pdf>. Acesso em: 17 set. 2008

THOMPSON, I. P.; VAN DER GAST, C. J.; CIRIC, L.; SINGER, A. C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology*, v. 7, n. 7, p. 909-915, 2005.

TOMASELLA, R. C.; MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F. Biodegradação aeróbia das misturas de gasolina e óleo diesel com butanol. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 21, 2009, São José do Rio Preto, São Paulo. *Anais*... Rio Claro, São Paulo: UNESP, 2009. Disponível em:< http://prope.unesp.br/xxi_cic/trabalhos.htm#tema2>. Acesso em: 05 maio de 2010.

TRABUE, S. L.; PALMQUIST, D. E.; LYDICK, T. M.; SINGLES, S. K. Effects of soil storage on the microbial community and degradation of metsulfuron-methyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 1, p. 142-151, 2006.

TREVORS, J. T. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods*, v. 26, p. 53-9, 1996.

TRIGUEROS, Daniela Estelita Goes. *Avaliação da cinética de biodegradação dos compostos tóxicos: benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e fenol*. 2008. 157 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Paraná, 2008.

TRINDADE, Pedro Veltri Ormastroni. *Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo*. 2002. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

UENO, A.; HASANUZZAMAN, M.; YUMOTO, I.; OKUYMA, H. Verification of degradation of n-alkenes in diesel oil by Pseudomonas aeruginosa strain WatG in soil microcosms. *Current Microbiology*, v. 52, n. 3, p. 182-85, 2006.

UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S.EPA). *How to effectively free product at leaking underground storage tank sites: A guide for state regulators*. EPA 510-R-96-001, 1996. Disponível em:< http://epa.gov/OUST/pubs/fprg.htm>. Acesso em: 12 set. 2009.

UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S.EPA). Enhanced aerobic bioremediation. In: How to evaluate alternative cleanup technology for underground storage tank sites: a guide corrective action plan reviews. *EPA 5010-R-04-002*. May 2004. 69 p. Disponível em:< http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tums.htm>. Acesso em: 13 ago. 2009.

UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S.EPA). *Treatment technologies for site cleanup:* annual status report (twelfth edition). EPA-542-R-07-012. Washington D.C.: Office of Solid Waste and Emergency Response, 2007. Disponível em: < http://www.clu-in.org/asr/>. Acesso em: 12 set. 2008.

VAN HAMME, J. D..; SINGH, A., WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.

VAN VEEN, J. A.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, n. 2, p. 121-135, 1997.

VAZ, F. S.; VIEIRA, J. D. G. Degradação microbiana de diferentes misturas de Biodeisel/diesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 3, 2009, Brasilia. *Anais*… Brasilia: RBTB, 2009.

VECCHI, C. C. C.; TAROZO, R.; PINTO, J. P.; FACCIONE, M.; GUEDES, C. L. B. Processo térmico e fotoquímico na degradação de biodiesel do óleo de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS, 4, 2005, Salvador, BA. *Anais*… Salvador: PDPETRO, 2005.

VERICHIA, César Thomaz. *Avaliação da biorremediação de solo contaminado por óleo de transformador*. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo, 2008.

VIDALI, M. Bioremediation: an overview. *Pure Applied Chemistry*, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

VIEIRA, F. C.; NAHAS, E. Quantificação de bactérias totais e esporuladas no solo. *Scientia Agrícola*, v. 57, n. 3, p. 539-545, jul./set.,2000.

VIEIRA, T. M.; SILVA, E. P.; ANTONIOSI FILHO; ROBERTO; N.; VIEIRA, J. D. G. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2006, Brasília. *Anais*… Brasilia, DF: MCT/ABIPTI, 2006 (artigos técnico-científicos).

VIEIRA, T. M.; LIMA, M. F.; PEIXOTO, R. M.; VIEIRA, J. D. G. Utilização de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) em teste rápido de caracterização de potenciais biodegradadores de biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2007. *Anais*… Brasilia, DF: MCT/ABIPTI, 2007.

VIÑAS, M.; GRIFOLL, M.; SABATÉ, J.; SOLANAS, A. M. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 28, n. 5, p. 252-260, 2002.

VIÑAS, M.; SABATÉ, J.; ESPUNY, M. J.; SOLANAS, A. M. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Applied Environmental Microbiology*, v. 71, n. 11, p. 7008-7018, 2005.

VOGEL, T. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 7, n. 3, p. 311-16, 1996.

ZHANG, X.; PETERSON, C.; REECE, D.; HAWS, R.; MOLLER, G. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Trans ASAE*, v. 4, p. 1423-1430, 1998.

ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriological Reviews*, v. 10, p. 1-49, 1946.

ZONTA, J. B.; SOUZA, L. T.; DIAS, D. C. F. S.; ALVARENGA, E. M. Comparação de metodologias do teste de tetrazólio para sementes de cafeeiro. *IDESIA*, v. 27, n. 2, p. 17-23, 2009.

WAUDBY, J. G.; NELSON, Y. M. Biological feasibility and optmization of biospargin at a hydrocarbon-contaminated site. Proceedings of the Fourth International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. May, 2004. Disponível em:< http://works.bepress.com/ynelson/13/>. Acesso em: 10 out. 2008.

WOLF, D. C.; DAO, T. H.; SCOTT, H. D.; LAVY, T. L. Influence of sterilization methods on selected soil microbiological, physical, and chemical Properties. *Journal Environmental Quality*, v. 18, p. 39-44, 1989.

APÊNDICE A – Avaliação preliminar da capacidade de crescimento do consórcio comercial KMA em meio de cultivo líquido

Especificação dos ensaios de ativação (enriquecimento)

Meio 1 = 250 mL de meio + 10 g do melaço + 50 mL do inóculo
Meio 2 = 200 mL de meio + 10 g do melaço + 100 mL do inóculo
Meio 3 = 150 mL de meio + 10 g do melaço + 250 mL do inóculo
Meio 4 = 100 mL de meio + 10 g do melaço + 200 mL do inóculo

Tabela 24 – Crescimento microbiano (UFC mL^{-1}) do consórcio comercial KMA observado nos diferentes meios de cultivo testados. Média de duplicatas

Diluição	**Meio 1**	**Meio 2**	**Meio 3**	**Meio 4**
	72 horas	72 horas	72 horas	72 horas
10^{-3}	53	>300	>300	>300
10^{-4}	11	124	>300	>300
10^{-5}	3	18,5	193	>300
10^{-6}	0/0	1,5	57,5	299,5
10^{-7}	0/0	0/0	2	58,5
UFC mL^{-1}	$5,4 \times 10^{4}$	$1,2 \times 10^{6}$	$1,9 \times 10^{7}$	$4,5 \times 10^{8}$

APÊNDICE B - Avaliação preliminar da capacidade de crescimento da cultura microbiana RES e do consórcio comercial KMA em meio líquido BH

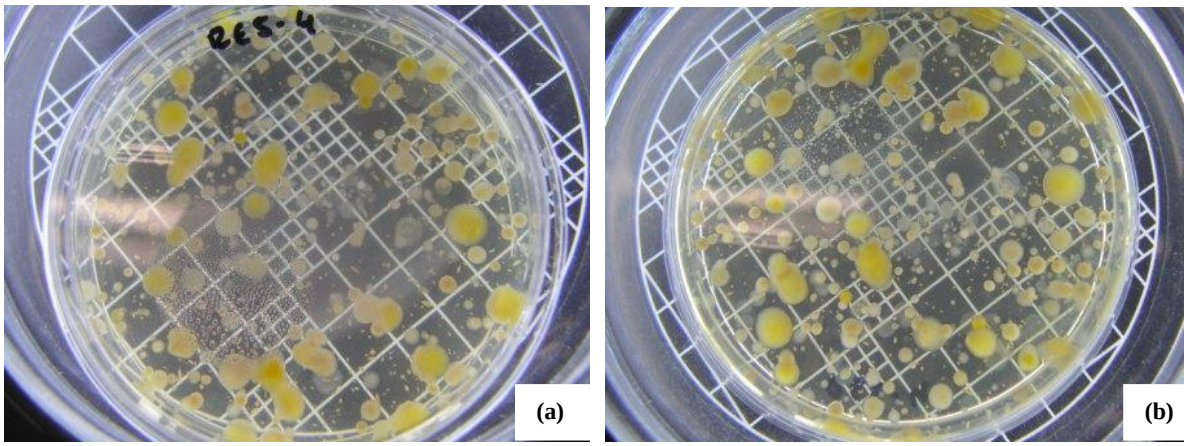


Figura 34 – Placas contendo meio sólido Agar-melaço evidenciando o crescimento da cultura microbiana RES após cultivo em meio líquido BH. (a) plaqueamento da diluição 10^{-4}; (b) plaqueamento da diluição 10^{-5}.
UFC mL^{-1} = 6,62 x 10^{7}.

