

ADRIANO GUIMARÃES PARREIRA

**CONSÓRCIO BACTERIANO PARA BIORREMEDIAÇÃO DE
SOLO CONTAMINADO COM GASOLINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

ADRIANO GUIMARÃES PARREIRA

**CONSÓRCIO BACTERIANO PARA BIORREMEDIAÇÃO DE
SOLO CONTAMINADO COM GASOLINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2005.

Prof. Arnaldo Chaer Borges

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Conselheiro)

Prof. Juraci Alves de Oliveira

Prof. Maurício Dutra Costa

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

Aos meus pais, Maria Aparecida e Adalberto (*in memoriam*).

A minha companheira e amiga, Viviane.

Aos meus irmãos e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor e orientador Marcos Rogério Tótola, pela orientação, pela dedicação, pela paciência e pelo incentivo à pesquisa.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, pelo apoio e pela acolhida no Departamento de Microbiologia Agrícola.

Aos professores Hilário Cuquetto Mantovani e Ann Honor Munteer, pelos aconselhamentos.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos que me foram passados.

A todos os funcionários do BIOAGRO, pela amizade e ajuda indispensáveis ao bom funcionamento do laboratório.

Às secretárias do Departamento de Microbiologia Nilcéa, Aparecida e Laura, pela simpatia e pelo pronto atendimento.

A todos os colegas do laboratório, pela amizade, ajuda e compreensão.

À Sara e ao Fernando, pela ajuda na parte experimental e pelos momentos de descontração.

Aos professores Galvão e Maurício, pela amizade, atenção e receptividade.

A minha mãe Maria Aparecida, pela preocupação e pelo apoio constante.

Aos meus irmãos e minha sobrinha, pela descontração e pelo aconselhamento.

A Viviane, pela amizade, pelo apoio, pelo carinho, pela atenção, pela paciência e compreensão em todos os momentos.

Aos meus colegas de República, pela acolhida e pelo apoio e incentivo durante a minha estada em Viçosa.

A todos os meus colegas do Curso, pela amizade e descontração.

Às amizades construídas em Viçosa, que farei durar para sempre.

BIOGRAFIA

ADRIANO GUIMARÃES PARREIRA, filho de Adalberto Parreira Almeida e Maria Aparecida Guimarães Almeida, nasceu em Divinópolis, Estado de Minas Gerais.

No dia 17 de setembro de 2002, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

No mesmo mês, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, na área de Microbiana Ambiental, com o projeto de pesquisa intitulado “Biorremediação de solos contaminados com gasolina em biorreator”, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2005.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Seleção de isolados bacterianos com capacidade de utilização de gasolina como fonte de carbono.....	16
3.2. Seleção de isolados bacterianos com capacidade de utilização de benzeno, tolueno e xilenos como fontes de carbono.....	19
3.3. Produção de biossurfactantes.....	19
3.4. Composição do consórcio microbiano empregado no ensaio de biorremediação de solo contaminado com gasolina	20
3.5. Efeito de um composto liberador de oxigênio (CLO) sobre o crescimento microbiano.....	21
3.6. Identificação dos isolados microbianos.....	21
3.7. Biorremediação de solo contaminado com gasolina comercial em biorreator	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Seleção de isolados bacterianos com capacidade de utilização de gasolina como fonte de carbono.....	26
4.2. Seleção de isolados bacterianos com capacidade de utilização de benzeno, tolueno e xilenos como fontes de carbono.....	31

	Página
4.3. Produção de biossurfactantes	33
4.4. Composição do consórcio microbiano empregado no ensaio de biorremediação de solo contaminado com gasolina	36
4.5. Efeito de um composto liberador de oxigênio (CLO) sobre o crescimento microbiano	38
4.6. Biorremediação de solo contaminado com gasolina comercial em biorreator.....	38
5. CONCLUSÕES	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

RESUMO

PARREIRA, Adriano Guimarães. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005. **Consórcio bacteriano para biorremediação de solo contaminado com gasolina**. Orientador: Marcos Rogério Tótola. Conselheiros: Hilário Cuquetto Mantovani e Ann Honnor Mounteer.

Cinquenta e dois isolados microbianos pertencentes ao Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia para o Meio Ambiente (LBBMA) do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, foram avaliados quanto à capacidade de crescimento em gasolina pura, gasolina adicionada de 25% de etanol, benzeno, tolueno e xilenos. A capacidade de produzirem biossurfactante em substrato contendo gasolina comercial como fonte de carbono foi também avaliada. Os 16 isolados que apresentaram crescimento considerado satisfatório em meio suplementado com gasolina pura foram avaliados quanto à capacidade de utilização de benzeno, tolueno ou xileno (BTX) como fontes exclusivas de carbono. Os quatro melhores foram selecionados para comporem um consórcio microbiano a ser estudado em biorreatores construídos para esse fim, sendo identificados pela análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) como sendo: *Stenotrophomonas maltophilia* (isolado BBMA 105A), *Sphingomonas capsulata* (isolado LBBMA 178b) e *Pseudomonas balearica* (isolado LBBMA 193). O isolado BBMA B1 encontra-se em vias de identificação. Além desses, o isolado LBBMA 53A, identificado como *Pseudomonas aeruginosa* e o isolado LBBMA

178, também pertencente ao gênero *Pseudomonas*, foram selecionados por serem os mais eficazes quanto à produção de biossurfactantes. A identificação de *S. capsulata* como degradadora de tolueno e de *P. balearica* como degradadora de xileno, representa o acréscimo de mais uma característica metabólica relevante na descrição dessas espécies. O estudo da otimização do processo de biorremediação de amostra de solo contaminado com gasolina em biorreatores, considerando as variáveis fornecimento de oxigênio, fornecimento de nutrientes minerais e inoculação do consórcio bacteriano, permitiu a seleção das condições propícias à degradação de BTX pelo consórcio microbiano selecionado. O consórcio microbiano demonstrou ser eficiente na biorremediação de solo contaminado com gasolina comercial. A utilização de um composto liberador de oxigênio não foi eficiente em estimular a biodegradação de hidrocarbonetos. A injeção de ar foi comprovadamente a melhor forma de suprimento de oxigênio ao processo de biorremediação conduzido em biorreatores. A inoculação do *slurry* com o consórcio selecionado neste trabalho promoveu um aumento significativo da degradação dos componentes da gasolina, em especial BTX, demonstrando ser uma estratégia promissora para a biorremediação de solos contaminados com gasolina.

ABSTRACT

PARREIRA, Adriano Guimarães. Universidade Federal de Viçosa, february de 2005. **Bacterial consortium for bioremediation of soil contaminated with gasoline**. Adviser: Marcos Rogério Tótola. Committee members: Hilário Cuquetto Mantovani and Ann Honnor Mounteer.

Fifty two microbial isolates belonging to the Laboratory of Biodiversity and Biotechnology for the Environment (LBBMA), of the Department of Microbiology of the University of Viçosa, Viçosa, MG, were evaluated for their capacity to grow in gasohol (ethanol 25%), benzene, toluene and xylenes. The producing biosurfactants in mineral medium with gasohol sole carbon source was also evaluated. Among the 52 isolates, 16 were able to grow satisfactory in gasohol mineral medium. These isolates were evaluated further for their capacity to use benzene, toluene or xylenes (BTX) as sources of carbon. Four isolates were selected to be part of a bacterial consortium for bioremediation of gasohol contaminated soil in bioreactors. These isolates were identified by fatty acid methyl ester (FAME) analysis as: *Stenotrophomonas maltophilia* (LBBMA 105A), *Sphingomonas capsulata* (LBBMA 178b) *Pseudomonas balearica* (LBBMA 193). The isolate LBBMA B1 is under identification. Isolates LBBMA 53A, identified as *Pseudomonas aeruginosa* and LBBMA 178, a *Pseudomonas* sp., were also selected as efficient biosurfactant producing members of the microbial consortium. The identification of *S. capsulata* as able to use toluene

and of *P. balearica* as able to use xylene, represents the inclusion of another relevant metabolic characteristic for the description of these species. The optimization of the bioremediation of soil samples contaminated with gasohol in bioreactors, allowed the selection of the most appropriate conditions for the degradation of BTX by the selected bacterial consortium. Microbial consortium was found to be efficient in bioremediation of soil contaminated with brazilian gasohol. The use of an oxygen-releasing compound was not efficient in stimulating biodegradation of hydrocarbons. Air injection was proved to be the best way of supplying oxygen to the bioremediation process carried out in the bioreactor. Inoculation of contaminated soil slurry with the consortium in this work significantly increased the degradation of the gasoline components, especially BTX. Our data demonstrated that the use of the selected consortium in adequately-operated bioreactors is a promising strategy for bioremediation of soils contaminated with gasohol.

1. INTRODUÇÃO

A indústria petrolífera está constantemente sujeita a acidentes envolvendo vazamentos e derrames durante as várias etapas do processo de produção e distribuição de derivados do petróleo. Entre os acidentes, destacam-se aqueles verificados rotineiramente durante o armazenamento de petróleo e de seus derivados. Desses derivados, a gasolina merece atenção especial, dada a magnitude do volume comercializado, principalmente em áreas densamente povoadas. Em um derramamento ou vazamento deste combustível, uma das principais preocupações é a contaminação de aquíferos usados como fonte de abastecimento de água para consumo humano. É notável o aumento do uso das águas subterrâneas nos últimos anos, especialmente nas grandes cidades, onde a poluição e destruição de rios e mananciais, associadas ao aumento do consumo, têm promovido a escassez e a inviabilidade da utilização das águas superficiais.

Dada a sua solubilidade em água, a gasolina, quando derramada, permanecerá inicialmente no subsolo como líquido de fase não-aquosa (LFNA). O LFNA se comporta como uma fonte de contaminação permanente e, ao atingir a água subterrânea, dissolve-se parcialmente. Os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno e os três xilenos (*orto*, *meta* e *para*) - os denominados BTX, são os constituintes da gasolina que têm maior solubilidade em água e, portanto, são os primeiros contaminantes que atingem o lençol freático. Estes contaminantes são considerados substâncias perigosas por

serem depressores do sistema nervoso central e por causarem câncer em casos de exposição crônica. A solubilidade desses hidrocarbonetos aumenta na presença de solventes orgânicos oxigenados, como álcoois e éteres. Essa condição é característica da gasolina brasileira, em cuja composição encontra-se o etanol, que, além de elevar a solubilidade dos hidrocarbonetos, pode induzir ou influenciar o processo de biodegradação. O álcool pode ser ainda tóxico ou inibitório ao crescimento de microrganismos potencialmente degradadores dos hidrocarbonetos.

No Brasil, a Resolução 273 de novembro de 2000 do *Conama* (Conselho Nacional de Meio Ambiente), prevê a obrigatoriedade de licenciamento ambiental a todos os estabelecimentos distribuidores de combustíveis derivados do petróleo. Determina, ainda, a adoção, por parte dos gestores do estabelecimento, de medidas corretivas visando à minimização de quaisquer impactos ambientais que porventura venham a ocorrer em virtude das atividades ali desenvolvidas.

A biorremediação é uma alternativa economicamente competitiva, ambientalmente correta e tecnicamente viável para o tratamento de solos e de aquíferos contaminados com gasolina ou com vários outros tipos de contaminantes. Esse processo tem como suporte a atividade biológica, em especial de bactérias, a qual pode ser estimulada pela aplicação de nutrientes inorgânicos e oxigênio, acelerando, assim, o processo de descontaminação. Dependendo da natureza e volume do material contaminado e das características do local onde o mesmo se encontra, a biorremediação pode ser realizada *in situ* ou *ex situ*.

Sistemas de tratamento *in situ* visam à eliminação dos contaminantes no próprio local da contaminação. No entanto, a introdução de aditivos necessários à criação das condições ideais ao biotratamento ainda permanece um desafio. Por outro lado, sistemas de tratamento *ex situ*, especialmente os que utilizam biorreatores, permitem o estabelecimento de ambientes controlados e adequados à atividade microbiana de degradação de poluentes. A utilização de tais recursos pressupõe a escavação e retirada dos solos contaminados para posterior tratamento.

A substituição dos sistemas convencionais de tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, principalmente o *landfarming* e

as biopilhas, por sistemas que utilizam biorreatores, é uma tendência mundial. No Brasil, existem poucas pesquisas envolvendo o emprego de biorreatores no tratamento de solos impactados com tais contaminantes, especialmente de gasolina adicionada de etanol. A partir da observação desta realidade, este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a biorremediação de solo contaminado com gasolina comercial em biorreator. No experimento, avaliou-se o efeito da adição de um composto liberador de oxigênio e da inoculação de um consórcio de bactérias selecionadas sobre a eficiência de degradação dos hidrocarbonetos BTX presentes na gasolina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas décadas, o aumento populacional e o conseqüente aumento das atividades industriais e comerciais têm contribuído de forma significativa para o agravamento dos problemas ambientais, principalmente no que se refere à qualidade das águas superficiais e subterrâneas. No Brasil, segundo o relatório apresentado em 2001 pela Agência Nacional das Águas (ANA), cerca de 70% dos rios que fazem parte das bacias hidrográficas que vão do Sergipe ao Rio Grande do Sul apresentam altos índices de contaminação, principalmente por efluentes urbanos, substâncias lixiviadas de grandes lixões e por agrotóxicos (TIBURTIUS *et al.*, 2004). Com a crescente deterioração das águas superficiais, as águas subterrâneas passaram a exercer importante papel como fonte de abastecimento, constituindo uma grande reserva estratégica de água doce do planeta, em virtude de sua abundância, qualidade, baixo custo de exploração e facilidade de captação, fato este verificado principalmente nos grandes centros urbanos (KAIPPER, 2003).