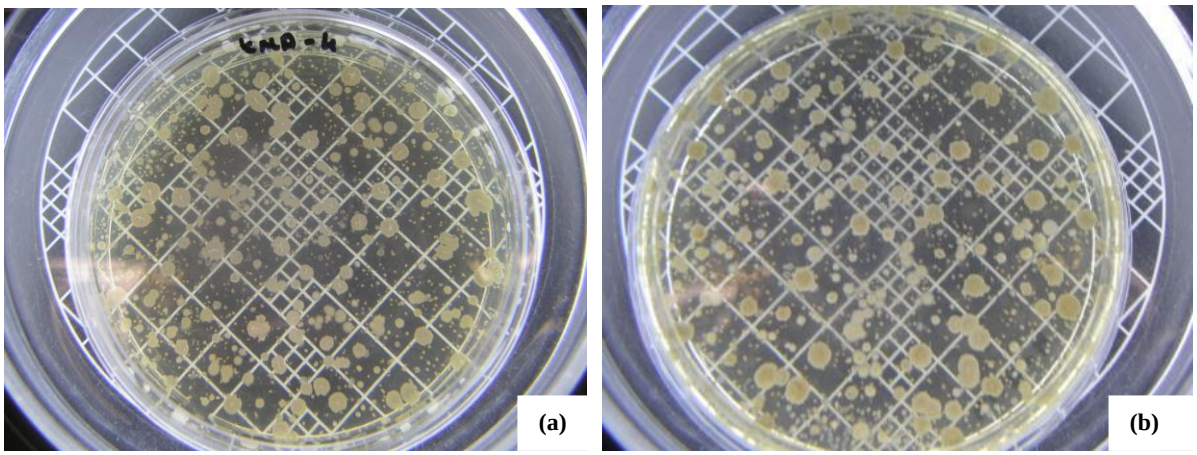


Figura 35 – Placas contendo meio sólido Agar-melaço evidenciando o crescimento do consórcio comercial KMA após cultivo em meio líquido BH. (a) plaqueamento da diluição 10^{-4}; (b) plaqueamento da diluição 10^{-5}.
UFC mL^{-1} = 5,76 x 10^{7}.

APÊNDICE C - Teste *Tukey*: comparação das médias de UFC entre os diferentes tratamentos através do tempo

Tabela 25 – Comparação das médias de UFC entre os tratamentos nos instantes zero (0) e 7 dias.

Tempo	Tratamento (I)	Tratamento (J)	Diferença média (I-J)	Erro Pd.	p-valor	Intervalo de confiança 95%	
						L. Inferior	L. Superior
0 dias	PA	BE_1	-6,17366501(*)	0,563507	0,001	-8,4341768	-3,9131532
		BE_2	-6,31470480(*)	0,563507	0,001	-8,5752166	-4,054193
		BAD	-6,43945469(*)	0,563507	0	-8,6999665	-4,1789429
		BAM	-6,25215046(*)	0,563507	0,001	-8,5126623	-3,9916386
	BE_1	PA	6,17366501(*)	0,563507	0,001	3,9131532	8,4341768
		BE_2	-0,14103979	0,563507	0,999	-2,4015516	2,119472
		BAD	-0,26578969	0,563507	0,987	-2,5263015	1,9947222
		BAM	-0,07848545	0,563507	1	-2,3389973	2,1820264
	BE_2	PA	6,31470480(*)	0,563507	0,001	4,054193	8,5752166
		BE_1	0,14103979	0,563507	0,999	-2,119472	2,4015516
		BAD	-0,12474989	0,563507	0,999	-2,3852617	2,1357619
		BAM	0,06255434	0,563507	1	-2,1979575	2,3230662
	BAD	PA	6,43945469(*)	0,563507	0	4,1789429	8,6999665
		BE_1	0,26578969	0,563507	0,987	-1,9947222	2,5263015
		BE_2	0,12474989	0,563507	0,999	-2,1357619	2,3852617
		BAM	0,18730423	0,563507	0,996	-2,0732076	2,4478161
	BAM	PA	6,25215046(*)	0,563507	0,001	3,9916386	8,5126623
		BE_1	0,07848545	0,563507	1	-2,1820264	2,3389973
		BE_2	-0,06255434	0,563507	1	-2,3230662	2,1979575
		BAD	-0,18730423	0,563507	0,996	-2,4478161	2,0732076
7 dias	PA	BE_1	-0,72877673	0,40652	0,465	-2,3595336	0,9019801
		BE_2	-0,18726764	0,40652	0,988	-1,8180245	1,4434892
		BAD	-0,88437007	0,40652	0,318	-2,5151269	0,7463868
		BAM	0,27071549	0,40652	0,956	-1,3600414	1,9014723
	BE_1	PA	0,72877673	0,40652	0,465	-0,9019801	2,3595336
		BE_2	0,5415091	0,40652	0,687	-1,0892478	2,172266
		BAD	-0,15559333	0,40652	0,994	-1,7863502	1,4751635
		BAM	0,99949222	0,40652	0,238	-0,6312646	2,6302491
	BE_2	PA	0,18726764	0,40652	0,988	-1,4434892	1,8180245
		BE_1	-0,5415091	0,40652	0,687	-2,172266	1,0892478
		BAD	-0,69710243	0,40652	0,499	-2,3278593	0,9336544
		BAM	0,45798313	0,40652	0,789	-1,1727737	2,08874
	BAD	PA	0,88437007	0,40652	0,318	-0,7463868	2,5151269
		BE_1	0,15559333	0,40652	0,994	-1,4751635	1,7863502
		BE_2	0,69710243	0,40652	0,499	-0,9336544	2,3278593
		BAM	1,15508556	0,40652	0,16	-0,4756713	2,7858424
	BAM	PA	-0,27071549	0,40652	0,956	-1,9014723	1,3600414
		BE_1	-0,99949222	0,40652	0,238	-2,6302491	0,6312646
		BE_2	-0,45798313	0,40652	0,789	-2,08874	1,1727737
		BAD	-1,15508556	0,40652	0,16	-2,7858424	0,4756713

Nota: Erro Pd. = erro padrão; (*) Diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05.

Tabela 26 - Comparação das médias de UFC entre os tratamentos nos instantes 14 dias e 28 dias.