Segundo o relatório da *World Watch Institute* (AGUAONLINE, 2000), mais de 1,5 bilhão de pessoas dependem atualmente da água subterrânea nos cinco continentes, sendo que 90% da população rural dependem desses mananciais. Na Europa, o sistema de abastecimento de água depende em 75% da água subterrânea. Em países como Dinamarca, Suécia, Bélgica, Alemanha e Áustria, a captação de água subterrânea representa 90%. A água subterrânea abastece 100% dos núcleos da Argélia, 58% do Irã e 50% nos

Estados Unidos (FUNASA, 2002). No Brasil, 62% dos municípios utilizam os mananciais subterrâneos para abastecimento urbano, estando as regiões Norte, Centro-oeste e Sul com percentuais acima de 70% no uso desses mananciais (BIO, 2002). O Estado de São Paulo é o maior usuário nacional, onde 90% das indústrias dependem exclusivamente dessa fonte de abastecimento. Relatório apresentado pela Cetesb (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo), no ano de 2001, demonstrou que 72% dos municípios daquele Estado são, total ou parcialmente, abastecidos por recurso hídrico proveniente de águas subterrâneas, especialmente pelo aquífero Guarani e pela formação Botucatu. Cerca de 47% deles são inteiramente abastecidos pelas águas provenientes de aquíferos (CETESB, 2003). Nos últimos anos, entretanto, a utilização dos mananciais subterrâneos vem sendo largamente questionada em virtude de sua contaminação por produtos extremamente perigosos, representando um sério problema de saúde pública (COSTURA e ALVAREZ, 2000).

A perda da qualidade das águas subterrâneas é atribuída principalmente à contaminação por pesticidas, fertilizantes, intrusão salina, fraturas em oleodutos, poços abandonados ou mal selados, resíduos industriais, contaminação através de fossas sépticas, aterros sanitários e depósitos subterrâneos de produtos químicos, especialmente derivados de petróleo (EPA, 2003). Dos diferentes contaminantes orgânicos encontrados em águas subterrâneas, os mais comuns são solventes industriais e hidrocarbonetos aromáticos do petróleo (MACKAY e CHERRY, 1989).

Acidentes envolvendo vazamento de combustíveis derivados do petróleo armazenados em tanques subterrâneos são uma das causas mais comuns de contaminação do subsolo e do lençol freático (KAO *et al.*, 2001). A contaminação de aquíferos por vazamentos de derivados de petróleo, especialmente gasolina, dos tanques de armazenamento subterrâneos, é uma preocupação geral que tem sido muito discutida, inclusive no Brasil (CORSEUIL e MARINS, 1997). Constituída de uma mistura de hidrocarbonetos voláteis, a gasolina apresenta compostos com cadeias ramificadas de parafinas e cicloparafinas, além de compostos monoaromáticos onde se incluem o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, BTEX (POULSEN *et al.*, 1992) O maior problema da contaminação com gasolina está relacionado com os

hidrocarbonetos aromáticos, dentre os quais, destacam-se o benzeno, o tolueno e os xilenos, os chamados BTX. Os compostos aromáticos benzeno, tolueno e xilenos (BTX), juntamente com outros alquilbenzenos, perfazem cerca de 10 a 59% da gasolina (massa/massa), enquanto os hidrocarbonetos alifáticos compreendem de 41 a 62% (TIBURTIUS *et al.*, 2004). Os aromáticos apresentam maior mobilidade em água, já que possuem solubilidade aquosa da ordem de 3 a 5 vezes maior (WATTS *et al.*; 2000; Tab. 1). A solubilidade desses hidrocarbonetos puros em água é elevada, comparativamente a outros hidrocarbonetos (Tabela 1).

Tabela 1 – Solubilidade de alguns hidrocarbonetos em água

Composto	Solubilidade em água (mg L⁻¹)
Benzeno	1.760
Tolueno	532
Xilenos	163-185
Nonano	0,122
Decano	0,021
Dodecano	0,005

Fonte: WATTS *et al.* (2000).

Há relatos de que diferentes formulações da gasolina podem afetar o transporte e o destino dos BTXs no ambiente. O uso do etanol como ingrediente na formulação daquele combustível tem aumentado mundialmente, com o intuito de minimizar a poluição atmosférica e diminuir a dependência do petróleo (FERNANDES, 2002). No Brasil, por exemplo, a gasolina é aditivada com aproximadamente 25% de etanol, fato que aumenta consideravelmente a probabilidade de contaminação de águas subterrâneas por BTX (CORSEUIL *et al.*, 1998). O etanol aumenta a solubilidade dos BTXs em água e, conseqüentemente, a migração desses compostos para o lençol freático. Além disso, o seu uso como substrato preferencial por bactérias do solo pode comprometer a degradação aeróbia de BTEX nesses ambientes, que se caracterizam pela baixa disponibilidade de oxigênio (NARDI *et al.*, 2004).

A contaminação de águas subterrâneas por hidrocarbonetos aromáticos representa um sério problema de saúde pública. Os BTX são extremamente

tóxicos à saúde humana, podendo inviabilizar a exploração de aquíferos por eles contaminados (SILVA *et al.*, 2002). Estes compostos são altamente nocivos ao homem, sendo considerados teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos (ZAPPI *et al.*, 1996). Os hidrocarbonetos aromáticos são naturalmente bem mais tóxicos que os compostos alifáticos com o mesmo número de átomos de carbono (WATTS *et al.*, 2000). A contaminação humana pode ocorrer por inalação ou contato com a pele durante o banho e não somente por ingestão direta da água (CETESB, 2003).

Além dos postos de serviço, existem os acidentes envolvendo dutos que atravessam várias cidades, propriedades rurais e indústrias, estradas, bacias hidrográficas e extensas áreas de recarga de aquíferos, como o da Formação de Botucatu, um dos principais aquíferos do Brasil.

DAMAS *et al.* (2002), investigando os efeitos tóxicos das marés negras sobre a fauna marinha, fizeram menção aos efeitos danosos do benzeno, tolueno e xilenos ao organismo humano e a outros seres vivos. Estes poluentes influenciam sistemas endócrinos e enzimáticos, além de que hidrocarbonetos ingeridos por organismos marinhos passam através da parede intestinal e se tornam parte da reserva lipídica. Quando dissolvidos no tecido adiposo, os hidrocarbonetos são preservados, porque estão protegidos do ataque microbiano, podendo ser transferidos da presa para o predador e, eventualmente, ao homem. A exposição prolongada a concentrações subletais de poluentes pode tornar o organismo mais susceptível às doenças. Aparecimento de tumores, alterações genéticas e leucemias são algumas das conseqüências clínicas da intoxicação por hidrocarbonetos. Quando hidrocarbonetos aromáticos são incorporados pela flora e fauna, ligam-se às moléculas protéicas e ao tecido gorduroso, sendo transferidos através da cadeia alimentar sem alterações da estrutura. Muitos seres expõem-se à contaminação por hidrocarbonetos derivados do petróleo por ingestão de animais ou plantas que tenham acumulado hidrocarbonetos no seu organismo em quantidades insuficientes para causar lesões. Em decorrência deste fato, a legislação vem se tornando cada vez mais restritiva e a fiscalização, mais presente. No Brasil, a portaria 1.469/2000 do Ministério da Saúde determina que os limites máximos em água potável permitidos para o benzeno, tolueno e xilenos são de 5, 170 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para que a água seja

considerada potável. Recente portaria ministerial, de 28 de abril de 2004, proíbe, em todo o Território Nacional, a comercialização de produtos acabados tais como tintas e solventes que contenham benzeno em sua composição, admitida, porém, a presença desta substância, como agente contaminante, em percentual não superior a 1% (em volume) até 30 de junho de 2004; 0,8% a partir de 1 de julho de 2004; 0,4% a partir de 1 de dezembro de 2005; 0,1% a partir de 1 de dezembro de 2007.

O Conselho Nacional de Meio Ambiente (Conama) elaborou a Resolução 273, em novembro de 2000, que regulamenta uma série de dispositivos visando a garantia da segurança ao homem e ao meio ambiente, durante as operações executadas em postos distribuidores de derivados de petróleo. Dentre outras considerações que justificam sua aplicação, destacam-se a de que toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais; os vazamentos de derivados de petróleo e outros combustíveis podem causar contaminação de corpos d'água subterrâneos e superficiais, contaminação do solo e do ar e, além disso, os riscos de incêndios e explosões decorrentes desses vazamentos não podem ser desconsiderados. Além disso, a Resolução 273 menciona que a ocorrência de vazamentos vem aumentando significativamente nos últimos anos, em função da manutenção inadequada ou insuficiente e da obsolescência dos equipamentos. A referida resolução lista uma série de procedimentos que devem ser observados visando à obtenção da licença prévia, licença de instalação e, finalmente, licença de operação, instrumento legal, a partir de então obrigatório, dirigido a todos aqueles estabelecimentos que lidam com atividades relacionadas à distribuição de combustíveis derivados de petróleo. O credenciamento, o licenciamento e a fiscalização ficam a cargo do órgão ambiental competente na área de instalação do estabelecimento. A emissão de licenciamento ambiental, por parte da agência reguladora, dar-se-á somente quando da obtenção das Licenças Prévia e de Instalação além, e, sobretudo, da Licença de Operação. Fica determinado ainda que, quando da ocorrência de acidentes ou vazamentos com geração de passivos ambientais, os proprietários, arrendatários ou responsáveis pelo estabelecimento, pelos equipamentos,

pelos sistemas e os fornecedores de combustível que abastecem ou abasteceram a unidade, responderão solidariamente, pela adoção de medidas para controle da situação emergencial e para o saneamento das áreas impactadas, de acordo com as exigências formuladas pelo órgão ambiental licenciador, conforme art. 8º da referida resolução (CONAMA, 2002).

Ainda não existem estatísticas acerca da magnitude do problema da contaminação de BTX em águas subterrâneas no Brasil. Entretanto, em função de muitos tanques terem mais de 25 anos de uso, acredita-se que a possibilidade de ocorrência de vazamentos é extremamente grande, principalmente pelo surgimento de rachaduras ou por corrosão (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

A FEAM (Fundação Estadual do Meio Ambiente do Estado de Minas Gerais) estabeleceu um cronograma visando ao credenciamento e licenciamento de todos os postos distribuidores de combustíveis derivados de petróleo no Estado (cerca de 4.000), dentro de um prazo máximo de dois anos, a contar de 2002. Segundo relatório desse órgão ambiental (FEAM, 2003) apenas 20% dos postos distribuidores de combustíveis encontravam-se dentro dos padrões estabelecidos pela resolução Conama 273. Dados divulgados pela Cetesb em dezembro de 2004 listam 1.336 áreas contaminadas no estado de São Paulo, contra 727 no ano anterior e 255 em 2002. Os postos de combustíveis lideram a nova lista de áreas contaminadas, sendo responsáveis por 931 locais, ou 69% do total de ocorrências registradas. Este número é maior até do que o total de áreas contaminadas relatadas na lista anterior, sendo que somente estes estabelecimentos, naquela ocasião, somavam 464 (CETESB, 2004).

MANZOCHI (2001) acompanhou as atividades operacionais de abastecimento e descarga de combustíveis, troca de óleo e lavagem de veículos em um posto de abastecimento da cidade de Florianópolis (SC). Ele alerta que, carregado pela chuva, o material derramado pode contaminar o solo e a água, atingindo rios, lençóis freáticos e galerias pluviais. Considerando o vazamento de 10 mL por dia, durante um ano, estima-se que pode haver comprometimento de 3 milhões de litros de água. A extensão da contaminação depende do vazamento e das condições do local onde o posto está instalado, especialmente do tipo de solo. Salaria ainda que a contaminação do solo e da

água pode trazer graves conseqüências, inclusive grandes riscos à saúde pública, em especial em áreas urbanas. Exemplos citados são as cidades de Cascavel e Campo Largo (PR), que tiveram no ano de 2001 o abastecimento de água suspenso em decorrência de contaminação dos mananciais fornecedores por vazamentos em postos de combustíveis da região (MANZOCHI, 2001). Em Joinville, a Prefeitura local realizou estudos com 65 postos da cidade em 1997 e constatou que somente um não apresentou problemas de contaminação do lençol freático (FINOTTI & CORSEUIL, 1997).

Segundo levantamentos feitos por Petrick (MANZOCHI, 2001), em 1998, o número de postos que apresentavam problemas variava de 20 a 30% no Brasil.

No que se refere ao tratamento de solos e aquíferos contaminados com hidrocarbonetos, existe uma ampla variedade de processos empregados. Uma técnica bastante empregada na remediação de águas subterrâneas contaminadas com hidrocarbonetos é o tratamento denominado *pump and treat* (JIANG *et al.*, 1997). Nesta técnica, a água contaminada é retirada por meio de bombeamento, submetida a um processo de remoção de poluentes e devolvida, na maioria dos casos, ao reservatório natural. As técnicas utilizadas na depuração da água correspondem, na grande maioria dos casos, a processos de *air stripping* e extração por adsorção em carvão ativado. A metodologia de *air stripping* envolve a injeção de ar para dentro do aquífero contaminado, a transferência dos contaminantes voláteis para a fase gasosa e separação por sistema de extração de vapor. Embora eficientes, esses processos apresentam sérias limitações, principalmente relacionadas a seu caráter não-destrutivo. Enquanto a remoção de voláteis por *air stripping* implica na liberação de gases poluentes para a atmosfera, o processo de adsorção leva à geração de fases sólidas saturadas com contaminantes. Além disso, a necessidade da associação de diversas tecnologias de tratamento faz com que os processos tornem-se demorados e dispendiosos.