Tempo	Tratamento (I)	Tratamento (J)	Diferença média (I-J)	Erro Pd.	p-valor	Intervalo de confiança 95% L. Inferior	L. Superior
7 dias	PA	BE_1	-0,23572133	0,744938	0,997	-3,2240416	2,752599
		BE_2	0,55174634	0,744938	0,937	-2,436574	3,5400667
		BAD	0,87725534	0,744938	0,764	-2,111065	3,8655757
		BAM	-0,09428173	0,744938	1	-3,082602	2,8940386
	BE_1	PA	0,23572133	0,744938	0,997	-2,752599	3,2240416
		BE_2	0,78746767	0,744938	0,821	-2,2008526	3,775788
		BAD	1,11297667	0,744938	0,606	-1,8753436	4,101297
		BAM	0,1414396	0,744938	1	-2,8468807	3,1297599
	BE_2	PA	-0,55174634	0,744938	0,937	-3,5400667	2,436574
		BE_1	-0,78746767	0,744938	0,821	-3,775788	2,2008526
		BAD	0,325509	0,744938	0,99	-2,6628113	3,3138293
		BAM	-0,64602807	0,744938	0,898	-3,6343484	2,3422922
	BAD	PA	-0,87725534	0,744938	0,764	-3,8655757	2,111065
		BE_1	-1,11297667	0,744938	0,606	-4,101297	1,8753436
		BE_2	-0,325509	0,744938	0,99	-3,3138293	2,6628113
		BAM	-0,97153707	0,744938	0,701	-3,9598574	2,0167832
	BAM	PA	0,09428173	0,744938	1	-2,8940386	3,082602
		BE_1	-0,1414396	0,744938	1	-3,1297599	2,8468807
		BE_2	0,64602807	0,744938	0,898	-2,3422922	3,6343484
		BAD	0,97153707	0,744938	0,701	-2,0167832	3,9598574
28 dias	PA	BE_1	0,49865901	0,745708	0,955	-2,4927538	3,4900718
		BE_2	1,14478704	0,745708	0,585	-1,8466258	4,1361999
		BAD	1,36423635	0,745708	0,449	-1,6271765	4,3556492
		BAM	1,46079865	0,745708	0,396	-1,5306142	4,4522115
	BE_1	PA	-0,49865901	0,745708	0,955	-3,4900718	2,4927538
		BE_2	0,64612804	0,745708	0,898	-2,3452848	3,6375409
		BAD	0,86557734	0,745708	0,772	-2,1258355	3,8569902
		BAM	0,96213964	0,745708	0,708	-2,0292732	3,9535525
	BE_2	PA	-1,14478704	0,745708	0,585	-4,1361999	1,8466258
		BE_1	-0,64612804	0,745708	0,898	-3,6375409	2,3452848
		BAD	0,21944931	0,745708	0,998	-2,7719635	3,2108621
		BAM	0,31601161	0,745708	0,991	-2,6754012	3,3074244
	BAD	PA	-1,36423635	0,745708	0,449	-4,3556492	1,6271765
		BE_1	-0,86557734	0,745708	0,772	-3,8569902	2,1258355
		BE_2	-0,21944931	0,745708	0,998	-3,2108621	2,7719635
		BAM	0,0965623	0,745708	1	-2,8948505	3,0879751
	BAM	PA	-1,46079865	0,745708	0,396	-4,4522115	1,5306142
		BE_1	-0,96213964	0,745708	0,708	-3,9535525	2,0292732
		BE_2	-0,31601161	0,745708	0,991	-3,3074244	2,6754012
		BAD	-0,0965623	0,745708	1	-3,0879751	2,8948505

Nota: Erro Pd. = erro padrão; (*) Diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05.

Tabela 27 - Comparação das médias de UFC entre os tratamentos nos instantes 42 dias e 63 dias.

Tempo	Tratamento (I)	Tratamento (J)	Diferença média (I-J)	Erro Pd.	p-valor	Intervalo de confiança 95% L. Inferior	L. Superior
42 dias	PA	BE_1	0,68879575	0,268589	0,213	-0,3886521	1,7662436
		BE_2	2,11372171(*)	0,268589	0,003	1,0362738	3,1911696
		BAD	1,66230511(*)	0,268589	0,008	0,5848572	2,739753
		BAM	2,06836079(*)	0,268589	0,003	0,9909129	3,1458087
	BE_1	PA	-0,68879575	0,268589	0,213	-1,7662436	0,3886521
		BE_2	1,42492596(*)	0,268589	0,016	0,3474781	2,5023738
		BAD	0,97350937	0,268589	0,072	-0,1039385	2,0509573
		BAM	1,37956504(*)	0,268589	0,019	0,3021172	2,4570129
	BE_2	PA	-2,11372171(*)	0,268589	0,003	-3,1911696	-1,0362738
		BE_1	-1,42492596(*)	0,268589	0,016	-2,5023738	-0,3474781
		BAD	-0,45141659	0,268589	0,515	-1,5288645	0,6260313
		BAM	-0,04536092	0,268589	1	-1,1228088	1,032087
	BAD	PA	-1,66230511(*)	0,268589	0,008	-2,739753	-0,5848572
		BE_1	-0,97350937	0,268589	0,072	-2,0509573	0,1039385
		BE_2	0,45141659	0,268589	0,515	-0,6260313	1,5288645
		BAM	0,40605568	0,268589	0,597	-0,6713922	1,4835036
	BAM	PA	-2,06836079(*)	0,268589	0,003	-3,1458087	-0,9909129
		BE_1	-1,37956504(*)	0,268589	0,019	-2,4570129	-0,3021172
		BE_2	0,04536092	0,268589	1	-1,032087	1,1228088
		BAD	-0,40605568	0,268589	0,597	-1,4835036	0,6713922
63 dias	PA	BE_1	-0,27242758	0,511253	0,98	-2,3233205	1,7784654
		BE_2	1,607579	0,511253	0,117	-0,443314	3,658472
		BAD	0,83839851	0,511253	0,534	-1,2124944	2,8892915
		BAM	0,97737067	0,511253	0,414	-1,0735223	3,0282636
	BE_1	PA	0,27242758	0,511253	0,98	-1,7784654	2,3233205
		BE_2	1,88000658	0,511253	0,069	-0,1708864	3,9308995
		BAD	1,1108261	0,511253	0,319	-0,9400669	3,1617191
		BAM	1,24979826	0,511253	0,241	-0,8010947	3,3006912
	BE_2	PA	-1,607579	0,511253	0,117	-3,658472	0,443314
		BE_1	-1,88000658	0,511253	0,069	-3,9308995	0,1708864
		BAD	-0,76918048	0,511253	0,6	-2,8200734	1,2817125
		BAM	-0,63020832	0,511253	0,737	-2,6811013	1,4206846
	BAD	PA	-0,83839851	0,511253	0,534	-2,8892915	1,2124944
		BE_1	-1,1108261	0,511253	0,319	-3,1617191	0,9400669
		BE_2	0,76918048	0,511253	0,6	-1,2817125	2,8200734
		BAM	0,13897216	0,511253	0,998	-1,9119208	2,1898651
	BAM	PA	-0,97737067	0,511253	0,414	-3,0282636	1,0735223
		BE_1	-1,24979826	0,511253	0,241	-3,3006912	0,8010947
		BE_2	0,63020832	0,511253	0,737	-1,4206846	2,6811013
		BAD	-0,13897216	0,511253	0,998	-2,1898651	1,9119208

Nota: Erro Pd. = erro padrão; (*) Diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05.

APÊNDICE D - Teste *Tukey*: comparação das UFC entre os diferentes tempos por tratamento.

Tabela 28 - Comparação das médias de UFC entre os diferentes instantes de tempo no tratamento PA

Tratamento	Tempo (I)	Tempo (J)	Diferença média (I-J)	Erro Pd.	p-valor	Intervalo de confiança 95% L. Inferior	L. Superior
PA	0	7	-7,46060385(*)	,46399560	,000	-9,2998098	-5,6213979
		14	-8,61407180(*)	,46399560	,000	-10,4532778	-6,7748658
		28	-8,73283267(*)	,46399560	,000	-10,5720386	-6,8936267
		42	-9,16540973(*)	,46399560	,000	-11,0046157	-7,3262038
		63	-8,47273429(*)	,46399560	,000	-10,3119403	-6,6335283
	7	0	7,46060385(*)	,46399560	,000	5,6213979	9,2998098
		14	-1,15346795	,46399560	,289	-2,9926739	,6857380
		28	-1,27222882	,46399560	,215	-3,1114348	,5669771
		42	-1,70480588	,46399560	,070	-3,5440118	,1344001
		63	-1,01213044	,46399560	,403	-2,8513364	,8270755
	14	0	8,61407180(*)	,46399560	,000	6,7748658	10,4532778
		7	1,15346795	,46399560	,289	-,6857380	2,9926739
		28	-,11876087	,46399560	1,000	-1,9579668	1,7204451
		42	-,55133793	,46399560	,879	-2,3905439	1,2878680
		63	,14133751	,46399560	1,000	-1,6978684	1,9805435
	28	0	8,73283267(*)	,46399560	,000	6,8936267	10,5720386
		7	1,27222882	,46399560	,215	-,5669771	3,1114348
		14	,11876087	,46399560	1,000	-1,7204451	1,9579668
		42	-,43257706	,46399560	,955	-2,2717830	1,4066289
		63	,26009838	,46399560	,996	-1,5791076	2,0993043
	42	0	9,16540973(*)	,46399560	,000	7,3262038	11,0046157
		7	1,70480588	,46399560	,070	-,1344001	3,5440118
		14	,55133793	,46399560	,879	-1,2878680	2,3905439
		28	,43257706	,46399560	,955	-1,4066289	2,2717830
		63	,69267544	,46399560	,743	-1,1465305	2,5318814
	63	0	8,47273429(*)	,46399560	,000	6,6335283	10,3119403
		7	1,01213044	,46399560	,403	-,8270755	2,8513364
		14	-,14133751	,46399560	1,000	-1,9805435	1,6978684
		28	-,26009838	,46399560	,996	-2,0993043	1,5791076
		63	-,69267544	,46399560	,743	-2,5318814	1,1465305

Nota: Erro Pd. = erro padrão; (*) Diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05.

Tabela 29 - Comparação das médias de UFC entre os diferentes instantes de tempo no tratamento BE_1

Tratamento	Tempo (I)	Tempo (J)	Diferença média (I-J)	Erro Pd.	p-valor	Intervalo de confiança 95% L. Inferior	L. Superior
BE_1	0	7	-2,01571558(*)	,42628925	,021	-3,7054595	-,3259717
		14	-2,67612812(*)	,42628925	,004	-4,3658720	-,9863842
		28	-2,06050866(*)	,42628925	,019	-3,7502526	-,3707647
		42	-2,30294898(*)	,42628925	,010	-3,9926929	-,6132051
		63	-2,57149687(*)	,42628925	,006	-4,2612408	-,8817530
	7	0	2,01571558(*)	,42628925	,021	,3259717	3,7054595
		14	-,66041254	,42628925	,714	-2,3501565	1,0293314
		28	-,04479308	,42628925	1,000	-1,7345370	1,6449508
		42	-,28723340	,42628925	,990	-1,9769773	1,4025105
		63	-,55578129	,42628925	,832	-2,2455252	1,1339626
	14	0	2,67612812(*)	,42628925	,004	,9863842	4,3658720
		7	,66041254	,42628925	,714	-1,0293314	2,3501565
		28	,61561947	,42628925	,767	-1,0741244	2,3053634
		42	,37317915	,42628925	,966	-1,3165648	2,0629231
		63	,10463126	,42628925	1,000	-1,5851127	1,7943752
	28	0	2,06050866(*)	,42628925	,019	,3707647	3,7502526
		7	,04479308	,42628925	1,000	-1,6449508	1,7345370
		14	-,61561947	,42628925	,767	-2,3053634	1,0741244
		42	-,24244032	,42628925	,996	-1,9321842	1,4473036
		63	-,51098821	,42628925	,875	-2,2007321	1,1787557
	42	0	2,30294898(*)	,42628925	,010	,6132051	3,9926929
		7	,28723340	,42628925	,990	-1,4025105	1,9769773
		14	-,37317915	,42628925	,966	-2,0629231	1,3165648
		28	,24244032	,42628925	,996	-1,4473036	1,9321842
		63	-,26854789	,42628925	,993	-1,9582918	1,4211960
	63	0	2,57149687(*)	,42628925	,006	,8817530	4,2612408
		7	,55578129	,42628925	,832	-1,1339626	2,2455252
		14	-,10463126	,42628925	1,000	-1,7943752	1,5851127
		28	,51098821	,42628925	,875	-1,1787557	2,2007321
		63	,26854789	,42628925	,993	-1,4211960	1,9582918

Nota: Erro Pd. = erro padrão; (*) Diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05.

Tabela 30 - Comparação das médias de UFC entre os diferentes instantes de tempo no tratamento BE_2

Tratamento	Tempo (I)	Tempo (J)	Diferença média (I-J)	Erro Pd.	p-valor	Intervalo de confiança 95% L. Inferior	L. Superior
BE_2	0	7	-1,33316669	,66724712	,486	-3,9780299	1,3116965
		14	-1,74762066	,66724712	,248	-4,3924838	,8972425
		28	-1,27334083	,66724712	,530	-3,9182040	1,3715224
		42	-,73698323	,66724712	,908	-3,3818464	1,9078800
		63	-,55045050	,66724712	,974	-3,1953137	2,0944127
	7	0	1,33316669	,66724712	,486	-1,3116965	3,9780299
		14	-,41445397	,66724712	,994	-3,0593172	2,2304092
		28	,05982586	,66724712	1,000	-2,5850373	2,7046890
		42	,59618346	,66724712	,962	-2,0486797	3,2410467
		63	,78271619	,66724712	,885	-1,8621470	3,4275794
	14	0	1,74762066	,66724712	,248	-,8972425	4,3924838
		7	,41445397	,66724712	,994	-2,2304092	3,0593172
		28	,47427983	,66724712	,987	-2,1705834	3,1191430
		42	1,01063743	,66724712	,732	-1,6342258	3,6555006
		63	1,19717016	,66724712	,587	-1,4476930	3,8420334
	28	0	1,27334083	,66724712	,530	-1,3715224	3,9182040
		7	-,05982586	,66724712	1,000	-2,7046890	2,5850373
		14	-,47427983	,66724712	,987	-3,1191430	2,1705834
		42	,53635760	,66724712	,977	-2,1085056	3,1812208
		63	,72289033	,66724712	,915	-1,9219729	3,3677535
	42	0	,73698323	,66724712	,908	-1,9078800	3,3818464
		7	-,59618346	,66724712	,962	-3,2410467	2,0486797
		14	-1,01063743	,66724712	,732	-3,6555006	1,6342258
		28	-,53635760	,66724712	,977	-3,1812208	2,1085056
		63	,18653273	,66724712	1,000	-2,4583305	2,8313959
	63	0	,55045050	,66724712	,974	-2,0944127	3,1953137
		7	-,78271619	,66724712	,885	-3,4275794	1,8621470
		14	-1,19717016	,66724712	,587	-3,8420334	1,4476930
		28	-,72289033	,66724712	,915	-3,3677535	1,9219729
		63	-,18653273	,66724712	1,000	-2,8313959	2,4583305

Nota: Erro Pd. = erro padrão; (*) Diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05.