No caso de tratamento de solos de subsuperfície contaminados com hidrocarbonetos presentes na gasolina, uma técnica bastante empregada é a destruição térmica. Embora a incineração destrua a maioria dos contaminantes orgânicos, não é uma técnica barata e, além disso, difícil de ser implementada, dadas as exigências impostas pelas agências ambientais (ZAPPI *et al.*, 1996).

Dentre todos os processos de remediação conhecidos, a biorremediação é o mais utilizado na degradação de compostos xenobióticos, dentre os quais os hidrocarbonetos do petróleo (JUHASZ *et al.*, 2000). Bactérias, leveduras e fungos filamentosos têm sido citados na literatura como agentes transformadores eficazes, capazes de degradar uma ampla variedade de substâncias orgânicas comumente encontradas nos efluentes gerados pelas refinarias, pelas indústrias petroquímicas e nos combustíveis derivados de petróleo. Por utilizarem tais substâncias como fonte de carbono e energia, os microrganismos vêm se apresentando como uma alternativa aos métodos convencionais de tratamento, sendo cada vez mais empregados na resolução de problemas ambientais (URURAHY *et al.*, 1998). A biorremediação pode ser considerada uma tecnologia de tratamento de sítios contaminados por meio do uso de agentes biológicos, bactérias em especial, capazes de modificar ou decompor poluentes-alvo a baixo custo. O máximo benefício desse processo é a mineralização dos poluentes, que são transformados em CO₂, H₂O e biomassa (CUNHA *et al.*, 2000).

Segundo levantamento realizado pela USEPA, em seu estudo denominado *Innovative Technology Evaluation Report* (1995), mais de 95% dos processos de biorremediação são empregados para descontaminação de solos e águas subterrâneas (FERNANDES, 1997).

O processo de biorremediação pode ocorrer *in situ* ou *ex situ*. No caso das medidas *in situ*, o tratamento de água ou solo contaminado é feito no próprio local, sem a remoção do material contaminado. Já as medidas corretivas *ex situ* consistem em escavar o solo contaminado ou extrair a água subterrânea para o tratamento em outro local. A principal vantagem dos sistemas *ex situ* reside no fato de que o tempo requerido para o tratamento do contaminante é bem inferior àquele requerido nos sistemas *in situ*, por possibilitar o máximo controle das condições, otimizando assim o processo (SCHACHT *et al.*, 2002).

Na condução de bioprocessos, a utilização de biorreatores vem ao encontro da necessidade da manutenção das condições ótimas para a degradação de resíduos complexos em intervalos de tempo cada vez mais reduzidos. Pioneira na utilização de biorreatores no tratamento de borras de petróleo, a Refinaria Corpus Christi (*Valero Refining Company* - Texas) publicou

um estudo econômico comparando o biotratamento com a incineração, para uma capacidade de 2.000 t/ano de resíduos, em um sistema ainda não-otimizado, e concluiu que o primeiro envolve menor custo. Mais uma vez a alternativa biotecnológica demonstrou ser economicamente competitiva e tecnicamente viável, além de ambientalmente positiva (URURAHY *et al.*, 1998). Dentre os processos que utilizam biorreatores visando ao tratamento de solos impactados, a redução da concentração de contaminantes no solo é consideravelmente maior em reatores tipo *bioslurry*, comparativamente aos biorreatores tradicionais que utilizam fase sólida. O sistema de tratamento *bioslurry* consiste de uma mistura de solo em água mantida sob agitação constante em um reator. *Bioslurry* é atualmente um método de tratamento bastante aceito e bem estabelecido para o biotratamento de solos, sedimentos e lodo (COOKSON, 1995; ZAPPI *et al.*, 1996; FAVA *et al.*, 2000).

A literatura cita uma ampla variedade de microrganismos, principalmente bactérias, capazes de degradar compostos recalcitrantes como os hidrocarbonetos derivados de petróleo, incluindo os hidrocarbonetos aromáticos. A Tabela 2 lista diferentes espécies de bactérias capazes de oxidar diferentes hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) .

RAHMAN *et al.* (2004), avaliando a biorremediação de solos contaminados com gasolina, empregaram um consórcio microbiano constituído de cinco linhagens de bactérias (*Micrococcus* sp. GS2-22, *Bacillus* sp. DS6-86, *Corynebacterium* sp. GS5-66, *Flavobacterium* sp. DS5-73 e *Pseudomonas* sp.

Tabela 2 – Hidrocarbonetos poli-aromáticos (PAHs) degradados por espécies microbianas

PAHs e Microrganismos	Referência
<p>NAFTALENO <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>, <i>Alcaligenes denitrificans</i>, <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. putida</i>, <i>P. fluorescens</i>, <i>P. paucimobilis</i>, <i>Brevundimonas vesicularis</i>, <i>Burkholderia cepacia</i>, <i>Comamonas testosteroni</i>, <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Corynebacterium renale</i>, <i>Moraxella</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>B. cereus</i>, <i>P. marginalis</i>, <i>P. stutzeri</i>, <i>P. saccharophila</i>, <i>Neptunomonas naphthovorans</i>, <i>Cycloclasticus</i> sp.</p>	<p>Ryu et al. (1989), Weissenfels et al. (1990, 1991), Kelly et al. (1991), Dunn e Gunsalus (1973), Davies e Evans (1964), Foght and Westlake (1988), Je.rey et al. (1975), Mueller et al. (1990a), Kuhm et al. (1991), Walter et al. (1991), Dua e Meera (1981), Tagger et al. (1990), Garcia-Valdes et al. (1988), Trower et al. (1988), Grund et al. (1992), Barnsley (1975a); Barnsley (1983a), Yang et al. (1994), Burd and Ward (1996), Allen et al. (1997), Stringfellow e Aitken (1995), Filonov et al. (1999), Hedlund et al. (1999), Geiselbrecht et al. (1998), Foght e Westlake (1996), Goyal e Zylstra (1996).</p>
<p>ACENAFTENO <i>Beijerinckia</i> sp., <i>P. putida</i>, <i>P. fluorescens</i>, <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Cycloclasticus</i> sp., <i>Neptunomonas naphthovorans</i>, <i>Alcaligenes eutrophus</i>, <i>Alcaligenes paradoxus</i></p>	<p>Chapman (1979), Schocken e Gibson (1984), Ellis et al. (1991), Geiselbrecht et al. (1998), Hedlund et al. (1999), Selifonov et al. (1993).</p>
<p>FENANTRENO <i>Aeromonas</i> sp., <i>A. faecalis</i>, <i>A. denitrificans</i>, <i>Arthrobacter polychromogenes</i>, <i>Beijerinckia</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>P. putida</i>, <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Vibrio</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>S. griseus</i>, <i>Acinetobacter</i> sp., <i>P. aeruginosa</i>, <i>P. stutzeri</i>, <i>P. saccharophila</i>, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>, <i>Cycloclasticus</i> sp., <i>P. fluorescens</i>, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>, <i>Acidovorax delafieldii</i>, <i>Gordona</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Comamonas testosteroni</i>, <i>Cycloclasticus pugetii</i>, <i>Sp. yanoikuyae</i>, <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Burkholderia</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Rhodotorula glutinis</i>, <i>Nocardioides</i> sp., <i>Flavobacterium gondwanense</i>, <i>Halomonas meridiana</i></p>	<p>Kiyohara et al. (1976, 1982, 1990), Weissenfels et al. (1990, 1991), Keuth e Rehm (1991), Jerina et al. (1976), Colla et al. (1959), West et al. (1984), Kiyohara e Nagao (1978), Heitkamp e Cerniglia (1988), Guerin e Jones (1988a, 1989), Treccani et al. (1954), Evans et al. (1965), Foght and Westlake (1988), Mueller et al. (1990b), Sutherland et al. (1990), Ghosh e Mishra (1983), Savino e Lollini (1977), Trower et al. (1988), Barnsley (1983b), Yang et al. (1994), Kohler et al. (1994), Stringfellow e Aitken (1995), Boonchan (1998), Juhasz (1998), Geiselbrecht et al. (1998), Foght e Westlake (1996), Kastner et al. (1998), Lal e Khanna (1996), Shuttleworth e Cerniglia (1996), Mahro et al. (1995), Goyal e Zylstra (1996), Dyksterhouse et al. (1995), Allen et al. (1999), Aitken et al. (1998), Romero et al. (1998), Iwabuchi et al. (1998), Churchill et al. (1999), Juhasz (1991).</p>

Continua...

Tabela 2, Cont.

PAHs e Microrganismos	Referência
DIBENZ[A,H]ANTRACENO <i>Sp. paucimobilis, Stenotrophomonas maltophilia</i>	Ye et al. (1996), Boonchan (1998), Juhasz (1998).

Fonte: JUHASZ e NAIDU (2000).

DS10-129), tendo obtido resultados favoráveis quanto ao desempenho desse consórcio microbiano no processo de biorremediação.

A biodegradação de hidrocarbonetos complexos geralmente requer a cooperação de mais de uma espécie microbiana. Microrganismos individuais podem metabolizar somente uma quantidade limitada de compostos; logo, populações mistas (consórcios) são requeridas para ampliar a diversidade enzimática, obtendo um maior espectro e maiores taxas de biodegradação. Populações de microrganismos compostas de linhagens pertencentes a vários gêneros têm sido detectadas em solos ou água contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Isto sugere que cada linhagem ou gênero exerce seu papel nos processos de transformação dos hidrocarbonetos (GHAZALI *et al.*, 2004).

Um dos fatores que limitam a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo é a sua limitada disponibilidade aos microrganismos. Geralmente, os hidrocarbonetos de petróleo ligam-se aos componentes do solo e são difíceis de serem removidos ou degradados. Biossurfactantes podem emulsificar os hidrocarbonetos, melhorando sua solubilidade em água, diminuindo a tensão interfacial e aumentando o desprendimento de substâncias hidrofóbicas das partículas de solo, o que aumenta sua disponibilidade para a ação dos microrganismos (BANAT, 1995; BANAT *et al.*, 2000).

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas que contêm um grupo hidrofílico e um grupo hidrofóbico. Dada a presença destes dois grupos na mesma molécula, os biossurfactantes podem diminuir a tensão interfacial nos sistemas água/hidrocarboneto (CUNHA *et al.*, 2004). Por outro lado, biossurfactantes podem exercer atividade antibiótica, o que é demonstrado por vários deles, principalmente aqueles das classes lipopeptídeos e glicopeptídeos. Os ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* e a surfactina

de *Bacillus subtilis* funcionam como antibiótico, solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas.

Além da presença de microrganismos com rotas de degradação e da biodisponibilidade do contaminante, a disponibilidade de oxigênio é outro fator a controlar as taxas de degradação de hidrocarbonetos (von WEDEL *et al.*, 1988). Em experimentos de laboratório, a mineralização de hidrocarbonetos do solo foi severamente limitada quando a concentração de oxigênio estava abaixo de 10%. Nos últimos anos, tem-se aumentado o interesse pelo uso de compostos liberadores de oxigênio (CLO), tais como percarbonato e peróxido de magnésio. A tecnologia dos CLO está sendo usada em cerca de 2.000 sítios em 46 estados norte-americanos e em diversos outros países. O CLO promove oxidação direta do contaminante e, ao mesmo tempo, propicia um aumento da degradação microbiológica aeróbia (ARIENZO, 2000). Um CLO formado de peróxido de magnésio possibilitou a biodegradação microbiológica em lençol freático contaminado com altos índices de BTEX por um período de dez semanas (BIANCHI-MOSQUERA *et al.*, 1994). Em presença de água, peróxido de magnésio reage liberando oxigênio e $Mg(OH)_2$, o conhecido “leite de magnésia” (REGENESIS, 2004). Um efeito adverso do emprego dos CLO é o aumento de pH do meio, o que pode interferir no crescimento e na atividade dos microrganismos responsáveis pela degradação dos contaminantes.

Além de oxigênio, a disponibilidade de nutrientes, em especial nitrogênio e fósforo, também é essencial para o sucesso do processo de biodegradação (FERNANDES, 1997). Numerosos estudos têm sido publicados nos quais a manutenção de concentração adequada de nitrogênio e/ou fósforo estimulou a degradação dos poluentes orgânicos no solo (BRAGG *et al.*, 1994; CLELAND *et al.*, 1997; BREEDVELD e SPARREVIK, 2000; MARGESIN *et al.*, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção de isolados bacterianos com capacidade de utilização de gasolina como fonte de carbono

Utilizaram-se 52 isolados pertencentes à coleção bacteriana do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente - LBBMA do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Os referidos isolados foram obtidos de amostras de solo e de água, coletadas em áreas com histórico de contaminação com petróleo e derivados (Tabela 3).

As bactérias de interesse foram reativadas em tubos de cultura contendo meio R2A (REASONER e GELDREICH, 1985) e incubadas a 30°C por 12 horas. Após centrifugação e ressuspensão em meio mineral NMP (MARGESIN e SCHINNER, 1997) suplementado com nitrato de amônio (Tabela 4), as células foram inoculadas em tubos contendo 4 mL do referido meio acrescido de gasolina na concentração de 2% (v/v). O volume de inóculo utilizado foi o suficiente para a obtenção de uma densidade óptica inicial de 0,05 a 600 nm. Os tubos foram incubados a 30°C e 150 rpm, sendo o crescimento microbiano acompanhado, em intervalos de 72 horas, até o décimo quinto dia após a inoculação. Nesses ensaios utilizou-se tanto a gasolina contendo 25% (v/v) de etanol, quanto a gasolina pura a fim de se avaliar o efeito do etanol

Tabela 3 – Origem de alguns isolados bacterianos pertencentes à biblioteca do LBBMA

Isolado	Origem
LBBMA 1	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 12	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 17	Lagoa aerada REGAP
LBBMA 18A	RECAP – Borra oleosa
LBBMA 36	RECAP – Borra oleosa
LBBMA 40	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 41	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 43	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 47	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 53A	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 57	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 58	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 75	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 81	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 81A	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 83	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 84	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 84B	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 86	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 88A	RECAP ³ - borra oleosa
LBBMA 88B	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 89	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 90	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 91	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 97	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA 98	UFV – Solo da oficina mecânica
LBBMA 101	UFV – Solo da oficina mecânica
LBBMA 105A	UFV – Solo da oficina mecânica
LBBMA 115	REDUC ¹ - sedimento de mangue
LBBMA 119	REDUC ¹ - sedimento de mangue
LBBMA 155	REDUC ¹ - sedimento de mangue
LBBMA 168	REDUC ¹ - sedimento de mangue
LBBMA 178	REDUC ¹ - sedimento de mangue
LBBMA 178B	REDUC ¹ - sedimento de mangue
LBBMA 185	REDUC ¹ - sedimento de mangue
LBBMA 186	REDUC ¹ - sedimento de mangue
LBBMA 188	RECAP ³ - borra oleosa
LBBMA 191	RECAP ³ - borra oleosa
LBBMA 193	RECAP ³ - borra oleosa
LBBMA 199	RECAP ³ - borra oleosa
LBBMA 201	RECAP ³ - borra oleosa

Tabela 3, Cont.

Isolado	Origem
LBBMA 202	RECAP ³ - borra oleosa
LBBMA 203	RECAP ³ - borra oleosa
LBBMA 204	RECAP ³ - borra oleosa
LBBMA 205	RECAP ³ - borra oleosa
LBBMA 206	RECAP ³ - borra oleosa
LBBMA 207	RECAP ³ - borra oleosa
LBBMA B1	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA B4	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA ES11	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA ES 2	REGAP ² Área destinada a Landfarming
LBBMA F3	REGAP ² Área destinada a Landfarming

¹ REDUC – Refinaria Duque de Caxias – Duque de Caxias, RJ.

² REGAP – Refinaria Gabriel Passos – Betim, MG.

³ RECAP – Refinaria de Capuava – Mauá, SP.

Tabela 4 – Composição do meio mineral NMP¹ suplementado com nitrato de amônio

Componente	g L⁻¹
Sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Fosfato de sódio bibásico (Na ₂ HPO ₄)	2,8
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	2,0
Nitrato de cálcio [Ca(NO ₃) ₂ .4 H ₂ O]	0,05
Citrato de ferro (III) amoniacal	0,01
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7 H ₂ O)	0,02
Extrato de levedura	0,01
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	0,148

Fonte: ¹MARGESIN e SCHINNER (1997).

sobre o crescimento dos microrganismos. O mesmo procedimento foi aplicado a bactérias isoladas de borra oleosa coletada em tanques de armazenamento de óleo combustível. A amostra de borra foi diluída em solução salina estéril a 0,85% e plaqueada em meio ágar-NMP suplementado com gasolina a 2% (v/v). As colônias foram repicadas em meio R2A e os isolados estocados em solução de glicerol a -82°C, vindo a fazer parte da coleção de isolados do LBBMA.

3.2. Seleção de isolados bacterianos com capacidade de utilização de benzeno, tolueno e xilenos como fonte de carbono

Os isolados que apresentaram crescimento considerado satisfatório ($A_{600} > 0,200$) em meio mineral suplementado com gasolina foram testados quanto à capacidade de crescimento a partir da utilização dos compostos monoaromáticos benzeno, tolueno e xilenos (isômeros), como fonte exclusiva de carbono. Após a reativação em meio R2A, centrifugação e ressuspensão celular em NMP, as culturas foram inoculadas em tubos contendo 4 mL do meio mineral acrescido de benzeno a 1% (v/v), de tolueno a 3% (v/v) ou de xileno (-*o*, -*m* e *p*) a 6% (v/v). A concentração de células nos inóculos foi padronizada para se obter um valor de $DO_{600} = 0,05$ como densidade óptica inicial a 600 nm. O crescimento microbiano foi analisado a cada 72 horas durante a incubação, a 150 rpm e 30°C, por um período de quinze dias, para seleção dos isolados a serem utilizados nos consórcios microbianos.

3.3. Produção de biossurfactantes

Os isolados que apresentaram crescimento considerado satisfatório em gasolina comercial foram avaliados quanto à capacidade de produção de biossurfactantes. Para isso, foram cultivados em 20 mL dos meios MM₃ (BANAT *et al.*, 1991) ou NMP (MARGESIN & SHINNER, 1997) por 21 dias em frascos Erlenmeyer, a 30°C e 150 rpm. Em intervalos de sete dias foram retiradas alíquotas do meio de cultura, as quais foram analisadas quanto à capacidade de reduzir a tensão interfacial pelo método do anel de Du Nouy, utilizando um tensiômetro (*Fisher Surface Tensiomat*, Model 21, Pittsburgh, EUA).

Tabela 5 – Composição do meio MM₃¹

Componente	g L ⁻¹
Na ₂ H PO ₄	2,7
KH ₂ PO ₄	1,4
NaNO ₃	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,154
K ₂ SO ₄	0,36
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,027
NaCl	0,1
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,02
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,525
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,705
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2
H ₃ BO ₃	0,02
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,015

Fonte: ¹BANAT *et al.* (1991).

3.4. Composição do consórcio microbiano empregado no ensaio de biorremediação de solo contaminado com gasolina

Com vistas à biorremediação de solo contaminado com gasolina em biorreatores, procedeu-se a escolha dos isolados de bactérias que demonstraram crescimento satisfatório em meio de cultura suplementado com gasolina pura ou com a gasolina adicionada de etanol 25% (v/v), com benzeno, com tolueno ou com xilenos. Esses isolados, além de outro com elevada capacidade de produção de biossurfactante, compuseram o consórcio microbiano avaliado no ensaio de biorremediação de solo contaminado com gasolina comercial.

3.5. Efeito de um composto liberador de oxigênio (CLO) sobre o crescimento microbiano

O crescimento dos isolados constituintes do consórcio na presença de MgO₂, um composto liberador de oxigênio, CLO (ORC®, Regenesis, USA) foi avaliado em tubos contendo 4mL de meio mineral NMP acrescido de gasolina a 5% p/v e de MgO₂ a 30 g L⁻¹. As culturas foram mantidas a 30°C sob agitação de 150 rpm. O crescimento foi avaliado sete dias após a inoculação, por meio da leitura da densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro marca Biorad® modelo *SmartSpec 3000*.

3.6. Identificação dos isolados microbianos

A identificação dos isolados integrantes do consórcio foi feita por meio da análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), baseada na composição de ácidos graxos totais. Os extratos de FAME foram analisados por cromatografia gasosa, utilizando-se o sistema Sherlock da Microbial Identification System® (MIDI, Newark, DE, EUA). A identificação foi realizada por meio da comparação do perfil dos ácidos graxos de cada isolado com os da biblioteca de referência TSBA 4.0®.

3.7. Biorremediação de solo contaminado com gasolina comercial em biorreatores

O solo utilizado no experimento de biorremediação foi coletado a uma profundidade de 3 m, em terreno localizado na zona urbana de Viçosa-MG. Amostras de solo foram encaminhadas ao Departamento de Solos da UFV e submetidas a análises químicas de rotina e de granulometria (Tabela 6).

Tabela 6 – Características físicas e químicas do solo utilizado no ensaio de biorremediação

Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila	Classe Textural			
----- dag/kg -----				Franco-siltosa			
25	23	50	2				
pH em H₂O	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H + Al
----- mg/dm ³ -----			----- cmol _c /dm ³ -----				
6,95	0,3	42	-	1,03	0,08	0,00	0,0
Zn	Fé	Mn	Cu	B	S		
----- cmol _c /dm ³ -----							
2,66	13,4	0,4	1,17	-	-		

Para os testes de biodegradação de gasolina em *slurries* de solo, foi projetado e construído um sistema de biorreatores (Figura 1), baseando-se em informações e detalhes capazes de reunir, naquele equipamento, as exigências necessárias à obtenção de um sistema eficiente de biotratamento. O sistema foi construído para comportar a operação simultânea de doze frascos de vidro em paralelo em um único aparelho, os biorreatores, imersos em banho de água para controle de temperatura e com sistema de agitação.



Figura 1 – Biorreatores empregados nos testes de biorremediação. 1A e 1B: vista externa frontal do equipamento; 1C: em destaque, no canto superior direito, painel de controle de temperatura, rotação e período de funcionamento. 1D: interior do equipamento, com destaque para os canais por onde é feita a alimentação de ar.

Os frascos são cilíndricos, contendo internamente um eixo em aço inox acoplado a uma palheta que se estende de sua porção terminal até cerca de $\frac{3}{4}$ de extensão do eixo. O eixo de cada frasco conecta-se por engrenagem apropriada a um eixo principal, que se acopla no motor elétrico do equipamento. Dessa forma, a agitação nos frascos ocorre de forma simultânea e na mesma frequência em todos os frascos. O controle de temperatura é feito por banho de água, circulante em todo o sistema, aquecida e bombeada a partir de um reservatório localizado na parte inferior do equipamento.

O experimento conduzido nos biorreatores foi montado conforme descrito na Tabela 6. A cada frasco adicionaram-se 3 mL de gasolina comercial e 300 mL de meio NMP, inoculado com o consórcio previamente selecionado na proporção de 10^8 UFC mL⁻¹ de *slurry* para cada componente do consórcio. A temperatura do sistema foi mantida constante a 30°C e a rotação a 150 rpm.

Para a avaliação do fator oxigenação, empregaram-se três tratamentos, a saber: injeção de ar atmosférico; aplicação de um composto liberador de oxigênio (MgO₂) ou ausência de oxigenação. A concentração de CLO empregada no experimento foi de 3% (p/p), com relação à massa de hidrocarbonetos introduzidos.

O ar atmosférico foi filtrado em membranas tipo Millipore® antes de sua injeção nos frascos por uma bomba compressora.

A esterilização do solo, utilizado em alguns tratamentos (Tabela 7) foi efetuada por meio de autoclavagem a 121°C por 30 minutos. O meio empregado no ensaio foi esterilizado nas mesmas condições antes de ser transferido para os frascos biorreatores.

Após 15 dias de incubação, foram retiradas assepticamente alíquotas de 10ml dos *slurries* contidos nos frascos do biorreator. Partindo-se destas amostras, foi analisada a concentração residual de BTX pelo método de Headspace (SERRANO e GALAGO, 2004). As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS), Shimadzu®, modelo 17-A, tendo He como gás de arraste e coluna capilar Nukol® de 100 m x 0,20 mm x 0.25 µm i.d. As condições de análise foram as seguintes: temperaturas do injetor e detector mantidas a 250°C; temperatura

inicial da coluna a 40°C com elevação de 5°C/min, fluxo de 30 cm s⁻¹, até uma temperatura final de 240°C; razão de split 1:69 e corrida de 33 minutos.

Tabela 7 – Descrição dos tratamentos de biorremediação de solo contaminado com gasolina adicionada de etanol 25% (v/v) em biorreator

Tratamentos	Descrição¹
1	Solo + H ₂ O + gasolina
2	Solo estéril + H ₂ O + gasolina
3	Solo estéril + H ₂ O + CLO + gasolina
4	Solo estéril + H ₂ O + ventilação + gasolina
5	Solo inoculado + H ₂ O + gasolina
6	Solo inoculado + H ₂ O + CLO + gasolina
7	Solo inoculado + H ₂ O + ventilação + gasolina
8	Solo + meio MM + gasolina
9	Solo + meio MM + CLO + gasolina
10	Solo + meio MM + ventilação + gasolina
11	Solo inoculado + meio MM + gasolina
12	Solo inoculado + meio MM + CLO + gasolina
13	Solo inoculado + meio MM + ventilação + gasolina

¹O experimento foi conduzido com temperatura ajustada em 30°C e agitação de 150 rpm durante 15 dias; CLO, composto liberador de oxigênio; MM, meio mineral.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de isolados bacterianos com capacidade de utilização de gasolina como fonte de carbono

A seleção de bactérias em meio de cultura NMP contendo gasolina pura como única fonte de carbono resultou em 16 isolados com capacidade de crescimento considerado satisfatório ($DO_{600} > 0,200$) (Tabela 8). O crescimento de 5 isolados (LBBMA 155, LBBMA 188, LBBMA 193, LBBMA 202 e LBBMA ES2), dentre os 52 isolados avaliados, foi fortemente inibido em meio enriquecido com gasolina comercial (Tabela 9). A presença do etanol como componente da gasolina comercial tem como consequência o aumento da solubilidade aquosa dos hidrocarbonetos de petróleo. Na presença de 10% de etanol, as solubilidades dos BTEX excedem a solubilidade em água pura em 20, 40 e 50% para o benzeno, tolueno e *o*-xileno, respectivamente (Corseuil e Fernandes, 1999). A maior solubilidade dos compostos BTX na gasolina comercial provoca aumento da toxicidade aos microrganismos, o que explica a relatada inibição do crescimento de alguns isolados. Os isolados LBBMA 47, LBBMA 84, LBBMA 186 e LBBMA B4, embora capazes de crescer na presença do etanol (Tabela 9), apresentaram crescimento inferior ao observado em gasolina pura (Tabela 8). Neste caso, os isolados estariam sofrendo os mesmos efeitos tóxicos dos compostos BTX solubilizados, porém em menor intensidade.