Tabela 31 - Comparação das médias de UFC entre os diferentes instantes de tempo no tratamento BAD

Tratamento	Tempo (I)	Tempo (J)	Diferença média (I-J)	Erro Pd.	p-valor	Intervalo de confiança 95% L. Inferior	L. Superior
BAD	0	7	-1,90551923	,49353880	,056	-3,8618298	,0507914
		14	-1,29736177	,49353880	,245	-3,2536724	,6589488
		28	-,92914163	,49353880	,542	-2,8854522	1,0271690
		42	-1,06364993	,49353880	,415	-3,0199605	,8926607
		63	-1,19488109	,49353880	,311	-3,1511917	,7614295
	7	0	-,22736969	,49353880	,999	-2,1836803	1,7289409
		14	1,90551923	,49353880	,056	-,0507914	3,8618298
		28	,60815746	,49353880	,862	-1,3481531	2,5644681
		42	,97637760	,49353880	,495	-,9799330	2,9326882
		63	,84186930	,49353880	,633	-1,1144413	2,7981799
	14	0	,71063814	,49353880	,769	-1,2456725	2,6669487
		7	1,29736177	,49353880	,245	-,6589488	3,2536724
		28	-,60815746	,49353880	,862	-2,5644681	1,3481531
		42	,36822014	,49353880	,984	-1,5880905	2,3245307
		63	,23371184	,49353880	,998	-1,7225988	2,1900224
	28	0	,10248068	,49353880	1,000	-1,8538299	2,0587913
		7	,92914163	,49353880	,542	-1,0271690	2,8854522
		14	-,97637760	,49353880	,495	-2,9326882	,9799330
		42	-,36822014	,49353880	,984	-2,3245307	1,5880905
		63	-,13450830	,49353880	1,000	-2,0908189	1,8218023
	42	0	-,26573946	,49353880	,997	-2,2220501	1,6905711
		7	1,06364993	,49353880	,415	-,8926607	3,0199605
		14	-,84186930	,49353880	,633	-2,7981799	1,1144413
		28	-,23371184	,49353880	,998	-2,1900224	1,7225988
		63	,13450830	,49353880	1,000	-1,8218023	2,0908189
	63	0	-,13123116	,49353880	1,000	-2,0875418	1,8250794
		7	1,19488109	,49353880	,311	-,7614295	3,1511917
		14	-,71063814	,49353880	,769	-2,6669487	1,2456725
		28	-,10248068	,49353880	1,000	-2,0587913	1,8538299
		63	,26573946	,49353880	,997	-1,6905711	2,2220501

Nota: Erro Pd. = erro padrão; (*) Diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05.

Tabela 32 - Comparação das médias de UFC entre os diferentes instantes de tempo no tratamento BAM

Tratamento	Tempo (I)	Tempo (J)	Diferença média (I-J)	Erro Pd.	p-valor	Intervalo de confiança 95% L. Inferior	L. Superior
BAM	0	7	-2,15922	1,55453	,793	-8,3211	4,0027
		14	-5,65562	1,55453	,073	-11,8175	,5063
		28	-2,34837	1,55453	,734	-8,5103	3,8135
		42	-1,94545	1,55453	,854	-8,1074	4,2165
		63	-2,86260	1,55453	,563	-9,0245	3,2993
	7	0	2,15922	1,55453	,793	-4,0027	8,3211
		14	-3,49640	1,55453	,375	-9,6583	2,6655
		28	-,18915	1,55453	1,000	-6,3511	5,9728
		42	,21377	1,55453	1,000	-5,9481	6,3757
		63	-,70338	1,55453	,999	-6,8653	5,4585
	14	0	5,65562	1,55453	,073	-,5063	11,8175
		7	3,49640	1,55453	,375	-2,6655	9,6583
		28	3,30725	1,55453	,427	-2,8547	9,4692
		42	3,71017	1,55453	,323	-2,4517	9,8721
		63	2,79301	1,55453	,586	-3,3689	8,9549
	28	0	2,34837	1,55453	,734	-3,8135	8,5103
		7	,18915	1,55453	1,000	-5,9728	6,3511
		14	-3,30725	1,55453	,427	-9,4692	2,8547
		42	,40292	1,55453	1,000	-5,7590	6,5648
		63	-,51424	1,55453	1,000	-6,6761	5,6477
	42	0	1,94545	1,55453	,854	-4,2165	8,1074
		7	-,21377	1,55453	1,000	-6,3757	5,9481
		14	-3,71017	1,55453	,323	-9,8721	2,4517
		28	-,40292	1,55453	1,000	-6,5648	5,7590
		63	-,91715	1,55453	,995	-7,0791	5,2448
	63	0	2,86260	1,55453	,563	-3,2993	9,0245
		7	,70338	1,55453	,999	-5,4585	6,8653
		14	-2,79301	1,55453	,586	-8,9549	3,3689
		28	,51424	1,55453	1,000	-5,6477	6,6761
		63	,91715	1,55453	,995	-5,2448	7,0791

Nota: Erro Pd. = erro padrão; (*) Diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05.

APÊNDICE E - Teste *Tukey*: comparação dos teores de n-alcanos entre os diferentes tratamentos através do tempo

Tabela 33 – Comparação dos teores de n-alcanos entre os diferentes tratamentos nos instantes zero (0) e 7 dias.

Tempo	Tratamento (I)	Tratamento (J)	Diferença média (I-J)	Erro Pd.	p-valor	Intervalo de confiança 95%	
						L. Inferior	L. Superior
0 dias	PA	BE_1	221,21	72,29	0,1273	-68,788	511,208
		BE_2	408,28(*)	72,29	0,0126	118,282	698,278
		BAD	120,00	72,29	0,5249	-170,003	409,993
		BAM	197,81	72,29	0,1780	-92,188	487,808
	BE_1	PA	-221,21	72,29	0,1273	-511,208	68,788
		BE_2	187,07	72,29	0,2078	-102,928	477,068
		BAD	-101,22	72,29	0,6529	-391,213	188,783
		BAM	-23,40	72,29	0,9968	-313,398	266,598
	BE_2	PA	-408,28(*)	72,29	0,0126	-698,278	-118,282
		BE_1	-187,07	72,29	0,2078	-477,068	102,928
		BAD	-288,29	72,29	0,0511	-578,283	1,713
		BAM	-210,47	72,29	0,1484	-500,468	79,528
	BAD	PA	-120,00	72,29	0,5249	-409,993	170,003
		BE_1	101,22	72,29	0,6529	-188,783	391,213
		BE_2	288,29	72,29	0,0511	-1,713	578,283
		BAM	77,82	72,29	0,8121	-212,183	367,813
	BAM	PA	-197,81	72,29	0,1780	-487,808	92,188
		BE_1	23,40	72,29	0,9968	-266,598	313,398
		BE_2	210,47	72,29	0,1484	-79,528	500,468
		BAD	-77,82	72,29	0,8121	-367,813	212,183
7 dias	PA	BE_1	360,59	1575,35	0,9992	-5958,925	6680,105
		BE_2	-1638,08	1575,35	0,8285	-7957,590	4681,440
		BAD	-3326,34	1575,35	0,3398	-9645,855	2993,175
		BAM	-2297,18	1575,35	0,6235	-8616,695	4022,335
	BE_1	PA	-360,59	1575,35	0,9992	-6680,105	5958,925
		BE_2	-1998,67	1575,35	0,7193	-8318,180	4320,850
		BAD	-3686,93	1575,35	0,2688	-10006,445	2632,585
		BAM	-2657,77	1575,35	0,5122	-8977,285	3661,745
	BE_2	PA	1638,08	1575,35	0,8285	-4681,440	7957,590
		BE_1	1998,67	1575,35	0,7193	-4320,850	8318,180
		BAD	-1688,27	1575,35	0,8143	-8007,780	4631,250
		BAM	-659,11	1575,35	0,9916	-6978,620	5660,410
	BAD	PA	3326,34	1575,35	0,3398	-2993,175	9645,855
		BE_1	3686,93	1575,35	0,2688	-2632,585	10006,445
		BE_2	1688,27	1575,35	0,8143	-4631,250	8007,780
		BAM	1029,16	1575,35	0,9586	-5290,355	7348,675
	BAM	PA	2297,18	1575,35	0,6235	-4022,335	8616,695
		BE_1	2657,77	1575,35	0,5122	-3661,745	8977,285
		BE_2	659,11	1575,35	0,9916	-5660,410	6978,620
		BAD	-1029,16	1575,35	0,9586	-7348,675	5290,355

Nota: Erro Pd. = erro padrão; (*) Diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05.

Tabela 34 - Comparação dos teores n-alcanos entre os diferentes tratamentos nos instantes 14 dias e 28 dias.