Tabela 8 – Crescimento de isolados bacterianos cultivados em meio mineral NMP suplementado com gasolina pura¹

Isolado	Incubação (dias)				
	3	6	9	12	15
LBBMA 1	0,049	0,081	0,099	0,098	0,081
LBBMA 12	0,102	0,284	0,306	0,330	0,332
LBBMA 17	0,087	0,074	0,079	0,085	0,065
LBBMA 18A	0,072	0,087	0,094	0,102	0,113
LBBMA 36	0,070	0,090	0,074	0,121	0,092
LBBMA 40	0,016	0,050	0,046	0,060	0,047
LBBMA 41	0,050	0,068	0,062	0,079	0,068
LBBMA 43	0,079	0,173	0,168	0,189	0,182
LBBMA 47	0,287	0,307	0,301	0,292	0,284
LBBMA 53A	0,118	0,107	0,078	0,088	0,083
LBBMA 57	0,087	0,093	0,141	0,158	0,176
LBBMA 58	0,050	0,017	0,018	0,019	0,017
LBBMA 75	0,076	0,090	0,099	0,164	0,164
LBBMA 81	0,062	0,075	0,084	0,073	0,073
LBBMA 81A	0,092	0,108	0,113	0,135	0,144
LBBMA 83	0,055	0,033	0,038	0,034	0,023
LBBMA 84	0,248	0,268	0,261	0,309	0,286
LBBMA 84B	0,068	0,052	0,083	0,078	0,074
LBBMA 86	0,090	0,107	0,119	0,127	0,116
LBBMA 88 ^a	0,052	0,054	0,075	0,090	0,082
LBBMA 88B	0,054	0,061	0,069	0,092	0,089
LBBMA 89	0,014	0,019	0,013	0,016	0,014
LBBMA 90	0,049	0,038	0,027	0,038	0,033
LBBMA 91	0,074	0,148	0,085	0,091	0,084
LBBMA 97	0,048	0,056	0,070	0,740	0,790
LBBMA 98	0,068	0,092	0,081	0,103	0,106
LBBMA 101	0,071	0,082	0,096	0,106	0,135
LBBMA 105A	0,181	0,247	0,262	0,301	0,298
LBBMA 115	0,070	0,080	0,021	0,026	0,021
LBBMA 119	0,060	0,080	0,085	0,095	0,130
LBBMA 155	0,402	0,312	0,338	0,348	0,406
LBBMA 168	0,074	0,096	0,106	0,122	0,120
LBBMA 178	0,094	0,093	0,096	0,134	0,141
LBBMA 178B	0,275	0,271	0,293	0,283	0,258
LBBMA 185	0,101	0,156	0,140	0,148	0,146
LBBMA 186	0,224	0,270	0,318	0,342	0,338
LBBMA 188	0,293	0,295	0,323	0,262	0,229
LBBMA 191	0,090	0,054	0,041	0,054	0,037
LBBMA 193	0,205	0,248	0,234	0,227	0,240

Tabela 8, Cont.

Isolado	Incubação (dias)				
	3	6	9	12	15
LBBMA 199	0,114	0,233	0,318	0,346	0,364
LBBMA 201	0,086	0,113	0,130	0,138	0,145
LBBMA 202	0,170	0,243	0,300	0,338	0,343
LBBMA 203	0,092	0,078	0,074	0,072	0,059
LBBMA 204	0,069	0,091	0,071	0,083	0,070
LBBMA 205	0,015	0,027	0,031	0,031	0,026
LBBMA 206	0,286	0,308	0,317	0,345	0,316
LBBMA 207	0,011	0,012	0,012	0,025	0,018
LBBMA B1	0,260	0,304	0,358	0,426	0,414
LBBMA B4	0,365	0,360	0,370	0,394	0,384
LBBMA ES 2	0,114	0,252	0,356	0,363	0,362
LBBMA ES11	0,068	0,108	0,154	0,157	0,170
LBBMA F3	0,068	0,152	0,253	0,292	0,347

¹ O crescimento microbiano foi avaliado por meio da densidade ótica a 600nm de culturas inoculadas em meio mineral NMP suplementado com gasolina pura a 5% (v/v). A concentração de células no inóculo foi ajustada para se obter uma DO₆₀₀ de 0,05 no início da incubação. As culturas foram incubadas durante 15 dias a 30°C e 150 rpm. Para fins de seleção, foram considerados os isolados que apresentaram valores de DO₆₀₀ maiores que 0,200 durante o crescimento (em destaque).

Tabela 9 – Crescimento de isolados bacterianos cultivados em meio mineral NMP suplementado com gasolina comercial¹

Isolado	Incubação (dias)				
	3	6	9	12	15
LBBMA 1	0,086	0,980	0,088	0,110	0,096
LBBMA 12	0,117	0,108	0,101	0,148	0,174
LBBMA 17	0,250	0,230	0,250	0,260	0,270
LBBMA 18 ^a	0,074	0,300	0,280	0,314	0,313
LBBMA 36	0,064	0,034	0,024	0,033	0,018
LBBMA 40	0,057	0,092	0,088	0,085	0,077
LBBMA 41	0,076	0,055	0,044	0,081	0,072
LBBMA 43	0,011	0,037	0,012	0,048	0,029
LBBMA 47	0,171	0,165	0,176	0,202	0,224
LBBMA 53A	0,680	0,940	0,794	0,856	0,836
LBBMA 57	0,840	0,850	0,855	0,614	0,542
LBBMA 58	0,130	0,040	0,057	0,054	0,031
LBBMA 75	0,055	0,202	0,265	0,366	0,420
LBBMA 81	1,045	0,965	0,905	0,865	0,845
LBBMA 81A	0,077	0,125	0,100	0,112	0,101
LBBMA 83	0,083	0,054	0,045	0,047	0,046
LBBMA 84	0,198	0,211	0,201	0,238	0,245
LBBMA 84B	0,073	0,038	0,108	0,116	0,113

Tabela 9, Cont.

Isolado	Incubação (dias)				
	3	6	9	12	15
LBBMA 86	0,093	0,113	0,095	0,104	0,115
LBBMA 88A	0,438	1,500	1,560	1,500	1,540
LBBMA 88B	0,036	0,087	0,079	0,066	0,092
LBBMA 89	0,070	0,090	0,011	0,010	0,012
LBBMA 90	1,050	1,100	1,580	1,740	1,800
LBBMA 91	0,057	0,113	0,077	0,099	0,083
LBBMA 97	0,520	0,630	0,380	0,365	0,322
LBBMA 98	0,067	0,318	0,358	0,357	0,356
LBBMA 101	0,025	0,078	0,062	0,052	0,048
LBBMA 105A	0,950	0,925	0,944	0,920	0,930
LBBMA 115	1,090	1,080	1,050	1,025	0,980
LBBMA 119	0,290	0,378	0,323	0,306	0,311
LBBMA 155	0,017	0,014	0,015	0,015	0,013
LBBMA 168	0,049	0,032	0,051	0,056	0,051
LBBMA 178	0,500	0,869	0,834	0,898	0,872
LBBMA 178B	0,692	0,458	0,372	0,345	0,351
LBBMA 185	0,101	0,412	0,376	0,388	0,364
LBBMA 186	0,186	0,296	0,256	0,243	0,180
LBBMA 188	0,088	0,060	0,050	0,049	0,032
LBBMA 191	0,668	0,528	0,482	0,452	0,388
LBBMA 193	0,035	0,091	0,074	0,085	0,090
LBBMA 199	0,578	0,562	0,412	0,406	0,416
LBBMA 201	0,063	0,065	0,097	0,098	0,094
LBBMA 202	0,034	0,035	0,028	0,032	0,025
LBBMA 203	0,040	0,041	0,036	0,013	0,017
LBBMA 204	0,026	0,058	0,032	0,025	0,036
LBBMA 205	0,030	0,075	0,078	0,065	0,061
LBBMA 206	0,960	0,930	0,910	0,920	0,900
LBBMA 207	0,400	0,450	0,530	0,600	0,590
LBBMA B1	1,100	0,905	0,950	1,005	1,080
LBBMA B4	0,083	0,146	0,188	0,198	0,216
LBBMA ES 2	0,034	0,038	0,039	0,030	0,038
LBBMA ES11	0,067	0,089	0,093	0,097	0,112
LBBMA F3	0,172	0,193	0,197	0,149	0,131

¹ O crescimento microbiano foi avaliado por meio da densidade ótica a 600nm de culturas inoculadas em meio mineral NMP suplementado com gasolina comercial a 5% (v/v). A concentração de células no inóculo foi ajustada para se obter uma DO₆₀₀ de 0,05 no início da incubação. As culturas foram incubadas durante 15 dias a 30°C e 150 rpm. Para fins de seleção, foram considerados os isolados que apresentaram valores de DO₆₀₀ maiores que 0,800 durante o crescimento (em destaque).

O crescimento dos isolados LBBMA 53A, LBBMA 57, LBBMA 81A, LBBMA 88A, LBBMA 90, LBBMA 105A, LBBMA 115, LBBMA 178, LBBMA 206 e LBBMA B1, por outro lado, foi amplamente estimulado pela presença de etanol ($DO_{600} > 0,800$; Tabela 9). Os álcoois primários, incluindo o etanol, podem ser biodegradados preferencialmente a outros compostos por diversas espécies microbianas (Corseuil e Marins, 1997). A esse fato pode ser creditado o maior crescimento observado para alguns isolados microbianos em meio suplementado com gasolina comercial. O etanol pode inibir a degradação de hidrocarbonetos ao provocar a repressão de genes catabólicos dessas vias. Experimentos com culturas puras revelam que, em alguns casos, o etanol reprime genes catabólicos e reduz o fluxo metabólico de tolueno (Alvarez *et al.*, 2004), afetando a biodegradação desse composto aromático. Em condições aeróbias, o etanol foi degradado preferencialmente por *Pseudomonas putida* (PpF1) ao provocar a repressão da síntese de enzimas envolvidas na degradação do benzeno (Hunt *et al.*, 1997). A biodegradação preferencial do etanol pode ainda levar ao consumo do oxigênio disponível no meio, o qual é também necessário à degradação dos hidrocarbonetos aromáticos pela microbiota nativa (Corseuil e Hunt, 1998). Em estudos com metanol e compostos BTEX, Barker *et al.* (1990) concluíram que a maior persistência dos BTEX em presença do metanol era causada pela inibição da biodegradação pela alta concentração do álcool e, principalmente, pelo esgotamento do oxigênio durante a biodegradação preferencial do metanol. Deve-se considerar ainda que o etanol e outros álcoois podem ser degradado por enzimas constitutivas associadas com as vias metabólicas centrais e, portanto, os microrganismos que podem degradar álcoois simples são mais comuns na natureza que microrganismos capazes de degradar de compostos BTEX (Powers *et al.*, 2001).

A partir dos resultados obtidos, infere-se que os impactos dos derramamentos de gasolina comercial sobre as comunidades microbianas, podem ser mais intensos do que aqueles em que há derramamento de gasolina pura, uma vez que o etanol pode maximizar os efeitos tóxicos da gasolina sobre as populações microbianas com potencial de degradação de hidrocarbonetos (Tabelas 8 e 9).

Os procedimentos utilizados durante o isolamento de microrganismos a partir de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, permitiram a seleção de 26 isolados com potencial metabólico requerido para uma possível aplicação em processo de remediação de solo contaminado com gasolina comercial.

4.2. Seleção de isolados bacterianos com capacidade de utilização de benzeno, tolueno e xilenos como fonte de carbono

Os 16 isolados microbianos que apresentaram crescimento mais expressivo em meio NMP suplementado com gasolina pura foram incluídos no estudo para avaliar a capacidade de metabolizarem os compostos benzeno, tolueno e xilenos.

Em meio suplementado com benzeno (Tabela 10), os únicos isolados com crescimento considerado satisfatório foram o LBBMA 105A e o LBBMA193 (Tabela 11). Em meio suplementado com tolueno (Tabela 11), houve crescimento apenas do isolado LBBMA 193 ($DO_{600} = 0,142$). No meio suplementado com xilenos (Tabela 12), além do isolado LBBMA 193, cresceu ainda o isolado LBBMA B1 ($DO_{600} = 0,116$). Os isolados LBBMA B1, LBBMA 105A e LBBMA 193 foram então escolhidos para integrarem o consórcio microbiano empregado nos experimentos de biorremediação conduzidos nos biorreatores.

Os compostos BTEX são facilmente degradados em condições aeróbias. As reações são catalizadas por enzimas do grupo das oxigenases, que promovem a hidroxilação do anel aromático ou dos radicais alquil (Roberts, 1998). Em condições de escassez de oxigênio, esses compostos persistem no ambiente (Cavalca *et al.*, 2000)

Dentre os compostos BTEX, o tolueno é degradado por muitas linhagens de bactérias aeróbias (*Burkholderia cepacea* G4, *Ralstonia pickettii* PKO1 e *Pseudomonas mendocina* KR1), sendo identificadas cinco diferentes vias de degradação daquele composto monoaromático (Shinoda *et al.*, 2003). O benzeno é degradado por várias espécies microbianas, a exemplo da *P. putida* F1 (Gibson *et al.*, 1994), *Rhodococcus* sp. RHA1 (Hatta *et al.*, 1997), *P. aureofaciens* CM21 (Cavalca *et al.*, 2000), dentre outras. Espécies dos

gêneros *Pseudomonas*, como *P. putida* e *P. fluorescens*, são capazes de degradar compostos BTEX, mesmo em condições de baixa disponibilidade de oxigênio (Shim *et al.*, 1999). Alguns estudos têm demonstrado que, sob condições apropriadas, benzeno pode ser oxidado a CO₂ na ausência de oxigênio com sulfato ou Fe(III) servindo como aceptores de elétrons (Kasumi *et al.*, 1997).

A despeito dos relatos de degradação de compostos BTX, não foram encontrados, neste estudo, isolados bacterianos que demonstrassem crescimento expressivo na presença do benzeno, tolueno ou xilenos (Tabela 10 a 12). Os dados demonstram que o crescimento desses organismos, em meio contendo gasolina comercial (Tabela 11), é suportado por outros hidrocarbonetos ou pelo etanol.

Tabela 10 – Crescimento de isolados bacterianos cultivados em meio mineral NMP suplementado com benzeno¹

Isolado	Incubação (dias)			
	3	6	9	12
LBBMA 12	0,044 (0,005)	0,045 (0,011)	0,043 (0,014)	0,050 (0,017)
LBBMA 47	0,046 (0,004)	0,035 (0,003)	0,033 (0,002)	0,034 (0,008)
LBBMA 84	0,054 (0,012)	0,032 (0,008)	0,034 (0,008)	0,134 (0,048)
LBBMA 155	0,074 (0,037)	0,089 (0,008)	0,096 (0,015)	0,098 (0,020)
LBBMA 186	0,060 (0,007)	0,056 (0,006)	0,052 (0,005)	0,048 (0,007)
LBBMA 188	0,045 (0,010)	0,048 (0,007)	0,046 (0,012)	0,082 (0,016)
LBBMA 193	0,118 (0,008)	0,813 (0,011)	0,747 (0,013)	0,615 (0,008)
LBBMA 199	0,046 (0,005)	0,050 (0,010)	0,047 (0,009)	0,058 (0,014)
LBBMA 202	0,035 (0,006)	0,023 (0,002)	0,020 (0,001)	0,018 (0,002)
LBBMA 206	0,045 (0,008)	0,036 (0,004)	0,025 (0,005)	0,031 (0,009)
LBBMA 105A	0,153 (0,006)	0,266 (0,130)	0,292 (0,126)	0,278 (0,124)
LBBMA 178B	0,025 (0,005)	0,059 (0,062)	0,026 (0,006)	0,033 (0,025)
LBBMA B1	0,037 (0,015)	0,036 (0,018)	0,031 (0,016)	0,031 (0,018)
LBBMA B4	0,048 (0,001)	0,040 (0,031)	0,043 (0,001)	0,037 (0,001)
LBBMA ES2	0,052 (0,007)	0,059 (0,016)	0,057 (0,013)	0,053 (0,006)
LBBMA F3	0,039 (0,005)	0,035 (0,004)	0,025 (0,004)	0,027 (0,005)

¹ O crescimento microbiano foi avaliado por meio da densidade ótica a 600nm de culturas inoculadas em meio mineral suplementado com benzeno a 1% (v/v). A concentração de células no inóculo foi ajustada para se obter uma DO₆₀₀ de 0,05 no início da incubação. As culturas foram incubadas durante 12 dias a 30°C e 150 rpm. Os valores apresentados são a média de três repetições. Os números entre parênteses indicam o desvio-padrão da média.

Tabela 11 – Crescimento de isolados bacterianos cultivados em meio mineral NMP suplementado com tolueno¹

Isolado	Incubação (dias)			
	3	6	9	12
LBBMA 12	0,057 (0,008)	0,060 (0,018)	0,066 (0,034)	0,068 (0,034)
LBBMA 47	0,056 (0,029)	0,062 (0,043)	0,043 (0,003)	0,048 (0,003)
LBBMA 84	0,034 (0,003)	0,058 (0,015)	0,069 (0,037)	0,067 (0,027)
LBBMA 155	0,080 (0,000)	0,033 (0,004)	0,026 (0,001)	0,033 (0,015)
LBBMA 186	0,050 (0,011)	0,052 (0,007)	0,059 (0,005)	0,058 (0,006)
LBBMA 188	0,038 (0,017)	0,039 (0,001)	0,037 (0,006)	0,037 (0,004)
LBBMA 193	0,105 (0,013)	0,111 (0,010)	0,148 (0,018)	0,142 (0,021)
LBBMA 199	0,047 (0,020)	0,051 (0,001)	0,058 (0,001)	0,054 (0,006)
LBBMA 202	0,030 (0,007)	0,032 (0,024)	0,013 (0,011)	0,030 (0,048)
LBBMA 206	0,015 (0,008)	0,015 (0,004)	0,021 (0,007)	0,025 (0,004)
LBBMA 105A	0,067 (0,005)	0,072 (0,007)	0,071 (0,004)	0,079 (0,012)
LBBMA 178B	0,058 (0,005)	0,063 (0,062)	0,062 (0,006)	0,066 (0,025)
LBBMA B1	0,032 (0,005)	0,030 (0,039)	0,038 (0,001)	0,036 (0,001)
LBBMA B4	0,037 (0,012)	0,034 (0,008)	0,015 (0,012)	0,043 (0,008)
LBBMA ES2	0,048 (0,007)	0,050 (0,014)	0,048 (0,023)	0,052 (0,009)
LBBMA F3	0,048 (0,007)	0,036 (0,010)	0,032 (0,010)	0,038 (0,011)

¹ O crescimento microbiano foi avaliado por meio da densidade ótica a 600 nm de culturas inoculadas em meio mineral suplementado com tolueno a 3% (v/v). A concentração de células no inóculo foi ajustada para se obter uma DO₆₀₀ de 0,05 no início da incubação. As culturas foram incubadas durante 12 dias a 30°C e 150 rpm. Os valores apresentados são a média de três repetições. Os números entre parênteses indicam o desvio-padrão da média.

4.3. Produção de biossurfactantes

Em meios de cultura suplementados com gasolina comercial, 4 isolados, dentre os 16 isolados capazes de crescer na presença desse combustível, produziram biossurfactantes (Tabela 13). Esses isolados (LBBMA 53A, 88A, 115 e 178) foram capazes de reduzir as tensões interfaciais a valores abaixo de 40mN.m⁻¹, valor considerado adequado para a validação da eficiência de um biossurfactante (Cooper *et al.*, 1980). Todos os isolados produziram biossurfactantes no meio MM₃, mas em meio NMP, somente os isolados LBBMA 53A e LBBMA 178 produziram compostos tensoativos o suficiente para reduzir a tensão interfacial para valores abaixo de 40mN.m⁻¹. O efeito do meio de crescimento sobre a capacidade de produção de biossurfactantes tem sido reportada (Cameotra e Makkar, 1998), inclusive em nosso laboratório (Lima, 2003).

Tabela 12 – Crescimento de isolados bacterianos cultivados em meio mineral NMP suplementado com xileno (o, m e p)¹

Isolado	Incubação (dias)			
	3	6	9	12
LBBMA 12	0,055 (0,004)	0,065 (0,003)	0,076 (0,003)	0,081 (0,001)
LBBMA 47	0,054 (0,004)	0,058 (0,001)	0,062 (0,003)	0,028 (0,004)
LBBMA 84	0,034 (0,006)	0,040 (0,010)	0,047 (0,009)	0,051 (0,009)
LBBMA 155	0,066 (0,003)	0,066 (0,005)	0,065 (0,002)	0,066 (0,004)
LBBMA 186	0,055 (0,001)	0,067 (0,005)	0,249 (0,005)	0,067 (0,006)
LBBMA 188	0,051 (0,010)	0,058 (0,009)	0,060 (0,007)	0,061 (0,007)
LBBMA 193	0,091 (0,003)	0,117 (0,016)	0,124 (0,005)	0,157 (0,002)
LBBMA 199	0,046 (0,005)	0,050 (0,010)	0,047 (0,009)	0,065 (0,014)
LBBMA 202	0,040 (0,006)	0,044 (0,002)	0,055 (0,004)	0,053 (0,002)
LBBMA 206	0,049 (0,005)	0,049 (0,006)	0,052 (0,008)	0,050 (0,005)
LBBMA 105A	0,058 (0,004)	0,063 (0,006)	0,067 (0,012)	0,068 (0,014)
LBBMA 178B	0,066 (0,010)	0,071 (0,007)	0,086 (0,013)	0,093 (0,008)
LBBMA B1	0,062 (0,002)	0,088 (0,037)	0,091 (0,014)	0,116 (0,014)
LBBMA B4	0,051 (0,008)	0,050 (0,008)	0,051 (0,007)	0,056 (0,004)
LBBMA ES2	0,054 (0,005)	0,055 (0,006)	0,058 (0,006)	0,066 (0,007)
LBBMA F3	0,037 (0,003)	0,037 (0,002)	0,043 (0,002)	0,047 (0,005)

¹O crescimento microbiano foi avaliado por meio da densidade ótica a 600nm de culturas inoculadas em meio mineral suplementado com xilenos (o, m e p) a 6% (v/v). A concentração de células no inóculo foi ajustada para se obter uma DO₆₀₀ de 0,05 no início da incubação. As culturas foram incubadas durante 12 dias a 30°C e 150 rpm. Os valores apresentados são a média de três repetições. Os números entre parênteses indicam o desvio-padrão da média

Existem poucos relatos da produção de biossurfactantes por microrganismos utilizando gasolina comercial brasileira como fonte de carbono. Cunha et al. (2004) descreve a produção de biossurfactantes por uma linhagem de *Serratia* sp. proveniente de solos de mata tropical brasileira em meio contendo gasolina comercial como única fonte de carbono e de energia. Essa característica pode ser usada como auxiliar na biorremediação de solos contaminados com gasolina ou com outros derivados do petróleo, uma vez que biossurfactantes produzidos *in situ* podem contribuir para aumentar a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos menos solúveis em água.

Tabela 13 – Tensão interfacial (m.Nm^{-1}) dos meios de cultivo MM_3 e NMP inoculados com isolados microbianos em presença de gasolina comercial¹

Isolado	Incubação (dias)					
	7		14		21	
	MM_3	NMP	MM_3	NMP	MM_3	NMP
LBBMA 57	57,7 (0,26)	58,4 (0,60)	64,0 (1,00)	57,7 (0,10)	61,3 (0,26)	58,4 (0,52)
LBBMA 105A	64,2 (0,10)	59,9 (0,80)	61,5 (0,10)	55,3 (0,30)	58,7 (0,10)	54,8 (0,10)
LBBMA 81A	54,1 (0,17)	58,0 (0,65)	52,9 (0,15)	57,3 (0,25)	51,5 (0,43)	56,8 (0,60)
LBBMA 88A	35,0 (1,00)	45,7 (0,17)	34,6 (0,15)	45,2 (0,15)	34,1 (0,26)	44,3 (0,43)
LBBMA 178	38,5 (0,30)	38,3 (0,55)	37,5 (0,10)	38,8 (0,26)	36,7 (0,17)	38,3 (0,20)
LBBMA 206	64,9 (0,26)	62,8 (0,80)	65,9 (0,10)	60,9 (0,26)	64,7 (0,26)	61,2 (0,10)
LBBMA 53A	36,3 (0,10)	35,2 (0,15)	36,8 (0,10)	34,7 (0,20)	35,8 (0,26)	33,0 (0,17)
LBBMA 90	39,8 (0,17)	47,0 (1,00)	46,0 (1,00)	45,0 (1,00)	43,2 (0,26)	45,2 (0,17)
LBBMA 115	37,5 (0,26)	61,9 (0,47)	35,2 (0,15)	59,7 (0,10)	33,6 (0,20)	63,0 (0,26)
LBBMA B1	53,0 (0,20)	58,0 (0,20)	53,5 (0,36)	59,0 (0,50)	52,9 (0,11)	59,0 (0,10)

¹ Os microrganismos foram mantidos a 30°C e 150 rpm durante 21 dias nos meios MM_3 e NMP suplementados com 5% (v/v) de gasolina comercial. Os valores apresentados são a média de três repetições. Os números entre parênteses indicam o desvio-padrão da média.

A partir da constatação da eficiência de redução de tensão interfacial em meio NMP, de composição mais simplificada, os isolados LBBMA 53A e LBBMA 178 foram selecionados como membros adicionais do consórcio microbiano utilizado no ensaio de biorremediação de solo contaminado com gasolina adicionada de 25% (v/v) de etanol. Após a identificação do isolado LBBMA 53A como *Pseudomonas aeruginosa*, e levando-se em consideração o caráter antibiótico dos ramnolipídeos de *P. aeruginosa* (Guerra-Santos *et al.*, 1984; Lang, 2002), decidiu-se pela realização de um ensaio para analisar o efeito desse biossurfactante sobre o crescimento dos demais isolados microbianos integrantes do consórcio.