Tempo	Tratamento (I)	Tratamento (J)	Diferença média (I-J)	Erro Pd.	p-valor	Intervalo de confiança 95% L. Inferior	L. Superior
14 dias	PA	BE_1	2175,87	1033,25	0,3418	-1969,006	6320,746
		BE_2	5125,30(*)	1033,25	0,0217	980,424	9270,176
		BAD	6102,31(*)	1033,25	0,0104	1957,434	10247,186
		BAM	6380,06(*)	1033,25	0,0085	2235,179	10524,931
	BE_1	PA	-2175,87	1033,25	0,3418	-6320,746	1969,006
		BE_2	2949,43	1033,25	0,1574	-1195,446	7094,306
		BAD	3926,44	1033,25	0,0611	-218,436	8071,316
		BAM	4204,19(*)	1033,25	0,0474	59,309	8349,061
	BE_2	PA	-5125,30(*)	1033,25	0,0217	-9270,176	-980,424
		BE_1	-2949,43	1033,25	0,1574	-7094,306	1195,446
		BAD	977,01	1033,25	0,8682	-3167,866	5121,886
		BAM	1254,76	1033,25	0,7463	-2890,121	5399,631
	BAD	PA	-6102,31(*)	1033,25	0,0104	-10247,186	-1957,434
		BE_1	-3926,44	1033,25	0,0611	-8071,316	218,436
		BE_2	-977,01	1033,25	0,8682	-5121,886	3167,866
		BAM	277,75	1033,25	0,9984	-3867,131	4422,621
	BAM	PA	-6380,06(*)	1033,25	0,0085	-10524,931	-2235,179
		BE_1	-4204,19(*)	1033,25	0,0474	-8349,061	-59,309
		BE_2	-1254,76	1033,25	0,7463	-5399,631	2890,121
		BAD	-277,75	1033,25	0,9984	-4422,621	3867,131
28 dias	PA	BE_1	-47,66	233,81	0,9995	-985,608	890,288
		BE_2	2689,21(*)	233,81	0,0005	1751,262	3627,158
		BAD	2891,49(*)	233,81	0,0003	1953,537	3829,433
		BAM	3064,23(*)	233,81	0,0003	2126,282	4002,178
	BE_1	PA	47,66	233,81	0,9995	-890,288	985,608
		BE_2	2736,87(*)	233,81	0,0004	1798,922	3674,818
		BAD	2939,15(*)	233,81	0,0003	2001,197	3877,093
		BAM	3111,89(*)	233,81	0,0002	2173,942	4049,838
	BE_2	PA	-2689,21(*)	233,81	0,0005	-3627,158	-1751,262
		BE_1	-2736,87(*)	233,81	0,0004	-3674,818	-1798,922
		BAD	202,28	233,81	0,8984	-735,673	1140,223
		BAM	375,02	233,81	0,5515	-562,928	1312,968
	BAD	PA	-2891,49(*)	233,81	0,0003	-3829,433	-1953,537
		BE_1	-2939,15(*)	233,81	0,0003	-3877,093	-2001,197
		BE_2	-202,28	233,81	0,8984	-1140,223	735,673
		BAM	172,75	233,81	0,9379	-765,203	1110,693
	BAM	PA	-3064,23(*)	233,81	0,0003	-4002,178	-2126,282
		BE_1	-3111,89(*)	233,81	0,0002	-4049,838	-2173,942
		BE_2	-375,02	233,81	0,5515	-1312,968	562,928
		BAD	-172,75	233,81	0,9379	-1110,693	765,203

Nota: Erro Pd = erro padrão; (*) Diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05.

Tabela 35 - Comparação dos teores n-alcanos entre os diferentes tratamentos nos instantes 42 dias e 63 dias.

Tempo	Tratamento (I)	Tratamento (J)	Diferença média (I-J)	Erro Pd.	p-valor	Intervalo de confiança 95% L. Inferior	L. Superior
42 dias	PA	BE_1	-54,17	207,22	0,9986	-885,437	777,087
		BE_2	2735,12(*)	207,22	0,0002	1903,858	3566,382
		BAD	2969,79(*)	207,22	0,0002	2138,523	3801,047
		BAM	3080,94(*)	207,22	0,0001	2249,673	3912,197
	BE_1	PA	54,17	207,22	0,9986	-777,087	885,437
		BE_2	2789,30(*)	207,22	0,0002	1958,033	3620,557
		BAD	3023,96(*)	207,22	0,0002	2192,698	3855,222
		BAM	3135,11(*)	207,22	0,0001	2303,848	3966,372
	BE_2	PA	-2735,12(*)	207,22	0,0002	-3566,382	-1903,858
		BE_1	-2789,30(*)	207,22	0,0002	-3620,557	-1958,033
		BAD	234,67	207,22	0,7860	-596,597	1065,927
		BAM	345,82	207,22	0,5207	-485,447	1177,077
	BAD	PA	-2969,79(*)	207,22	0,0002	-3801,047	-2138,523
		BE_1	-3023,96(*)	207,22	0,0002	-3855,222	-2192,698
		BE_2	-234,67	207,22	0,7860	-1065,927	596,597
		BAM	111,15	207,22	0,9791	-720,112	942,412
	BAM	PA	-3080,94(*)	207,22	0,0001	-3912,197	-2249,673
		BE_1	-3135,11(*)	207,22	0,0001	-3966,372	-2303,848
		BE_2	-345,82	207,22	0,5207	-1177,077	485,447
		BAD	-111,15	207,22	0,9791	-942,412	720,112
63 dias	PA	BE_1	-168,51	285,87	0,9709	-1315,286	978,266
		BE_2	2519,62(*)	285,87	0,0017	1372,844	3666,396
		BAD	2642,20(*)	285,87	0,0014	1495,424	3788,976
		BAM	2723,79(*)	285,87	0,0012	1577,014	3870,566
	BE_1	PA	168,51	285,87	0,9709	-978,266	1315,286
		BE_2	2688,13(*)	285,87	0,0012	1541,354	3834,906
		BAD	2810,71(*)	285,87	0,0010	1663,934	3957,486
		BAM	2892,30(*)	285,87	0,0009	1745,524	4039,076
	BE_2	PA	-2519,62(*)	285,87	0,0017	-3666,396	-1372,844
		BE_1	-2688,13(*)	285,87	0,0012	-3834,906	-1541,354
		BAD	122,58	285,87	0,9908	-1024,196	1269,356
		BAM	204,17	285,87	0,9444	-942,606	1350,946
	BAD	PA	-2642,20(*)	285,87	0,0014	-3788,976	-1495,424
		BE_1	-2810,71(*)	285,87	0,0010	-3957,486	-1663,934
		BE_2	-122,58	285,87	0,9908	-1269,356	1024,196
		BAM	81,59	285,87	0,9980	-1065,186	1228,366
	BAM	PA	-2723,79(*)	285,87	0,0012	-3870,566	-1577,014
		BE_1	-2892,30(*)	285,87	0,0009	-4039,076	-1745,524
		BE_2	-204,17	285,87	0,9444	-1350,946	942,606
		BAD	-81,59	285,87	0,9980	-1228,366	1065,186

Nota: Erro Pd = erro padrão; (*) Diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05.

APÊNDICE F - Teste-*t*: comparação do COT entre os instantes zero e 63º dia para os tratamentos adotados.

Tratamento			Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
			F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference Lower	Upper
PA	COT	Equal variances assumed	4,621	,057	-1,831	10	,097	-2,427167	1,325367	-5,380267	,525934
		Equal variances not assumed			-1,831	8,396	,103	-2,427167	1,325367	-5,458573	,604240
BE1	COT	Equal variances assumed	1,236	,292	-8,030	10	,000	-5,391667	,671399	-6,887637	-3,895697
		Equal variances not assumed			-8,030	7,273	,000	-5,391667	,671399	-6,967253	-3,816080
BE2	COT	Equal variances assumed	,140	,716	2,931	10	,015	2,062833	,703881	,494488	3,631179
		Equal variances not assumed			2,931	9,726	,015	2,062833	,703881	,488469	3,637198
BAD	COT	Equal variances assumed	1,139	,311	5,589	10	,000	4,220167	,755145	2,537599	5,902735
		Equal variances not assumed			5,589	7,268	,001	4,220167	,755145	2,447812	5,992521
BAM	COT	Equal variances assumed	,390	,546	3,139	10	,011	3,390000	1,080115	,983354	5,796646
		Equal variances not assumed			3,139	9,770	,011	3,390000	1,080115	,975649	5,804351

Figura 36 – Comparação dos teores médios de COT entre os instantes zero e 63º dia nos diferentes tratamentos adotados (microcosmos de bancada).