O crescimento dos isolados LBBMA 105A, LBBMA 178B, LBBMA 193 e LBBMA B1 não foi influenciado pela presença do biossurfactante ramnolipídeo

no meio de cultivo na concentração de 1% (p/v), conforme demonstrado por suas respectivas curvas de crescimento (Figura 2). No entanto, o crescimento do isolado LBBMA 178 foi fortemente inibido pela presença do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa*. O isolado LBBMA 178 foi posteriormente identificado como sendo uma espécie do gênero *Pseudomonas* diferente da espécie *P. aeruginosa*. A inibição de espécies microbianas evolutivamente relacionadas, possivelmente competidoras por nichos ecológicos, pode conferir uma vantagem competitiva à espécie *P. aeruginosa* (Nitschke *et al.*, 2002).

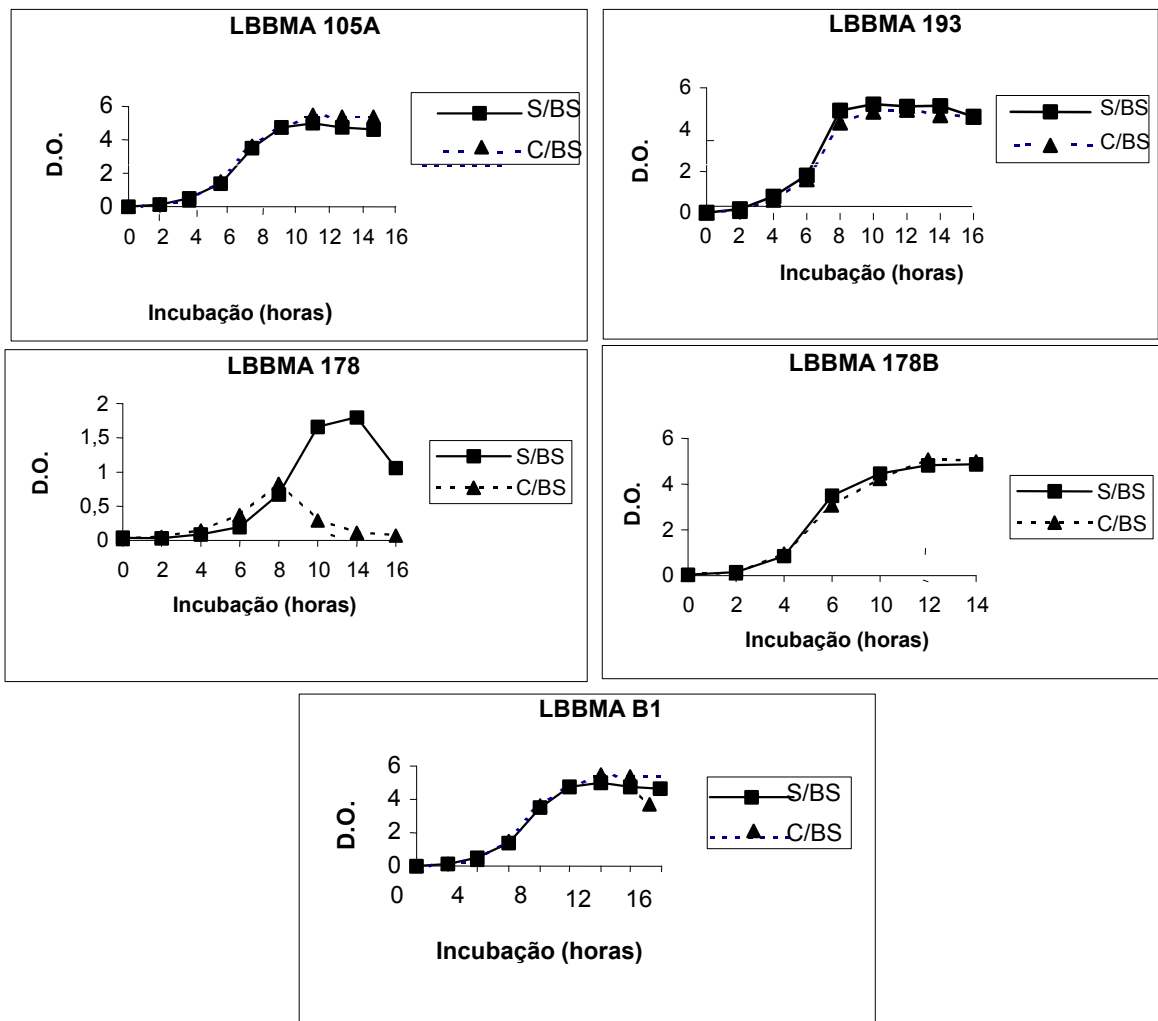


Figura 2 – Efeito do biossurfactante ramnolípido sobre o crescimento dos isolados LBBMA 105A, LBBMA 178, LBBMA 178B, LBBMA 193 e LBBMA B1. Os microrganismos foram inoculados em tubos de cultura contendo 4 mL de meio mineral NMP, acrescido de glicose a 2% (p/v) e do biossurfactante ramnolípido. O crescimento microbiano foi acompanhado por meio da leitura da densidade óptica a 600 nm.

4.4. Composição do consórcio microbiano empregado no ensaio de biorremediação de solo contaminado com gasolina comercial

A compatibilização dos resultados das avaliações anteriores levou à elaboração de um consórcio constituído de cinco isolados microbianos, com atributos considerados desejáveis para a biorremediação de solos contaminados com gasolina comercial (Tabela 14). Esses isolados foram identificados por meio da composição de ácidos graxos (FAME) como sendo pertencentes às espécies *Sphingomonas capsulata* (LBBMA 178b), *Pseudomonas balearica* (LBBMA 193), *P. aeruginosa* (LBBMA 53A), *Stenotrophomonas maltophilia* (LBBMA 105A), estando o isolado LBBMA B1 em vias de identificação. Empregando-se um sistema de injeção de ar em um aquífero contaminado com BTEX, Cavalca *et al.* (2003), conseguiram isolar bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Azoarcus*, *Bradyrhizobium*, *Microbacterium* e *Mycobacterium*. A capacidade de isolados da espécie *Stenotrophomonas maltophilia* em degradar hidrocarbonetos monoaromáticos também é relatada na literatura (Lee *et al.*, 2002). Não foram encontrados relatos na literatura de que isolados pertencentes às espécies *Sphingomonas capsulata* e *Pseudomonas balearica* são capazes de utilizar hidrocarbonetos monoaromáticos como fonte de carbono.

Tabela 14 – Características dos isolados microbianos selecionados para a composição do consórcio quanto ao crescimento em diferentes fontes de carbono e capacidade de produção de biossurfactantes

Isolado	G	C	B	T	X	Bios.
53A	-	+	-	-	-	+
105A	+	+	+	-	-	-
178B	-	+	-	-	-	+
193	+	-	+	+	+	-
B1	+	+	-	-	+	-

G = gasolina pura a 2% (v/v); C = gasolina comercial a 2% (v/v); B = benzeno a 1% (v/v); T = tolueno a 3% (v/v); X = xilenos a 6% (v/v) e Bios. = produção de biossurfactante.

4.5. Efeito de um composto liberador de oxigênio (CLO) sobre o crescimento microbiano

O composto liberador de oxigênio (CLO) adicionado ao meio de cultivo inibiu completamente o crescimento de todos os isolados constituintes do consórcio (Tabela 14). Esse efeito foi atribuído à elevação do pH do meio, provocada pela reação do MgO_2 em água e cujo produto é o $Mg(OH)_2$. Gallizia *et al.* (2004) também observaram aumentos significativos nos valores de pH em experimentos de bioestimulação de atividade enzimática em microcosmos de ambientes marinhos quando CLO (ORC[®]) foi adicionado. Desses resultados, infere-se que a utilização do MgO_2 , como forma de suprir oxigênio em processos de biorremediação, deve se restringir a ambientes caracterizados por uma elevada capacidade tampão de pH ou em situações onde essa variável possa ser controlada.

Tabela 15 – Crescimento de isolados bacterianos cultivados em meio mineral na presença de um composto liberador de oxigênio (CLO)¹

CLO	Isolados (LBBMA)					
	B1	53A	105A	178	178B	193
Presente	0,060 (0,03)	0,040 (0,02)	0,050 (0,01)	0,050 (0,02)	0,030 (0,002)	0,060 (0,006)
Ausente	0,562 (0,01)	0,431 (0,01)	0,310 (0,001)	0,730 (0,01)	0,708 (0,01)	0,672 (0,01)

¹ O crescimento microbiano foi avaliado por meio da densidade ótica a 600nm de culturas inoculadas em meio mineral suplementado com gasolina comercial adicionada de etanol a 25% (v/v) e MgO_2 a $30g L^{-1}$. A concentração de células no inóculo foi ajustada para se obter uma DO_{600} de 0,05 no início da incubação. As culturas foram incubadas durante 7 dias a $30^\circ C$ e 150 rpm. Os valores apresentados são a média de três repetições e os números entre parênteses indicam o desvio-padrão da média.

4.6. Biorremediação de solo contaminado com gasolina comercial em biorreatores

A degradação dos compostos benzeno, tolueno e *o*-xileno, nos tratamentos que não foram inoculados com o consórcio microbiano (Tratamentos 1 a 4 e 8 a 10), foi muito baixa ou inexistente (Tabela 16). Dentre esses tratamentos, os mesmos teores residuais de BTX foram detectados nos

tratamentos em que o solo não foi esterilizado (Tratamentos 1, 8 a 10). O resultado demonstra a presença de populações autóctones com algum potencial de degradação desses compostos. A presença de microrganismos com potencial fisiológico para degradar hidrocarbonetos de petróleo, incluindo os BTX, em subsolo é amplamente relatada (Cavalca *et al.*, 2000). Dentre os tratamentos em que se utilizam solo estéril e que não foram inoculados (Tratamentos 2, 3 e 4), obteve-se uma menor concentração dos BTX no tratamento 4. Essa redução foi resultante da aplicação de ventilação neste tratamento que propiciou perda dos compostos por volatilização.

A inoculação do solo com o consórcio microbiano propiciou maior degradação dos compostos BTX (Tratamentos 1x5, 8x11, 9x12 e 10x13; Tabela 16). Demonstra-se, com isso, que as populações autóctones do solo estudado são menos eficientes em degradar os BTX do que as estirpes constituintes do consórcio empregado no estudo. A inoculação do consórcio nos tratamentos que receberam aplicação de nutrientes minerais foi mais efetiva do que nos tratamentos correspondentes em que os nutrientes minerais foram omitidos (Tratamentos 11x5, 12x6 e 13x7). Enfatiza-se, com isso, que a degradação de hidrocarbonetos de petróleo em subsolos com escassez nutricional deverá ser limitada. Restrição nutricional à mineralização de hidrocarbonetos, em subsolo e em aquíferos, é bem documentada (Corseuil, 1994). Em biorreatores, justifica-se a otimização dos fatores nutricionais, visando maximizar a eficiência de degradação, de modo que testes de tratabilidade constituem etapa obrigatória do projeto.

A aplicação de compostos liberadores de oxigênio (ORC[®]) não resultou em ganhos de eficiência de degradação dos BTX (Tratamentos 3x2 e 12x11; Tabela 17). Esse resultado é atribuído a inibição do crescimento microbiano provocado pela elevação do pH na presença do composto (Tabela 15). No experimento em biorreator, o pH nos tratamentos com ORC[®] situou-se entre 8,4 e 9,1, ao passo que nos tratamentos correspondentes, sem ORC[®], o pH situou-se próximo a 7,0.

O uso da ventilação, juntamente com a inoculação do consórcio bacteriano, favoreceu a degradação dos BTX (Tabela 16). No tratamento com omissão de nutrientes minerais (Tabela 16), o maior ganho foi na degradação do *o*-xileno. Comparativamente ao seu controle (Tratamento 5), a redução de

xileno, atribuída a ventilação, foi de 49%. Contudo, a contribuição da ventilação para a degradação de benzeno e tolueno foi de apenas 21%. Nos tratamentos onde nutrientes minerais foram fornecidos, a ventilação teve uma contribuição mais significativa, especialmente para a degradação do benzeno e do tolueno (Tratamentos 11 e 13; Tabela 16). A redução do teor de benzeno no tratamento com ventilação (Tratamento 13), comparativamente ao controle (Tratamento 11), foi de 74%. Inversamente ao ocorrido nos tratamentos onde os nutrientes minerais foram omitidos, a menor redução atribuída à ventilação foi do *o*-xileno, embora tenha sido ainda de 59%. Os dados indicam que as populações microbianas envolvidas na degradação de benzeno e tolueno, nas condições experimentais utilizadas, são mais exigentes em nutrientes minerais do que as envolvidas na degradação de *o*-xileno.

Tabela 16 – Concentração residual (mg L⁻¹) de benzeno, tolueno e *o*-xileno em amostras de *slurries* de solo contaminados com gasolina submetidos a tratamentos de biorremediação.

Tratamentos	E	Meio	O ₂	Inoc.	Benzeno	Tolueno	Xileno(-o)
1	-	H ₂ O	-	-	5,476 b	2,737 bc	0,996 b
2	+	H ₂ O	-	-	6,734 a	3,281 a	1,079 a
3	+	H ₂ O	CLO	-	6,760 a	3,204 a	1,039 ab
4	+	H ₂ O	Vent.	-	5,861 b	2,893 b	0,919 c
5	+	H ₂ O	-	+	2,176 e	1,334 e	0,453 e
6	+	H ₂ O	CLO	+	2,021 ef	1,286 ef	0,390 e
7	+	MM	Vent.	+	1,712 fg	1,053 f	0,230 f
8	+	MM	-	-	4,410 c	2,039 cd	0,586 d
9	+	MM	CLO	-	3,981 c	1,992 d	0,591 d
10	+	MM	Vent.	-	3,466 d	1,743 e	0,419 e
11	+	MM	-	+	1,334 gh	0,698 g	0,298 f
12	+	MM	CLO	+	1,216 h	0,689 g	0,240 f
13	+	MM	Vent.	+	0,344 i	0,144 h	0,123 g

E-Corresponde a solo esterilizado; H₂O=slurry produzido pela mistura de solo e água destilada (0,1:0,3 p/v); MM=slurry obtido pela mistura de solo e meio mineral NMP; CLO=aplicação de composto liberador de oxigênio (ORC®); Vent.=aplicação de aeração forçada.

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Dentre todos os tratamentos avaliados, o tratamento 10 (Tabelas 7 e 16) mostrou-se o mais eficaz, favorecendo a maior redução nos níveis de benzeno e tolueno, alcançando valores bem próximos àqueles estabelecidos pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (Conama), como toleráveis no quesito potabilidade da água (Conama, 2002).

5. CONCLUSÕES

De um total de 52 isolados bacterianos provenientes de meios de enriquecimento com gasolina, 16 demonstraram crescimento satisfatório em gasolina pura e 10 cresceram utilizando gasolina comercial como única fonte de carbono.

Os isolados *Pseudomonas aeruginosa* 53A e *Pseudomonas* sp. 178 são eficazes na produção de biossurfactantes utilizando gasolina adicionada de etanol como única fonte de carbono.

O composto liberador de oxigênio MgO_2 inibe completamente o crescimento dos isolados bacterianos *Stenotrophomonas maltophilia* 105A, *Sphingomonas capsulata* 178b, *Pseudomonas balearica* 193, *Pseudomonas aeruginosa* 53A e *Pseudomonas* sp. em meio de cultura.

O consórcio microbiano selecionado para inoculação em biorreatores propiciou aumento da degradação dos compostos monoaromáticos BTX e dos demais hidrocarbonetos constituintes da gasolina comercial brasileira.

Em biorreatores, o suprimento de oxigênio por meio de um composto liberador de oxigênio não propiciou aumento da degradação de hidrocarbonetos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, P. J. J. Efeitos do etanol na atenuação natural de BTEX: Implicações Micro e Macroscópicas. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE BIORREMEDIAÇÃO IN-SITU DE SITES CONTAMINADOS. São Paulo: Instituto Ekos Brasil. Disponível em: <<http://www.ekosbrasil.org/Seminários>>. Acesso em: 20 Jun. 2004.

ANP – Agência Nacional de Petróleo, 2002. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 21 Mar. 2002.

ARIENZO, M. Degradation of 2,4,6 – trinitrotoluene in water and soil slurry utilizing a calcium peroxide compound. *Chemosphere* v. 40, p. 331-337, 2000.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. *Ecology microbial: Fundamentals and applications*. 4. ed. Addison–Wesley Publishing, 1998.

BANAT, I. M. Biosurfactant production and possible use in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*, v. 51, p.1-12, 1995.

BANAT, I. M.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BARNEJEE, S. Biosurfactants production and use in oil tank clean-up. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 7, p. 80-88, 1991.

BARKER, J.F., HUBBARD, C.E., LEMON, L.A. The Influence of Methanol and MTBE on the Fate and Persistence of Monoaromatic Hydrocarbons in Groundwater. Proceedings of the NWWA/API Conference on Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Ground Water: Prevention, Detection, and Restoration. Houston, TX, October 31 November 2, p.13,1990.

BIANCHI-MOSQUERA, G. C.; ALLEN-KING, R. M.; MACKAY, D. M. Enhanced degradation of dissolved benzene and toluene using a solid oxygen-releasing compound. *Groundwater Monitoring Rev.* v. 14, p. 120-128, 1994.

BIO. *Revista Brasileira de Saneamento e Meio Ambiente*, ano XI, n. 22, p. 24, 2002.

BRAGG, J. R.; PRINCE, R. C.; HARNER, E. J.; ATLAS, R. M. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature*, v. 368, p. 413-418, 1994.

BREEDVELD, G. D.; SPARREVIK, M. Nutrient limited biodegradation of PAH in various strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation*, v. 11, p. 391-399, 2000.

BROWN, L. R. *Revista Águaonline*. Edição 230. Disponível em: <<http://www.aguaonline.com.br/materias>>. Acesso em: 17 Mar. 2003.

CAMEOTRA, S. S. e MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 50, p. 520-529, 1998..

CAVALCA, L.; GENNARO, P. D.; COLOMBO, M.; VINSENZA A.; BERNASCONI, S. Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil. *Research in Microbiology*, v. 151, p. 877-887, 2000.

CERNIGLIA, C. E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology*, v. 20, p. 31-71, 1984.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. *Relatório de qualidade das águas subterrâneas do Estado de São Paulo, 2001-2003*. Vol. 1. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 22 Abr. 2003.

CLELAND, D. D.; SMITH, V. H.; GRAHAM, D. W. Microbial population dynamics during hydrocarbons biodegradation under variable nutrient conditions. *In Situ and On Site Bioremediation*, v. 4, p.105-110, 1997.

CONAMA. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/Legislação/Resolução/2000>>. Acesso em: 23 Set. 2002.

COOKSON JR., J. T. *Biorremediation engineering*. Design and Application, New York: McGraw-Hill, 1995, 524 p.

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

CORSEUIL, H. X.; AIRES, J. R.; ALVAREZ, P. J. J. Implications of the presence of ethanol on intrinsic bioremediation of btx plumes in Brazil. *Hazardous Waste and Hazardous Materials*, v. 13, n. 2, p. 213-221, 1996.

COSTURA, R. K.; ALVAREZ, P. J. *Water Res.*, v. 34, p. 3014, 2000.

CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 1-10, 2000.

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

EPA – Environmental Protection Agency. Disponível em: <<http://www.epa.com>>. Acesso em: 12 Fev. 2003.

FAVA, F.; DI GIOIA, D.; MARCHETTI, L. Role of reactor configuration in the biological detoxification of a dump site-polychlorobiphenyl-contaminated soil in lab-scale slurry phase conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 53, n. 2, p. 243-248, 2000.

FEAM. Disponível em: <[http://www.feam.br/Feam_interativa/Publicações/Agenda Marrom Indicadores Ambientais](http://www.feam.br/Feam_interativa/Publicações/Agenda_Marrom_Indicadores_Ambientais)>. Acesso em: 25 Jul. 2003.

FERNANDES, M. *Atenuação natural da contaminação de aquífero submetido a derramamento de gasolina*. 2002. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

FERNANDES, M. *Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos monoaromáticos em aquíferos contaminados com gasolina*. 1997. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

FINOTTI, A. R.; CORSEUIL, H. X. Uso da ação corretiva baseada no risco – RBCA – Nos casos de contaminação de solos e águas subterrâneas por gasolina no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19, Foz do Iguaçu-PR, 1997. *Anais...* Foz do Iguaçu-PR, 1997. CD-ROM.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE – Funasa. *Manual de construção de poços tubulares profundos*. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em: 24 Out. 2002.

GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 54, p. 61-67, 2004.

GIBSON, DAVID T.; BROUSSEAU, R.; LAU, PETER C.K., BERGERON, H.; LABBÉ, D.; WANG, YING. Sequence and expression of the *todGIH* genes involved in the last three steps of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *Gene*, v.146, p.7-13, 1994.

GUERRA-SANTOS, L.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 48, p. 301-305, 1984.

HATTA, T.; SHIMADA, T.; YOSHIHARA, T. Meta-fission product hydrolases from a strong PCB degrader *Rhodococcus* sp. RHA 1. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.85, p.174-179, 1988.

HUNT, S. CRAIG; ALVAREZ, J. J. PEDRO; CORSEUIL, H. X. Effect of Ethanol on Aerobic BTX Biodegradation. In: Battelle Fourth International Conference, 1997, New Orleans - EUA. Battelle Fourth International Conference. v.1. p.49-54,1997.

JIANG, J. S.; VONE, L. M.; SIKDAR, S. K. *J. Membr. Sci.*, v. 136, p. 233, 1997.

JUHASZ, A. L.; NAIDU, R. Biorremediation of high molecular weigh polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of microbial degradation of benzo[a]pirene. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 45, p. 57-88, 2000.

KAIPPER, B. I. A. *Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel*. 2003. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

KAO, C. M.; CHEN, S. C.; LIU, J. K.; WANG, Y. S. Application of microbial enumeration technique to evaluate the occurrence of natural bioremediation. *Water Research*, v. 35, p. 1951-1960, 2001.

KASUMI, J.; CALDWELL, M. E.; SUFLITA, J. M. Anaerobic Degradation of Benzene in Diverse Anoxic Environments. *Environmental Science and Technology*, v. 31, 1997.

LANG, S. *Biological amphiphiles (microbial biosurfactants)*. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2002.

LEE, E. Y.; JUN, Y. S.; CHO, K. S. Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. *Air and Waste Manage Assoc.*, v. 52, p. 400-406.

LIMA, T. M. S. *Produção de biossurfactantes visando ao tratamento de borra oleosa*. 2003. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

MACKAY, D.; CHERRY, J. A. Groundwater contamination: pump-and-treat remediation. *Environmental Science and Technology*, v. 23, n. 6, p. 630-636, 1989.

MANZOCHI, C. *Ciência Hoje*, v. 29, p. 40, 2001.

MARGESIN and SCHINNER. *Applied Microbiology Biotechnol.*, v. 47, p. 462-468, 1998.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SHINNER, P. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, v. 40, p. 339-346, 2000.

NARDI, I. R.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic packed-bed reactor for biorremediation of gasoline-contaminated aquifers. *Process Biochemistry*, 2004.

NICHOLSON, C. A.; FATHEPURE, B. Z. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 72, p. 1222-1225, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactants: properties and applications. *Quim. Nova*, v. 25, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA, V. B. *Bactérias para recuperação avançada de petróleo*. 2004. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

POULSEN, M.; LEMON, L.; BARKER, J. F. Dissolution of monoaromatic hydrocarbons into groundwater from gasoline oxygenated mixtures. *Environ. Sci. Technol.*, v. 26, p. 2483-2489, 1992.

POWERS, SUSAN E.; HUNT, CRAIG S.; HEERMANN, STEPHEN E.; CORSEUIL, HENRY X.; RICE, DAVID. *The transport and fate of ethanol and btex in groundwater contaminated by gasohol*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, v.31, p.79-123, 2001.

RAHMAN, K. S. M.; BANAT, I. M.; THAHIRA, J. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology*, v. 81, p. 25-32, 2002.

REASONER and GELDREICH. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 49, n. 1, p. 1-7, 1985.

REGENESIS. Disponível em: <<http://www.regenesis.com/Products/ORC/> /Publication List>. Acesso em: 26 Maio 2004.

ROBERTS, E., Remediation of petroleum contaminated soils, Lewis Publishers, Washington, DC, pp. 1–113, 1998.

SCHACHT, O.; AJIBO, K. *Soil bioremediation; in situ vs ex situ*. (Costs, Benefits and Effects). WSP and Goteborg Energi, 2002.

SCHREIBER, M. E.; BAHR, J. M. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX-contaminated groundwater: parameter estimation from natural-gradient tracer experiments. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 55, p. 29-56, 2002.

SERRANO, A.; GALEGO, M. Direct screening and confirmation of benzene, toluene and ethylbenzene and xylenes in water. *Journal of Chromatography*, v. 1045, p. 181-188, 2004.

SHIANETZ, B. *Passivos ambientais*. Cap. 3. SENAI/ABES: Curitiba, 1999.

SHIM, H.; YANG, C. T. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene cocultured by a *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in fibrous-bed bioreactor. *Journal of Biotechnology*, v. 67, p. 99-112, 1999.

SHINODA, YOSHIFUMI; SAKAI, Y.; UENISHI, H.; UCHIHASHI, Y. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1385-1392, 2004.

SILVA, E. F.; MAINIER, F. B. Contaminações ambientais provocadas pelo benzeno existente na gasolina automotiva. *Revista Transpetro*, Tema: Gestão Social e Ambiental, v. 5, p. 54, 2002.

TIBURTIUS, E. R. L.; ZAMORA, P. P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas subterrâneas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*, v.27, p. 441-446, 2004.

URURAHY, A. F. P.; PEREIRA, N.; MARINS, M. D. M. Desempenho de um biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de borra oleosa. *Boletim Técnico Petrobrás*, v. 41, p. 125-132, 1998.

VON WEDEL, R. J.; MOSQUERA, J. F.; GOLDSMITH, C. D.; HATER, G.R.; WONG, A.; FOX T. A.; HUNT, W. T.; PAULIES, M. S.; QUIROS, J. M.; WEIGAND, J. W. Bacterial biodegradation of petroleum hydrocarbons in ground water: in situ augmented bioreclamation with enrichment isolates in california. *Water Science and Technology*, v. 20, p. 501-503, 1988.

WATTS, R. J.; HALLER, D. R.; JONES, A. P.; TELL, A. L. *J. Hazard. Mater.* v. 76, p. 73, 2000.

ZAPPI, M. E.; ROGERS, B. A.; TEETER, C. L.; GUNNISON, D.; BAJPAI, R. Bioslurry treatment of a soil contaminated with low concentrations of total petroleum hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, v. 46, p. 1-12, 1996.