APÊNDICE G – *Bootstrap*: intervalos de confiança para as médias acumuladas de CO_2 em função do tempo

Tabela 36 – Intervalos de confiança de 95% obtidos para as médias acumuladas de CO_2 através do método *Bootstrap*.

Dia	CB		PA		ATN		BKNA		BKA		BRES	
	LI	LS	LI	LS	LI	LS	LI	LS	LI	LS	LI	LS
1	8,29	8,73	2,40	3,49	3,93	5,24	5,67	6,55	2,40	4,15	13,53	14,19
2	13,57	14,13	3,83	4,92	16,97	18,28	28,71	31,07	10,24	12,55	39,34	40,35
3	16,08	17,44	5,04	6,13	26,53	29,87	51,71	55,55	35,73	38,53	57,84	62,03
4	17,27	20,08	6,29	7,67	36,73	40,06	71,84	75,86	57,17	60,68	75,77	80,08
5	18,69	22,04	6,75	8,45	43,73	47,11	86,60	91,37	71,61	75,29	88,43	93,02
6	19,39	22,71	7,08	8,94	48,57	52,23	96,74	101,46	83,58	87,39	98,75	103,68
7	20,71	24,16	8,14	10,22	52,96	58,48	107,07	111,82	94,34	98,34	107,47	113,05
8	21,54	25,22	8,75	11,16	59,71	65,31	117,98	122,77	105,64	110,38	118,34	124,58
9	22,49	26,21	8,43	11,79	65,78	72,00	127,90	132,90	116,89	121,68	128,16	135,38
10	23,74	27,64	9,90	13,23	73,87	80,08	138,33	143,56	127,76	133,48	140,05	147,49
11	24,70	28,60	10,55	13,89	79,98	86,26	146,81	152,04	136,34	142,04	149,60	157,51
12	26,25	30,15	11,38	14,67	88,29	94,59	156,60	161,84	148,81	154,41	161,32	169,77
13	29,08	33,05	13,81	17,64	95,83	102,14	165,31	170,62	159,02	164,34	171,91	180,26
14	30,44	34,41	14,75	18,60	102,79	109,10	172,99	178,48	167,01	172,71	181,32	190,10
15	31,18	35,14	14,98	18,93	107,81	114,05	179,23	184,76	173,77	179,56	188,50	197,96
16	32,30	36,22	16,18	20,12	112,61	118,97	184,50	190,23	179,94	185,65	194,54	204,81
17	33,41	38,04	17,69	21,66	117,32	124,19	190,32	196,36	186,92	192,73	202,38	212,63
18	35,56	40,19	20,00	23,94	124,58	131,49	197,92	204,03	193,91	201,09	212,60	222,90
19	36,61	41,26	21,55	25,97	129,52	136,62	203,79	209,77	200,22	207,23	219,71	231,01
20	38,09	42,73	22,75	27,19	135,03	142,05	209,47	215,88	207,46	215,17	228,10	239,48
21	38,97	43,69	23,35	28,12	140,31	147,30	216,40	222,93	213,39	221,97	235,51	246,72
22	39,91	44,55	24,95	29,78	144,38	151,88	221,87	228,29	219,24	227,90	242,73	254,34
23	41,06	45,74	26,63	31,49	147,84	155,81	226,71	233,34	224,45	233,52	249,76	261,18
24	42,16	46,89	27,73	32,70	151,00	159,06	231,29	237,93	229,39	238,45	255,95	267,63
25	42,77	47,47	28,21	33,65	154,26	162,57	235,25	242,23	233,74	242,74	262,04	273,98
26	44,49	49,20	29,77	35,30	158,88	167,31	238,91	246,22	238,90	248,14	271,17	283,26
27	45,02	49,71	29,81	35,76	163,92	172,23	241,39	248,63	242,26	251,90	278,33	290,51
28	45,48	50,22	30,37	36,31	167,74	176,14	244,16	251,58	245,98	255,67	285,12	297,58
29	46,90	51,63	30,67	36,62	171,31	179,81	247,08	254,53	249,26	259,05	291,51	303,85

Nota = LI = limite inferior; LS = limite superior. Existência de significância estatística entre os tratamentos com intervalos de confiança distintos.

ANEXO A – Cromatogramas dos n-alcanos: início e final do experimento em microcosmos de bancada.

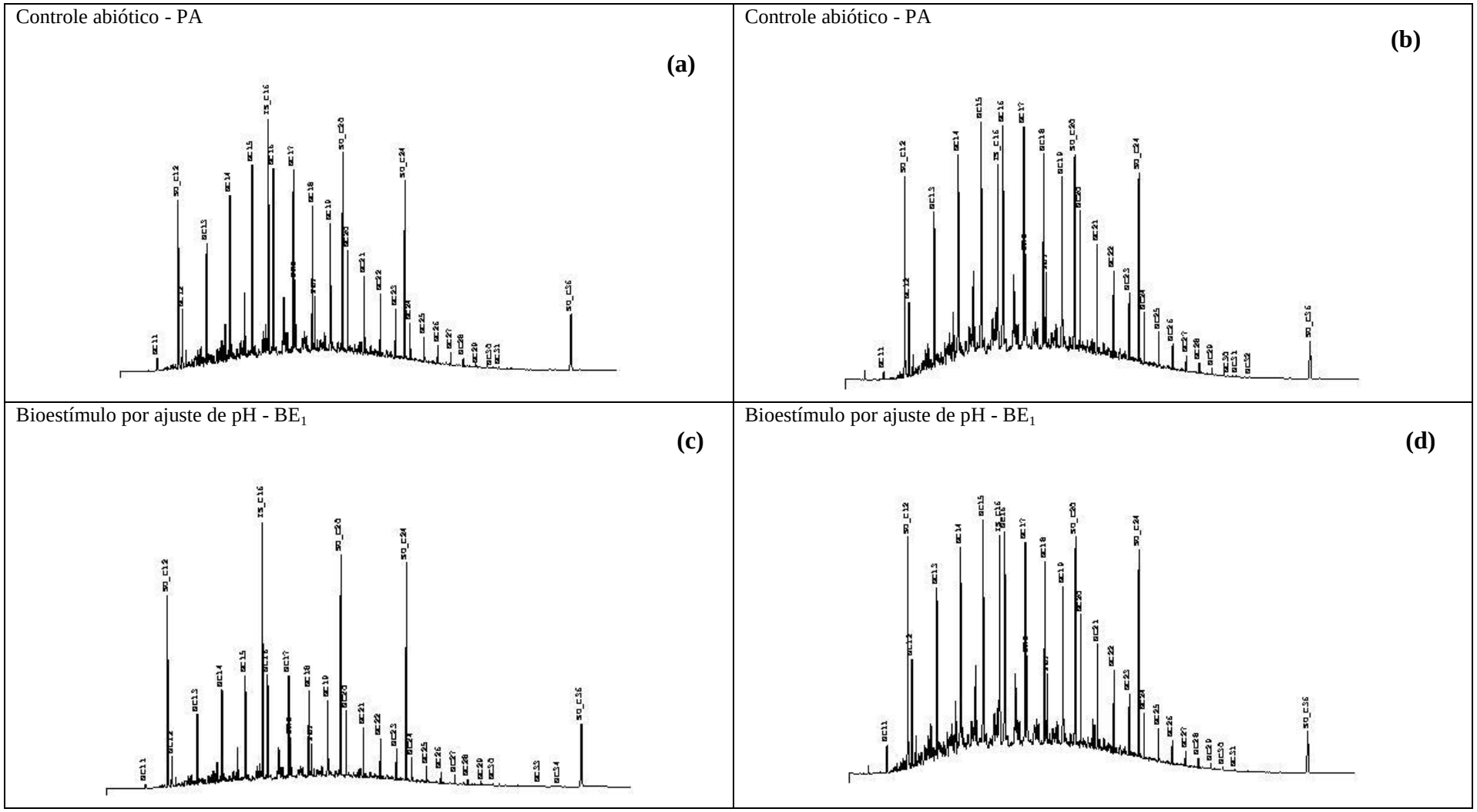


Figura 37 – Cromatogramas dos n-alcanos referentes aos tratamentos PA e BE_1. (a) controle de processos abióticos no instante inicial e (b) aos 63 dias; (c) bioestímulo por ajuste de pH no instante inicial e (d) aos 63 dias.

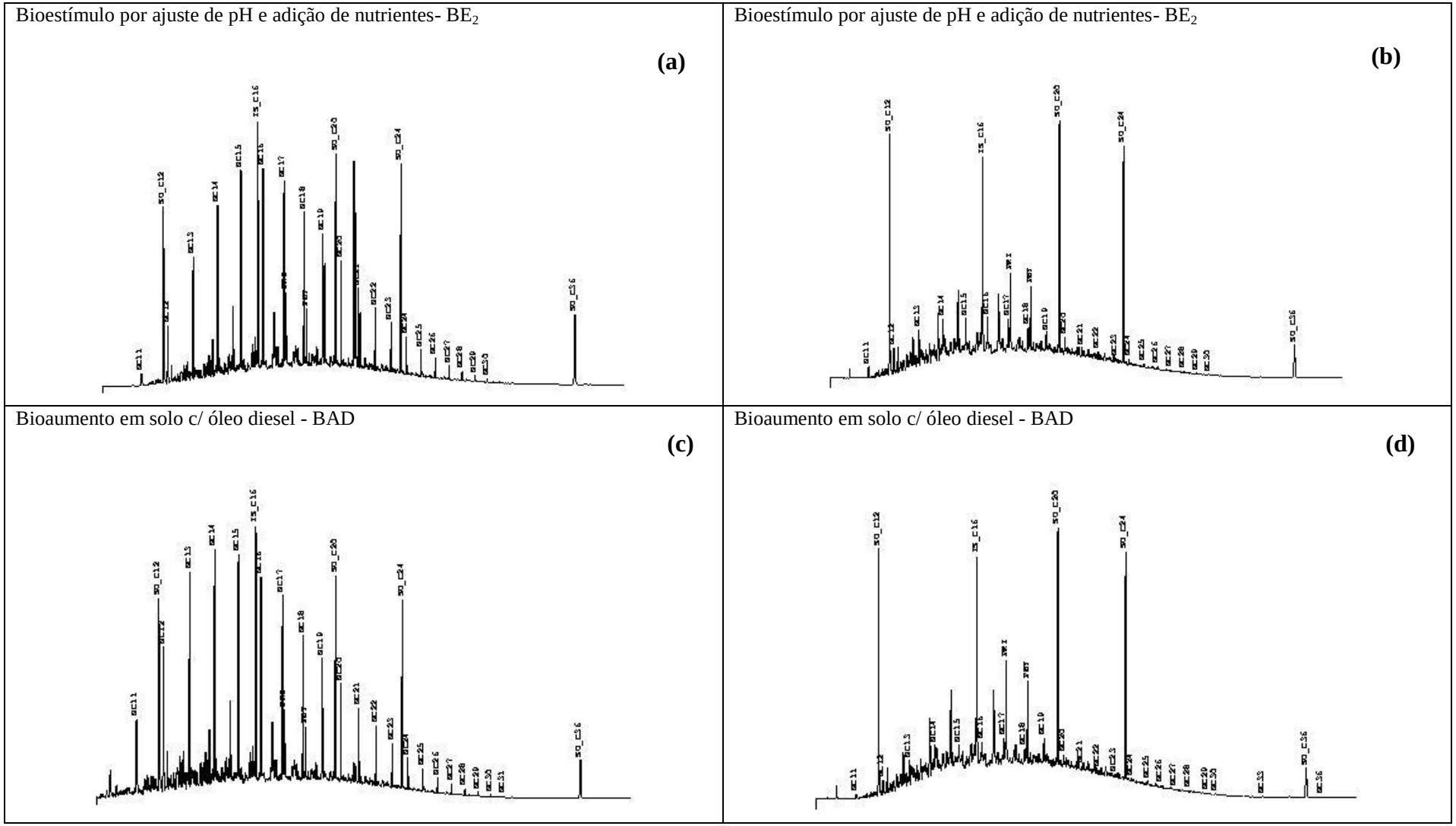


Figura 38 – Cromatogramas dos n-alcanos referentes aos tratamentos BE_2 e BAD. (a) bioestímulo por ajuste de pH e adição de nutrientes no instante inicial e (b) aos 63 dias; (c) bioaumento em solo com diesel no instante inicial e (d) aos 63 dias.

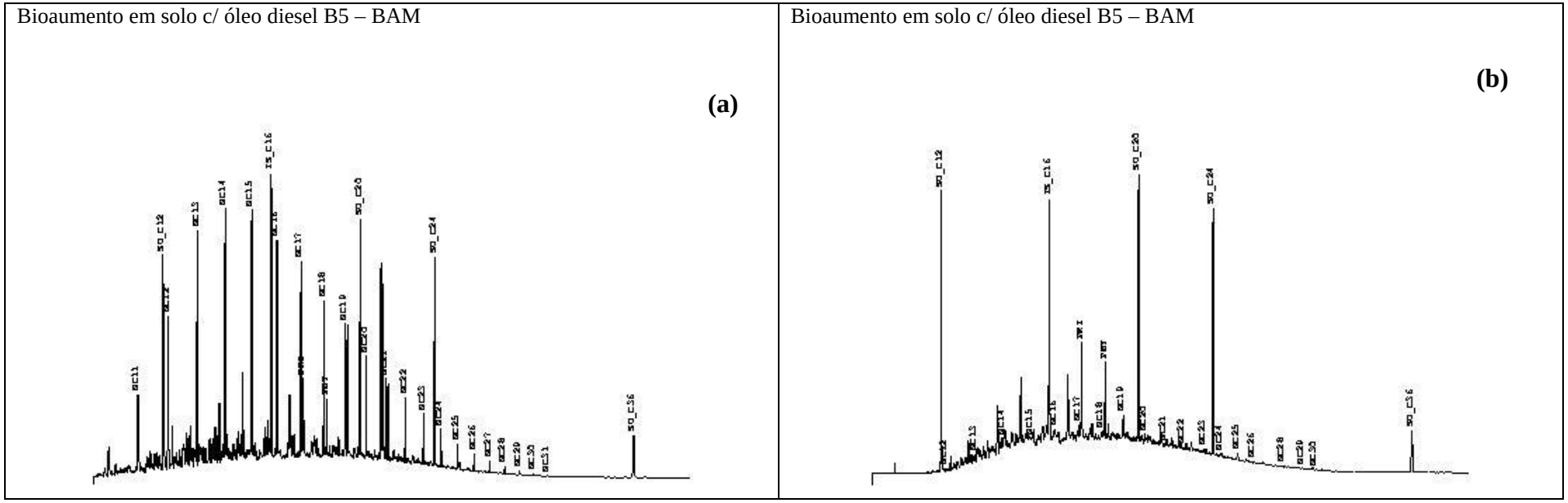


Figura 39 – Cromatogramas dos n-alcanos referentes ao tratamento BAM. (a) bioaumento em solo c/ óleo diesel B5 no instante inicial e (b) aos 63 dias.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo