Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Tese de Doutorado

Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel

Sandro José Baptista

Orientadoras:

Profª Denize Dias de Carvalho, D.Sc.

Profª Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Julho de 2007

AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE BIOSSURFACTANTE NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM ÓLEO DIESEL

Sandro José Baptista

Tese submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado por:

_____
Denize Dias de Carvalho, D.Sc.
(orientadora – presidente da banca)

_____
Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.
(orientadora)

_____
Geraldo Lippel Sant'Anna Jr., Dr. Ing.

_____
Lídia Yokoyama, D.Sc.

_____
Maria Claudia Barbosa, D. Sc.

_____
Paulo Negrais Carneiro Seabra, D.Sc.

_____
Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Julho de 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Baptista, Sandro José

Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel / Sandro José Baptista. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2007.

xv, 146p.; il.

Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2007.

Orientador(es): Denize Dias de Carvalho e Eliana Flávia Camporese Sérvulo.

1. Biodegradação. 2. Biossurfactante. 3. Óleo diesel. 4. Tese (Doutorado – UFRJ/EQ). 5. Denize Dias de Carvalho e Eliana Flávia Camporese Sérvulo.

I. Título.

Se cheguei até aqui, é porque estive protegido por uma força maior.

Se cheguei até aqui, havia alguém muito especial que me apoiou nos principais momentos de minha vida.

Se cheguei até aqui, é porque tive anjos que me orientaram nesta jornada chamada vida.

Nada disso seria possível sem a permissão de Deus que escolheu o ventre de minha mãe para eu nascer, a família a qual eu amo e os dois anjos (Professoras Denize e Eliana Flávia) que tornaram possível a realização deste trabalho.

Sandro J. Baptista

Dedico este trabalho a quem sempre me incentivou ao longo de minha vida.

É o exemplo de perseverança, amor e fortaleza.

A minha querida Mãe.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, todo-poderoso, que me unge e me guia todos os dias desta minha caminhada. Ele que revigora a cada dia a chama de minha fé e é a força espiritual a quem sempre recorro.
- A minha querida Mãe, a quem tanto amo. Sendo sempre a rocha-base de minha família.
- Ao meu irmão Jayr e às minhas irmãs Yara, Vera Lúcia e Shirley pelos momentos agradáveis que compartilhamos e pelos estímulos que me deram.
- Aos meus sobrinhos e às minhas sobrinhas.
- Ao CNPq que apoiou incondicionalmente esse trabalho.
- Às orientadoras Profª Denize Dias de Carvalho e a Profª Eliana Flávia Camporesi Sérvulo que muito contribuíram na orientação deste trabalho. Às professoras que estimularam o meu crescimento na pesquisa e pela sincera amizade de todos os dias.
- À Escola de Química por conceder as suas instalações para a condução dos experimentos deste trabalho.
- A Sílvio Tavares que forneceu os solos para a realização dos experimentos.
- Às amigas Cristina Lima, Danielle Pala e Lygia Azevedo pelas palavras de afeto e amizade.
- Aos companheiros do Laboratório de Tecnologia Ambiental pelos momentos agradáveis: Alessandra, Alexandre, Ana Cristina, Ana Isabel, Angélica, Daniela Rosa, Débora, Ednéia, Juliana Labre, Kally, Larissa, Nina Kátia, Rafaele, Suzana.

Resumo da Tese de Doutorado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE BIOSSURFACTANTE NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM ÓLEO DIESEL

Sandro José Baptista

Julho, 2007

Orientadores: Profª Denize Dias de Carvalho, D.Sc.

Profª Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

A biorremediação é um processo de tratamento que emprega microrganismos capazes de degradar compostos complexos em outros mais simples, podendo ocorrer sob condições aeróbia e anaeróbia. Contudo, para potencializar a biodegradação do contaminante, pode-se empregar biossurfactante para aumentar a sua disponibilidade aos microrganismos do solo. O objetivo desta tese é avaliar a biodegradação de óleo diesel em solos com características argilosa e arenosa, sob condição aeróbia e anaeróbia, empregando-se biossurfactante (ramnolipídeo) visando potencializar o processo de biorremediação. Para tal propósito foi feito um planejamento experimental fatorial fatorial $\mathbf{2^k}$, cujas variáveis independentes avaliadas foram teor de fertilizante (4N:14P:8K), teor de biossurfactante e tempo, sendo a variável de resposta o percentual de remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo. Os experimentos foram conduzidos em biorreatores de coluna com 400g de solo contaminado com óleo diesel (5% v/m) e adicionou-se ao solo 10% (m/m) de um inóculo previamente adaptado visando aumentar a população de bactérias degradadoras de óleo. Nos experimentos realizados, quando se adicionou de biossurfactante, os percentuais de remoção de TPH oscilaram entre 53% e 67%, em solo argiloso, e 13% e 35%, em solo arenoso. Contudo, esses percentuais de remoção de TPH variaram entre 63% e 76%, em solo argiloso e estes valores ficaram abaixo de 30%, em solo arenoso, quando se empregou fertilizante. Nos experimentos cujo emprego combinado de biossurfactante e fertilizante, as eficiências de remoção de TPH variaram entre 66% e 80%, em solos argilosos, e 33% e 61%, em solo arenoso.

Abstract of a Thesis presented to Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ-UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science.

EVALUATION OF THE USE OF BIOSURFACTANT IN THE BIOREMEDIATION OF DIESEL OIL CONTAMINATED SOIL.

Sandro José Baptista

July, 2007

Supervisors: Prof. Denize Dias de Carvalho, D.Sc.
Prof. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Bioremediation is a technique currently used for the treatment of oil-contaminated soils. However, the biodegradation rate of a determined contaminant in soil depends on its bioavailability which, in turn, is influenced by phenomena such as desorption and dissolution. One possibility favoring the hydrocarbon microbial attack is the use of biosurfactant, due to its capacity of emulsification. The main aim of the present work was to evaluate the use of a commercial biosurfactant (rhamnolipid) and fertilizer (4N:14P:8K) in the aerobic and anaerobic biodegradation of diesel oil that was disposed of in a clay soil and sand soil. The experiments were held in a fixed bed reactor containing 400 g of oil-contaminated soil and 10% (w/w) of an inoculum was added to the contaminated soil in order to increase the microbial population. An experimental design with two-level factor (2^k) was performed to set up the best conditions to allow for the removal of total petroleum hydrocarbon (TPH). The independent variables studied were fertilizer content, biosurfactant content and time, and the response variable was TPH removal efficiency. In all experiments, the TPH removal efficiency in clay soil was around 53% and 67%, and in the sandy soil was 13% and 35%. However, these values were 63% and 76%, in clay soil, and below 30%, in sandy soil, when the fertilizer was added. The interaction between biosurfactant effect and fertilizer effect in the TPH removal efficiencies resulted values around 66% and 80%, in clay soil, and 33% and 61%, in sandy soil.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **xi**

ÍNDICE DE TABELAS ..... **xiv**

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO **1**

1.1 Considerações Gerais 1
1.2 Objetivos 3
1.2.1 Objetivo Geral 3
1.2.2 Objetivos Específicos 3

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **4**

2.1 O Petróleo e o Óleo Diesel 4
2.1.1 O Petróleo 4
2.1.2 O Óleo Diesel 6
2.2 O Solo 8
2.2.1 Origem 8
2.2.2 Constituição do Solo 10
2.2.3 Textura e Estrutura do Solo 12
2.2.4 Fertilidade do Solo 15
2.2.4.1 Nitrogênio 15
2.2.4.2 Fósforo 16
2.2.5 Microrganismos do Solo 17
2.2.6 Comportamento do Óleo no Solo 19
2.4 Biorremediação 21
2.4.1 Definição 21
2.4.2 Fatores que Influenciam a Biorremediação 23
2.4.2.1 Propriedades Físico-químicas do Óleo 23
2.4.2.2 Teor de Umidade do Solo 24
2.4.2.3 Aceptores de Elétrons 25
2.4.2.4 Teor de Nutrientes 26
2.4.2.5 Temperatura 27
2.4.2.6 pH 28
2.4.2.7 Densidade de Microrganismos Degradadores de Óleo 29
2.4.2.8 Biodisponibilidade do Contaminante 30
2.5 Surfactantes e Biossurfactantes 32
2.5.1 Surfactantes 32
2.5.1.1 Definições e Conceitos Básicos 32
2.5.1.2 Principais Propriedades 35
2.5.1.3 Concentração Micelar Crítica 37
2.5.1.4 Aplicação de Surfactantes na Biorremediação 39
2.5.1.5 Critério de Seleção de Surfactantes 43
2.5.2 Biossurfactantes 45
2.5.2.1 Definições e Conceitos Básicos 45
2.5.2.2 Classes de Biossurfactantes 46
2.5.2.3 Principais Propriedades 50
2.5.2.4 Produção de Biossurfactantes 52
2.5.2.5 Parâmetros Físico-Químicos 53
2.5.2.6 Aplicação de Biossurfactantes na Biorremediação 54

2.6 Vantagens e Desvantagens Quanto ao Emprego de Surfactantes e Biossurfactantes na Biorremediação 57
2.7 Toxicidade de Surfactantes e Biossurfactantes 58
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS 60
3.1 Metodologias 60
3.1.1 Teor de Matéria Orgânica 60
3.1.2 Teor de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH) 61
3.1.3 Teor de Nitrogênio Total 62
3.1.4 Teor de Fósforo Total 62
3.1.5 pH 63
3.1.6 Teor de Umidade Total 64
3.1.7 Capacidade de Retenção de Água 64
3.1.8 Densidade Celular 65
3.1.8.1 Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias 65
3.1.8.2 Bactérias Hidrocarbonoclásticas 66
3.1.8.3 Bactérias Heterotróficas Totais Anaeróbias 66
3.1.9 Teste de Biodegradabilidade e de Ecotoxicidade do Biossurfactante 67
3.1.9.1 Teste de Biodegradabilidade Imediata 67
3.1.9.2 Teste de Mortalidade de Minhocas 68
3.1.9.3 Determinação da Atividade Desidrogenásica 69
3.2 Procedimento Experimental 71
3.2.1 Caracterização do Solo Virgem 71
3.2.2 Caracterização do Biossurfactante 72
3.2.3 Desenvolvimento de Inóculos em Fase Sólida 73
3.2.3.1 Desenvolvimento de Inóculo sob Condição Aeróbia 74
3.2.3.2 Desenvolvimento de Inóculo sob Condição Anaeróbia 75
3.2.4 Biorremediação Aeróbia dos Solos Argiloso e Arenoso 76
3.2.4.1 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Argiloso 76
3.2.4.2 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Arenoso 79
3.2.4.3 Planejamento Fatorial 2^2 dos Experimentos Realizados com Solo Arenoso 81
3.2.5 Biorremediação Anaeróbia dos Solos Argiloso e Arenoso 82
3.2.5.1 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Argiloso 82
3.2.5.2 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Arenoso 84
3.2.6 Experimentos de Controle Biótico 85
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO 86
4.1 Caracterização dos Solos 86
4.2 Caracterização do Biossurfactante Empregado 88
4.2.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica do Biossurfactante 88
4.2.2 Avaliação da Biodegradabilidade e da Ecotoxicidade do Biossurfactante 90
4.3 Caracterização do Inóculo em Fase Sólida sob Condição Aeróbia e Anaeróbia 93
4.4 Biorremediação Aeróbia 96
4.4.1 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Argiloso sob Condição Aeróbia 96

4.4.2 Planejamento Fatorial dos Experimentos Realizados com Solo Arenoso sob Condição Aeróbia 103
4.4.2.1 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Arenoso sob Condição Aeróbia 103
4.4.2.2 Planejamento Fatorial 2^2 dos Experimentos Realizados com Solo Arenoso sob Condição Aeróbia 107
4.5 Biorremediação Anaeróbia 114
4.5.1 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Argiloso sob Condição Anaeróbia 114
4.5.2 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Arenoso sob Condição Anaeróbia 121
4.6 Comparação do Desempenho do Processo em Condição Aeróbia e Anaeróbia 127
4.6.1 Comparação do Desempenho do Biossurfactante em Solo Argiloso 127
4.6.2 Comparação do Desempenho do Biossurfactante em Solo Arenoso 129
4.6.3 Comparação do Desempenho do Biossurfactante em Solos Argiloso e Arenoso em Condição Aeróbia 131
4.6.4 Comparação do Desempenho do Biossurfactante em Solos Argiloso e Arenoso em Condição Anaeróbia 132
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES 134
CAPÍTULO 6: SUGESTÕES 136
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA 137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Frações que Podem Ser Obtidas Durante o Refino do Petróleo 6
Figura 2: Horizontes do Perfil de Solo – Características e Implicações 10
Figura 3: Diagrama de Textura Adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo 12
Figura 4: Representação Esquemática de Três Zonas de Saturação e do Comportamento do Óleo no Solo 19
Figura 5: Representação de uma Molécula de Surfactante e uma Micela. 33
Figura 6: Representação Gráfica da Variação da Solubilidade, Tensão Superficial e Interfacial em Função da Concentração do Surfactante 34
Figura 7: Formação de Micela em uma Fase DNAPL. 36
Figura 8: Representação Gráfica do Comportamento da Fase quando DNAPL e a Solução de Surfactantes Encontram-se Misturadas. 41
Figura 9: Estrutura de Alguns Biossurfactantes Glicolipídeos. 47
Figura 10: Estrutura do Emulsan Produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*..... 49
Figura 11: Estrutura de Surfactina Lipopeptídeo Cíclico Produzido por *Bacillus subtilis*..... 49
Figura 12: Recipientes de Vidro Empregados no Teste de Mortalidade de Minhocas. 69
Figura 13: Teste de Atividade Desidrogenásica – Coloração da Amostra após a Filtração 70
Figura 14: Estrutura Molecular dos Principais Ramnolipídeos Presentes na Solução do Biossurfactante 72
Figura 15: Representação Esquemática da Medição da Tensão Superficial de um Líquido pelo Método do Anel *Du Nouy* 73
Figura 16: Inóculo Aeróbio em Leito (20x30x5 cm). 74
Figura 17: Inóculo Anaeróbio em Leito (20x30x5 cm). 75
Figura 18: Representação Esquemática do Biorreator Aeróbio de Leito Fixo Empregado no Planejamento Experimental. 77
Figura 19: Biorreatores Aeróbios de Leito Fixo Empregados no Planejamento Experimental..... 77
Figura 20: Representação Esquemática do Biorreator Anaeróbio de Leito Fixo Empregado no Planejamento Experimental. 82
Figura 21: Medição da Tensão Superficial da Água em Presença do Biossurfactante em Diferentes Condições de Ensaios (Biossurfactante (◆), Biossurfactante/Solo Argiloso (■) e Biossurfactante/Solo Arenoso (●)). 88
Figura 22: Variação do Percentual de Biossurfactante Degradado em Função do Tempo. 90
Figura 23: Teste da Atividade Desidrogenásica em Diferentes Concentrações de Biossurfactante. 92
Figura 24: Diagrama de Pareto do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH. 97
Figura 25: Gráfico das Médias Marginais do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH. 98
Figura 26: Gráfico de Superfície de Resposta do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH..... 99
Figura 27: População de Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias (BHT) Quantificada Durante o Planejamento Experimental nas Diferentes Condições Avaliadas no Solo Argiloso. 100

Figura 28: População de Bactérias Hidrocarbonoclásticas Aeróbias (BHc) Quantificada Durante o Planejamento Experimental nas Diferentes Condições Avaliadas no Solo Argiloso. 101
Figura 29: Monitoramento do pH Inicial e pH Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Argiloso sob Condição Aeróbia. 102
Figura 30: População de Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias (BHT) Quantificada Durante o Planejamento Experimental nas Diferentes Condições Avaliadas no Solo Arenoso. 105
Figura 31: População de Bactérias Hidrocarbonoclásticas Aeróbias (BHc) Quantificada Durante o Planejamento Experimental nas Diferentes Condições Avaliadas no Solo Arenoso. 106
Figura 32: Monitoramento do pH Inicial e pH Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Arenoso 107
Figura 33: Diagrama de Pareto do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH. 109
Figura 34: Gráfico das Médias Marginais do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH. 109
Figura 35: Gráfico de Superfície de Resposta do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH. 110
Figura 36: População de Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias (BHT) Quantificada Durante o Planejamento Experimental nas Diferentes Condições Avaliadas no Solo Arenoso. 111
Figura 37: População de Bactérias Hidrocarbonoclásticas Aeróbias (BHc) Quantificada Durante o Planejamento Experimental nas Diferentes Condições Avaliadas no Solo Arenoso. 112
Figura 38: Monitoramento do pH Inicial e pH Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Arenoso. 113
Figura 39: Diagrama de Pareto do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso sob Condição Anaeróbia cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH. 116
Figura 40: Gráfico das Médias Marginais do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH. 116
Figura 41: Gráfico de Superfície de Resposta do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso sob Condição Anaeróbia cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH. 117
Figura 42: População de Bactérias Heterotróficas Totais Anaeróbias (BAN) Quantificada no Início e no Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Argiloso. 119
Figura 43: Monitoramento do pH Inicial e pH Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Argiloso. 120
Figura 44: Diagrama de Pareto do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso sob Condição Anaeróbia cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH. 122
Figura 45: Gráfico das Médias Marginais do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH. 123
Figura 46: Gráfico de Superfície de Resposta do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso sob Condição Anaeróbia cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH. 124
Figura 47: População de Bactérias Heterotróficas Totais Anaeróbias (BAN) Quantificada no Início e no Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Arenoso. 125

Figura 48: Monitoramento do pH Inicial e pH Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Arenoso. 126
Figura 49: Comparação do Desempenho do Emprego do Fertilizante (BIO/F) e/ou Biossurfactante (BIO/B) no Solo Argiloso sob Condição Aeróbia e Anaeróbia. 128
Figura 50: Comparação do Desempenho do Emprego do Fertilizante (BIO/F) e/ou Biossurfactante (BIO/B) no Solo Arenoso sob Condição Aeróbia e Anaeróbia.. 129
Figura 51: Comparação do Desempenho do Emprego do Fertilizante (BIO/F) e/ou do Biossurfactante (BIO/B) entre os Solos Argiloso e Arenoso sob Condição Aeróbia. 131
Figura 52: Comparação do Desempenho do Emprego do Fertilizante (BIO/F) e/ou do Biossurfactante (BIO/B) entre os Solos Argiloso e Arenoso sob Condição Anaeróbia..... 133

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição Química de um Petróleo 4
Tabela 2: Classificação do Petróleo 5
Tabela 3: Fatores de Formação de Solos 9
Tabela 4: Caracterização da Areia, Silte e Argila 13
Tabela 5: Fatores que Afetam a Formação de Agregados..... 14
Tabela 6: Os Mecanismos Microbianos no Solo..... 18
Tabela 7: Vantagens e Desvantagens das Técnicas de Biorremediação *In Situ* e *Ex Situ* 21
Tabela 8: Relação entre a Forma de Respiração Microbiana, Aceptores de Elétrons e Potencial Redox..... 25
Tabela 9: Exemplos de Quatro Categorias de Surfactantes..... 34
Tabela 10: Fatores que Influenciam a Concentração Micelar Crítica em Meio Aquoso 38
Tabela 11: Três Tipos de Comportamento de Fase quando DNAPL e a Solução de Surfactantes Encontram-se Misturadas 40
Tabela 12: Classificação e Origem de Biossurfactantes..... 48
Tabela 13: Influência de Glicolipídeos na Redução da Tensão Superficial da Água e da Tensão Interfacial do Sistema Água/n-Hexadecano..... 51
Tabela 14: Comparação dos Custos entre Surfactantes Biológicos e Químicos..... 58
Tabela 15: Composição do Meio TSA (DIFCO^{TM}) 65
Tabela 16: Composição do Meio Mineral *Bushnell Haas* 66
Tabela 17: Composição da Solução Redutora..... 67
Tabela 18: Metodologias Empregadas na Caracterização dos Solos 71
Tabela 19: Metodologias Empregadas na Caracterização do Biossurfactante..... 73
Tabela 20: Variáveis Independentes e seus Respectivos Níveis Empregados no Planejamento Experimental 2^3 sob Condição Aeróbia..... 78
Tabela 21: Matriz do Planejamento Experimental 2^3 para o Solo Argiloso sob Condição Aeróbia 78
Tabela 22: Composição do Fertilizante Comercial Empregado nos Experimentos..... 79
Tabela 23: Variáveis Independentes e seus Respectivos Níveis Empregados no Planejamento Experimental 2^3 sob Condição Aeróbia..... 80
Tabela 24: Matriz do Planejamento Experimental 2^3 para o Solo Arenoso sob Condição Aeróbia 80
Tabela 25: Matriz do Planejamento Experimental 2^2 para o Solo Arenoso sob Condição Aeróbia 81
Tabela 26: Variáveis Independentes e seus Respectivos Níveis Empregados no Planejamento Experimental sob Condição Anaeróbia 83
Tabela 27: Matriz do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso sob Condição Anaeróbia..... 83
Tabela 28: Variáveis Independentes e seus Respectivos Níveis Empregados no Planejamento Experimental sob Condição Anaeróbia 84
Tabela 29: Matriz do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso sob Condição Anaeróbia..... 84
Tabela 30: Caracterização dos Solos Arenoso e Argiloso 86
Tabela 31: Relação da Tensão Superficial da Água e a Concentração Micelar Crítica do Biossurfactante em Diferentes Condições de Ensaios..... 89

Tabela 32: Percentual de Minhocas Sobreviventes nos Solos Argiloso e Arenoso em Diferentes Concentrações de Biossurfactantes Empregados nos Experimentos 91
Tabela 33: Caracterização do Inóculo Aeróbio e Anaeróbio 93
Tabela 34: Monitoramento da População de Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias e Hidrocarbonoclásticas do Inóculo Aeróbio em 155 Dias 94
Tabela 35: Monitoramento da População de Bactérias Heterotróficas Totais Anaeróbias do Inóculo Anaeróbio em 220 Dias 95
Tabela 36: Resultados do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso sob Condição Aeróbia 96
Tabela 37: Resultados do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso sob Condição Aeróbia 103
Tabela 38: Resultados do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso 108
Tabela 39: Resultados do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso sob Condição Anaeróbia 114
Tabela 40: Resultados do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso sob Condição Anaeróbia 121

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Ao longo dos tempos, o homem vem transformando o ambiente em que vive, buscando superar suas metas. Ele alcançou um patamar tal, que foi obrigado a desenvolver novas tecnologias que pudessem atender às suas necessidades e corrigir os impactos no meio ambiente ocasionados pelas suas ações.

Um dos grandes desafios superados foi a transformação do petróleo em derivados de grande relevância e valor econômico, mudando assim os hábitos da sociedade. No setor de petróleo, os desafios e as conquistas foram caminhando paralelamente até que os avanços tecnológicos permitiram a extração deste produto em lugares não imagináveis. A produção de petróleo no Brasil cresceu de 750 m^3/dia na época da criação da Petrobrás para mais de 182.000 m^3/dia no final dos anos 90, isto graças a constante evolução de técnicas e materiais na busca de reservas de petróleo em águas profundas (THOMAS *et al.*, 2001).

O petróleo é distribuído por meio de oleodutos ou de navios e armazenado em tanques. O oleoduto ou duto é considerado o modal mais econômico e seguro de movimentação de cargas. O transporte de petróleo e derivados também pode ser realizado por meio de navio-tanque, cuja navegação de cabotagem tem ocupado seu lugar de importância desde o início dos anos 90, época de abertura comercial do Brasil. Em relação aos derivados de petróleo, o modal rodoviário tem sido o mais empregado (CARDOSO, 2004).

Em função dessa grande movimentação de óleo cru e derivados, ocasionalmente pode haver riscos de poluição por hidrocarbonetos tanto no solo quanto no mar. De acordo com o *site* AMBIENTE BRASIL (*site 1*), aproximadamente 40 milhões litros de óleo e derivados foram acidentalmente lançados no meio ambiente entre 1975 a 2004, impactando solos, rios, manguezais e praias, no Brasil. No entanto, o impacto ambiental causado por vazamentos de óleo em solo varia quanto aos tipos de

produtos envolvidos e quanto ao tipo de solo (argiloso, siltoso ou arenoso, por exemplo) onde ocorreu a contaminação.

A biorremediação pode ser empregada como uma técnica fundamental e economicamente viável para a recuperação ou remediação de solos e águas subterrâneas contaminados com petróleo e derivados. Apesar dessa técnica ser estudada há muitos anos por pesquisadores de todo o mundo, existem ainda algumas dúvidas com relação aos compostos degradados, aos mecanismos de degradação, às rotas bioquímicas e aos microrganismos ou consórcios microbianos envolvidos, assim como a influência das partículas do solo no processo de biodegradação.

As diferentes texturas de solo são um fator determinante para a biodegradação de poluentes, como por exemplo o óleo cru. Assim, considerando que grande parte dos solos brasileiros contém elevados teores de argila, o levantamento do efeito de diferentes proporções deste componente na matriz do solo sobre o potencial de degradação da comunidade microbiana presente se torna fundamental.

Este trabalho propiciará a obtenção de resultados para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos, visto que quando a técnica é empregada em solos com característica argilosa a recuperação é dificultada devido às interações entre a matriz do solo e os contaminantes, o que acaba por reduzir a sua disponibilidade aos microrganismos (ORTEGA-CALVO *et al.*, 1997; DRAGUN, 1998). Por outro lado, o efeito tóxico dos hidrocarbonetos de petróleo aos microrganismos é maior em solos arenosos (LABUD *et al*., 2007). Além disso, a fase de adaptação dos microrganismos nesse tipo de solo é maior em relação aos solos argilosos (DAVIS e MADSEN, 1996).

Em função da interação óleo-matriz do solo, os surfactantes químicos e biossurfactantes têm sido empregados no tratamento de ambientes contaminados, posto que podem ser eficientemente aplicados no controle de derrames de óleo, na biodegradação, desintoxicação de efluentes industriais e na biorremediação de solos contaminados com óleo cru (BANAT, 1994). A propriedade emulsificante de alguns surfactantes e biossurfactantes tem potencializado o aumento da degradação de hidrocarbonetos no meio ambiente (KOSARIC, 1996). Nos últimos anos tem crescido o interesse quanto ao uso de biossurfactantes no controle de poluentes provenientes dos

derrames de óleo, visto que estes apresentam vantagens tais como baixa toxicidade e alta biodegradabilidade em relação aos surfactantes químicos, tornando-os compatíveis com o meio ambiente (BERTRAND *et al*., 1994; BAI *et al*. 1997; DESAI e BANAT, 1997).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a biodegradação de óleo diesel em solos com características argilosa e arenosa, sob condição aeróbia e anaeróbia, empregando biossurfactante comercial visando potencializar o processo de biorremediação.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as características dos solos testados de relevância para a biodegradação do óleo diesel.
- Analisar as principais propriedades do biossurfactante empregado, visando o processo de biorremediação.
- Avaliar as variáveis mais importantes no processo de biorremediação aeróbia dos solos contaminados com óleo diesel: teor de biossurfactante, teor de fertilizante e tempo, utilizando para tal propósito o planejamento experimental fatorial completo.
- Avaliar as variáveis mais importantes no processo de biorremediação anaeróbia dos solos contaminados com óleo diesel: teor de biossurfactante, teor de fertilizante e tempo, utilizando para tal propósito o planejamento experimental fatorial completo.
- Avaliar o efeito interativo dessas variáveis nos solos com características argilosa e arenosa, visando estabelecer as melhores condições para cada caso estudado.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O PETRÓLEO E O ÓLEO DIESEL

2.1.1 O PETRÓLEO

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, composta de diversos tipos de moléculas formadas por átomos de hidrogênio e de carbono. Além disso, apresenta compostos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e metálicos, sendo sua composição dependente do reservatório de origem. As Tabelas 1 e 2 apresentam a composição química e a classificação de petróleo, respectivamente.

Na Tabela 1, observa-se que os hidrocarbonetos saturados ou parafinas (normais, ramificados e cíclicos) constituem o maior grupo presente no petróleo representando cerca de 60%. De acordo com *American Petroleum Institute* (API), todos os petróleos contêm substancialmente os mesmos hidrocarbonetos em diferentes concentrações e a quantidade relativa de cada grupo de hidrocarboneto presente varia muito de um tipo de petróleo para outro (THOMAS *et al.*, 2001).

Tabela 1: Composição Química de um Petróleo

Composição do Petróleo	
Parafinas normais	14%
Parafinas ramificadas	16%
Parafinas cíclicas (naftênicas)	30%
Aromáticos	30%
Resinas e asfaltenos	10%

Fonte: THOMAS *et al.* (2001)

O petróleo apresenta impurezas que podem aparecer em toda sua faixa de ebulição, sendo comumente encontradas nas frações mais pesadas. Dentre essas impurezas, o enxofre é o elemento mais abundantemente encontrado no petróleo apresentando valores entre 0,02 e 4%, com concentração média de 0,65% em massa. O petróleo também contém, em média, 0,17% em massa de nitrogênio e o teor de metais pode variar de 1 a 1.200 ppm (THOMAS *et al*., 2001).

Tabela 2: Classificação do Petróleo

Classificação do Petróleo	Características
Parafínicos	• Acima de 75% de parafinas; • Óleos leves e de baixa viscosidade, exceto em hidrocarbonetos de elevado peso molecular; • Alto ponto de fluidez; • Baixo teor de enxofre; • K≥12,0; • Nordeste Brasileiro.
Naftênicos	• Acima de 70% de naftênicos; • Número muito pequeno de óleos; • Baixo teor de enxofre; • K≤11,8; • América do Sul, Rússia e Mar do Norte.
Aromáticos Intermediários	• Acima de 50% de aromáticos; • Óleos freqüentemente pesados (10-30% asfaltenos e resinas); • Elevado teor de tiofenos e dibenzotiofenos; • Oriente Médio, África Ocidental, Venezuela, Califórnia e Mediterrâneo.
Parafínico-naftênico	• 50-70% parafinas e acima de 20% naftênicos; • Teor de resinas e asfaltenos 5-15%; • Baixo teor de enxofre (<1%); • 20-45% naftênicos; • Bacia de Campos.
Aromático-naftênico	• Acima de 35% naftênicos; • Acima de 25% resinas e asfaltenos; • Teor de enxofre 0,4-1%; • África Ocidental.
Aromático-asfaltico	• Acima de 35% asfaltenos e resinas; • Óleos pesados e viscosos; • Teor de enxofre 1-9%; • Canadá Ocidental, Venezuela e Sul da França.

Fonte: THOMAS *et al.* (2001) (K – fator de caracterização, indica a natureza geral do óleo)

Em função da classificação do petróleo, pode-se determinar a quantidade das diversas frações que podem ser obtidas, assim como sua composição e suas propriedades físicas. Durante o refino, o petróleo sofre uma série de beneficiamentos para a obtenção de frações desejadas, que posteriormente, serão submetidas a

complexos tratamentos visando à obtenção de diferentes produtos finais. A Figura 1 apresenta esquematicamente as frações que podem ser obtidas durante o refino do petróleo, sem considerar os diferentes tipos de processos necessários para a obtenção do produto desejado.

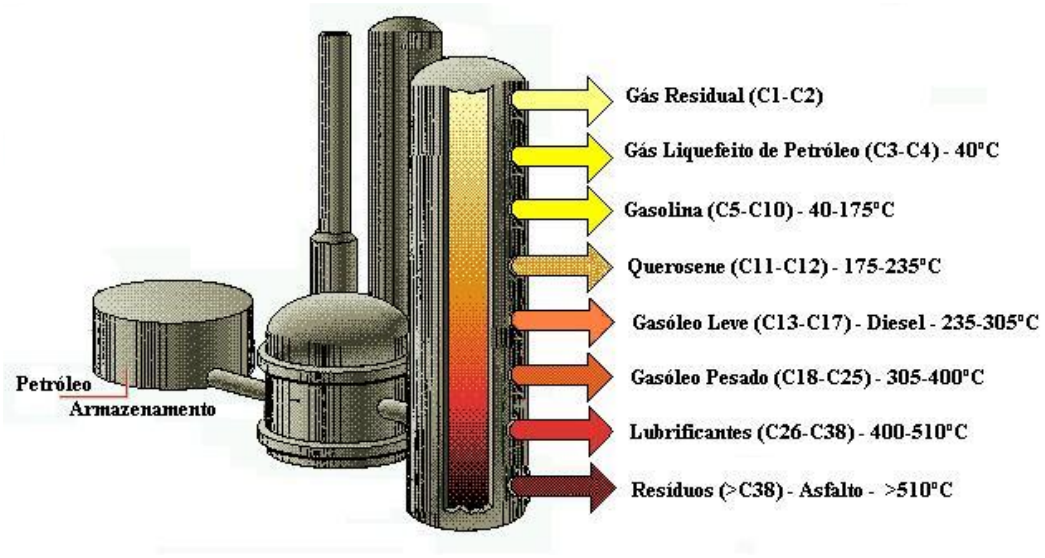


Figura 1: Frações que Podem Ser Obtidas Durante o Refino do Petróleo

Fonte: Adaptado de THOMAS *et al.* (2001)

2.1.2 O ÓLEO DIESEL

O óleo diesel é uma mistura de hidrocarbonetos que tem amplo emprego como combustível em motores a explosão (Ciclo Diesel) e também como fonte de calor. Os combustíveis normalmente utilizados nos motores a diesel são constituídos de misturas de hidrocarbonetos com uma faixa de ponto de ebulição que corresponde ao dos destilados intermediários do petróleo, sendo destilado após o querosene (CAMPOS e LEONTSINIS, 1989).

Existem alguns tipos específicos de óleo diesel que se diferenciam principalmente no teor de enxofre contido na formulação. Pode-se citar os cinco principais tipos de óleo diesel: B, C, D, Marítimo e Padrão (CARDOSO, 2004).

O óleo diesel tipo B possui teor de enxofre em torno de 0,5% em massa, estando disponível em todas as regiões do Brasil, excetuando nas grandes metrópoles, onde estão disponibilizados os tipos C e D.

O óleo diesel tipo C apresenta teor de enxofre em torno de 0,3%, estando disponível nas regiões metropolitanas de Belo Horizonte, Porto Alegre, Curitiba, Belém, Campinas e São José dos Campos.

O óleo diesel tipo D apresenta no máximo 0,2% de enxofre, sendo portanto menos poluente, estando disponível nas regiões metropolitanas de São Paulo, Santos, Cubatão, Salvador, Aracaju, Rio de Janeiro, Recife e Fortaleza.

No entanto, em fevereiro de 2005 a PETROBRAS lançou um novo óleo diesel, o S500, cujo teor de enxofre é 500 ppm. As refinarias da PETROBRAS (REDUC, REPLAN, REVAP, RPBC e REGAP) antes produziam o diesel de 2.000 ppm de enxofre, o diesel metropolitano. O S500 está sendo distribuído nas regiões metropolitanas de Rio de Janeiro, São Paulo, Campinas, Baixada Santista, São José dos Campos, Belo Horizonte e Vale do Aço, que concentram cerca de 70% da frota nacional de ônibus e caminhões e são responsáveis por 21% da demanda de diesel no país (REVISTA PETROBRAS, 2005).

O óleo diesel marítimo apresenta como característica principal o ponto de fulgor em torno de 60ºC, produzido exclusivamente para utilização em motores de embarcações marítimas. O teor de enxofre equivale a 1% em média (CARDOSO, 2004).

O diesel do tipo padrão atende às exigências específicas dos testes de avaliação de consumo e emissão de poluentes pelos motores diesel, sendo fornecido somente aos fabricantes de motores e órgãos responsáveis pela homologação dos mesmos (CARDOSO, 2004).

2.2 O SOLO

2.2.1 ORIGEM

A formação de um solo pode ser resultante da ação conjunta dos agentes intempéricos sobre os restos minerais depositados e enriquecidos de detritos orgânicos, provenientes da ação da biota local. A formação tem início no momento em que as rochas entram em contato com o meio ambiente e começam a sofrer transformações (ANDRADE, 2001).

Sem a presença da biota os solos não seriam formados, visto que os microrganismos participam da gênese do *habitat* onde vivem. No início da formação do solo, carbono e nitrogênio são elementos deficientes; desse modo, espécies fotossintéticas e fixadoras de nitrogênio, como por exemplo as cianobactérias, são importantes colonizadoras primárias de rochas matrizes. Essas colonizadoras também estão envolvidas no intemperismo através de participação em reações que liberam prótons, nutrientes inorgânicos e ácidos orgânicos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). A partir daí, fungos e bactérias têm recursos para se desenvolver e liberar nutrientes dos minerais do solo, como o fósforo, cálcio e ferro. Uma vez o solo formado e com disponibilidade de água, as plantas começam a crescer e posteriormente ao serem decompostas gerarão matéria orgânica, sendo liberados lentamente os nutrientes para os próximos colonizadores (COUTINHO, 1999).

Mediante isso, o solo é um corpo natural, formado sob a ação de fatores (agentes externos) e processos (agentes internos) que interferem em sua diferenciação e caracterização, e com propriedades distintas dos corpos que atuaram em sua evolução (ANDRADE, 2001). A Tabela 3 apresenta os fatores e os processos responsáveis pela formação dos solos.

Segundo RESENDE *et al.* (2002), quanto mais intensa for a atuação dos organismos e do clima, maior será a energia empregada na liberação dos nutrientes da rede cristalina, na remoção dos nutrientes da solução do solo para os oceanos e na transformação dos minerais secundários (minerais de argila) em outros mais estáveis, de menor capacidade de troca catiônica e maior capacidade de adsorção aniônica. Dessa

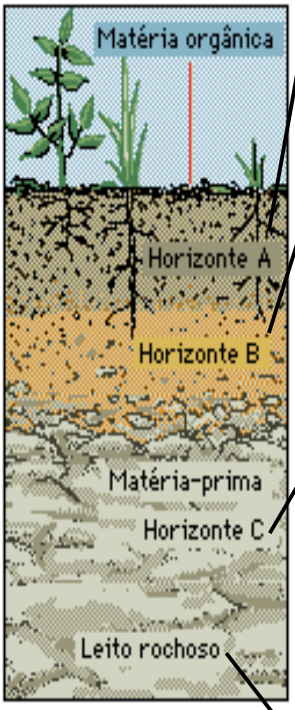
maneira, é sobre esse material geológico que se desenvolve o verdadeiro solo, resultante da ação dos agentes pedogênicos.

Tabela 3: Fatores de Formação de Solos

Fatores de Formação (Externos)	Processos de Formação (Internos)
Material de Origem: orgânicos, inorgânicos (minerais), rochas ígneas, sedimentares e metamórficas.	**Adição:** matéria orgânica, materiais eólicos, poeiras, materiais aluviais etc.
Organismos: referem-se não somente aos vegetais mas também aos animais.	**Perdas:** arraste de sais solúveis e sílica que são levadas para a parte inferior do perfil por lixiviação ou mesmo se perdem no lençol freático; erosão da superfície do solo por agentes eólicos e hídricos.
Clima: temperatura, ventos, precipitação e evapotranspiração.	**Translocações:** lenta movimentação de substâncias dentro do perfil, que consistem de sais, carbonatos, argila, sesquióxidos e matéria orgânica do horizonte A para o B. Movimentação de material dentro do perfil em outras direções.
Relevo: influi sobre a profundidade do *solum*, erosão, cor e, em geral, sobre os processos de formação.	**Transformações:** ruptura da rede cristalina dos minerais, gênese dos minerais argilosos e decomposição da matéria orgânica.
Tempo: não adiciona material, mas o estado do sistema solo não é estático, varia com o tempo.	

Fonte: ANDRADE (2001).

Os fenômenos de adição, perdas, transformações e translocações que ocorrerem com intensidades distintas através do regolito dão origem aos horizontes. Os horizontes são camadas diferenciadas que se sucedem em profundidade, definindo o perfil de um solo (ANDRADE, 2001). Os solos possuem horizontes ou camadas relativamente homogêneas paralelas à superfície que são ambientes distintos e podem ser subdivididos (RESENDE *et al.*, 2002). Os vários horizontes componentes de um perfil de solo nem sempre são evidentes e têm limites bem definidos. A Figura 2 apresenta esquematicamente os principais horizontes do perfil de um solo, assim como suas características e implicações.



A – Mais escuro e rico em matéria orgânica. É nele que o contato com a maioria das plantas e animais é mais intenso, havendo mais raízes e microrganismos.

B – É, em geral, o mais argiloso e menos erodível dos horizontes. Se sua estrutura é granular, bem expressa , como em alguns Latossolos, é muito suscetível à erosão em sulcos. Nesse horizonte chega um número menor de raízes que dependendo da época do ano, são responsáveis pela absorção de água e nutrientes.

C – Tende a ser o menos argiloso, mais siltoso, mais erodível e de coloração menos homogênea dos horizontes. Dependendo da profundidade em que se encontre, algumas raízes podem atingi-lo e o que foi dito para o horizonte B, a respeito de água e nutrientes, o mesmo se aplica.

R – Rocha não intemperizada. Ela é impermeável e tende a segurar o lençol d'água. Possui minerais com nutrientes por liberar e isto tende ser maior quanto mais quente for o clima, menor for o fragmento da rocha e mais próxima estiver da superfície.

Figura 2: Horizontes do Perfil de Solo – Características e Implicações

Fonte: Adaptado de REZENDE *et al.* (2002).

2.2.2 CONSTITUIÇÃO DO SOLO

Pode-se assumir o solo como um sistema multicomponente, integrado pelas fases: sólida, líquida e gasosa. Essas três fases são representadas no solo da seguinte maneira: a fase sólida constitui a matriz do solo, a fase líquida consiste na água presente no solo e a fase gasosa é a atmosfera do solo. No entanto, as proporções relativas das três fases no solo variam continuamente e dependem de variáveis como condições climáticas,vegetação e sobretudo manejo (FERREIRA e DIAS JR., 2001).

A fase sólida é normalmente constituída por 95% de partículas minerais e 5% de substâncias orgânicas (MANAHAN, 1994). As partículas minerais do solo são

divididas em três frações em função do tamanho dos grãos: areia, silte e argila. A composição entre essas diferentes frações resulta em tipos distintos de classes texturais, assunto que será abordado na Seção 2.2.3, deste Capítulo.

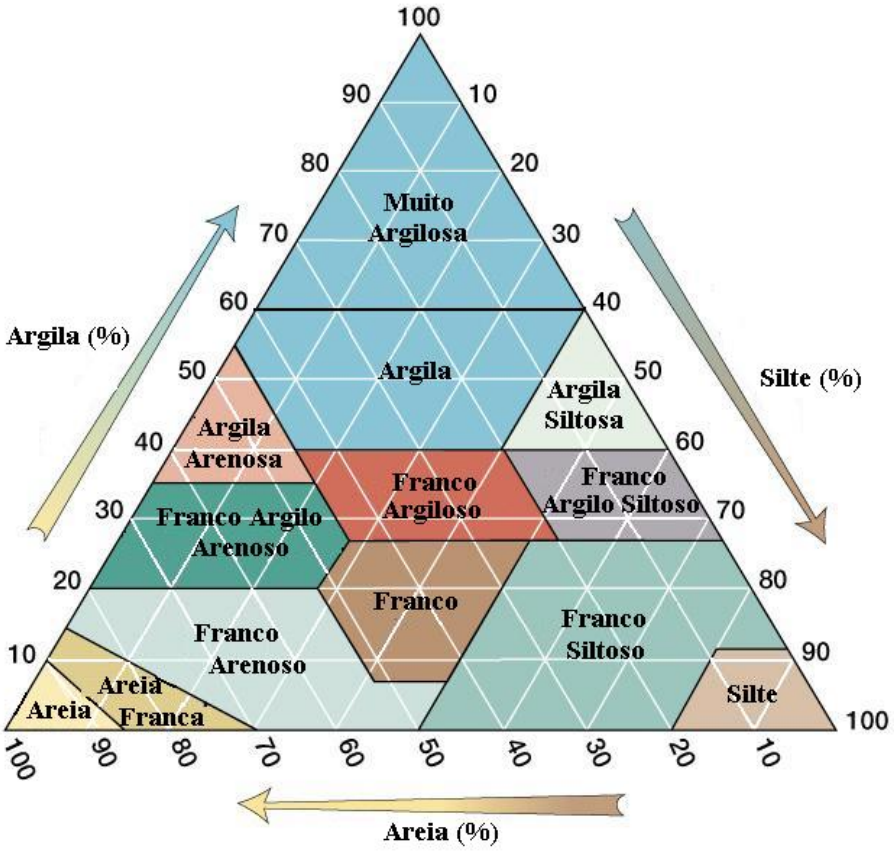
A fração orgânica do solo é uma mistura complexa de tecidos vivos ou mortos e de substâncias orgânicas transformadas ou em seu estado original. São materiais complexos e em constante transformação, mas que podem ser separados em frações distintas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Segundo MACHADO (1999), aproximadamente 98% do carbono orgânico do solo encontra-se como matéria orgânica morta, principalmente na forma de húmus (80-90%). A fração viva geralmente não ultrapassa 4% do teor de carbono orgânico. Desse percentual, 5-10% são raízes, 60-80% são microrganismos e 15-30% representam os macrorganismos.

A fase líquida, isoladamente, caracteriza a umidade do solo e é representada pela água ou solução do solo, contendo íons como $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-}, NO^{3-}, Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+}, H^+, NH_4^+, etc (PREVEDELLO, 1996). Além disso, precisa-se considerar a presença de íons H^+ e OH^- que definem o pH da solução do solo, o qual se constitui no principal fator a afetar a disponibilidade dos nutrientes. Embora a solução do solo seja a fonte imediata de nutrientes para as plantas, o teor dos mesmos na fase líquida é muito baixo, mesmo em solos férteis. No caso do fósforo, por exemplo, seu teor na solução é quase desprezível. Somado a isso, a solução do solo está sujeita a variações de concentração e apresenta-se irregularmente distribuída nos poros do solo (FURTINI NETO *et al.*, 2001).

A fase gasosa caracteriza a porosidade de aeração do solo ou porosidade livre de água, e apresenta gases como CO_2, O_2, NH_3 e vapor de água (PREVEDELLO, 1996). A composição do ar existente nos poros do solo se difere do ar atmosférico basicamente por apresentar uma maior concentração de CO_2, gerado pela respiração das raízes e pela decomposição da matéria orgânica (FURTINI NETO *et al.*, 2001). É importante ressaltar que os gases e a água competem pelo espaço poroso do solo, visto que quando o mesmo não é ocupado pela fase líquida é complementado pela fase gasosa. Entretanto, quando os espaços estão completamente preenchidos pela solução do solo, a disponibilidade de gases para os microrganismos é reduzida.

2.2.3 TEXTURA E ESTRUTURA DO SOLO

A textura do solo constitui-se numa das características físicas mais estáveis e representa a distribuição quantitativa das partículas do solo quanto ao tamanho. A grande estabilidade faz com que a textura seja considerada elemento de grande importância na descrição, identificação e classificação do solo. A textura do solo confere alguma qualidade ao solo, no entanto, sua avaliação apresenta conotação prioritariamente quantitativa. Areia, silte e argila são as três frações texturais do solo que apresentam amplitudes de tamanho variáveis em função do sistema de classificação adotado (FERREIRA e DIAS JR., 2001). A Figura 3 apresenta o diagrama de textura adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, baseado no sistema de classificação do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA).



CASCALHOS	AREIA					SILTE	ARGILA
	Muito Grossa	Grossa	Média	Fina	Muito Fina		
2	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,002	mm

Figura 3: Diagrama de Textura Adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo

Fonte: RESENDE *et al.* (2002), FERREIRA e DIAS JR. (2001).

No solo, as frações silte e areia, sob a ação do intemperismo transformam-se em argila. Os minerais resistentes permanecem sob a forma de areia. A fração silte, que é a intermediária, é o ponto da instabilidade, ou seja, de uma maneira geral, os solos mais novos são os que apresentam alto teor de silte e os mais velhos e comuns da paisagem brasileira, tais como os Latossolos, apresentam um teor mínimo (ANDRADE, 2001). A fração silte pode ser um indicador do grau de intemperização de um solo ou do potencial dele de conter minerais primários facilmente intemperizáveis, ou seja, aqueles que têm condições de fornecer nutrientes (RESENDE *et al.*, 2002). Na Tabela 4 são apresentadas algumas características dessas frações.

Tabela 4: Caracterização da Areia, Silte e Argila

Fração	Características
Areia	Solta, com grãos simples (não forma agregados), não plástica, não pode ser deformada, não pegajosa, não higroscópica, predominam poros grandes na massa, não coesa, pequena superfície específica, capacidade de troca de cátions praticamente ausente.
Silte	Sedosa ao tato, apresenta ligeira coesão quando seco, poros de tamanho intermediário, ligeira ou baixa higroscopicidade, superfície específica com valor intermediário, capacidade de troca iônica baixa.
Argila	Plástica e pegajosa quando úmida, dura e muito coesa quando seca, alta higroscopicidade, elevada superfície específica, alta capacidade de troca catiônica, poros muito pequenos, contração e expansão, forma agregados com outras partículas.

Fonte: FERREIRA e DIAS JR. (2001).

As propriedades das argilas são muitas e muito variadas; entre as principais se encontram as associadas com reações de adsorção, troca iônica, propriedades eletrocinéticas e eletroquímicas. Essas propriedades se fundamentam nas características coloidais, de superfície e de carga elétrica que apresentam estes minerais.

As argilas possuem importância nos solos por apresentarem cargas negativas e, em menor proporção positivas, que podem reter tanto cátions como ânions, dentre os quais se apresentam elementos nutrientes (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, NH_4^{+}, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}, etc). Ademais, devido as suas características de expansão e contração, as argilas influem nas características físicas do solo, como a porosidade (macro e micro), infiltração,

permeabilidade, difusibilidade térmica, densidade, etc. Sendo assim, quanto maior o teor de argila no solo, maior será a sua área específica e a intensidade de fenômenos como retenção de água, capacidade de troca, resistência à erosão e fixação de fósforo (ANDRADE, 2001).

Essas partículas primárias (argila, silte e areia) de diferentes tamanhos e formatos resultam na existência de espaços vazios ou poros entre as mesmas, formando partículas maiores (agregados), dando ao solo a sua estrutura. Pode-se definir a estrutura do solo como sendo um agregado de partículas em unidades compostas ou agrupadas. Os tipos de estrutura encontrados podem se apresentar na forma de grânulos, grumos, blocos, prismas, colunas e laminar (ANDRADE, 2001).

A formação da estrutura do solo envolve processos distintos, mas complementares. O tipo de estrutura de um determinado solo é conseqüência de fatores de formação do solo que podem influenciar o aparecimento de uma dada estrutura. Na Tabela 5 são apresentados os fatores que afetam a formação de agregados.

Tabela 5: Fatores que Afetam a Formação de Agregados.

Positivos	Negativos
Cátions: alteram a espessura da dupla camada iônica, causando floculação ou dispersão.	**Impactos das Gotas de Chuva:** causa desagregação e erosão.
Matéria Orgânica: atua na agregação do solo como um agente cimentante.	**Preparo Excessivo do Solo:** causa compactação e pulverização do solo.
Sistema Radicular: as raízes exercem pressões que comprimem os agregados, separando dos agregados adjacentes.	**Concentração de Na^+:** o seu aumento relativo ao dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+}causa a dispersão.
Microrganismos: cimentam os agregados através de produtos excretados (exopolissacarídeos etc.).	**Temperatura:** pode causar oxidação da matéria orgânica.

Fonte: FERREIRA e DIAS JR. (2001).

De acordo com FERREIRA e DIAS JR. (2001), a estrutura do solo é de fundamental importância pois regula processos como aeração, armazenamento e circulação de água, penetração de raízes, disponibilidade de nutrientes, atividade macro e microbiológicas e temperatura do solo.

2.2.4 FERTILIDADE DO SOLO

A fertilidade do solo pode ser definida como o estudo da capacidade dos solos em suprir nutrientes às plantas. No entanto, conhecer o tipo e o teor de nutriente é de extrema importância para a atividade microbiana no solo. Os nutrientes presentes no solo podem ser classificados segundo sua necessidade essencial para os microrganismos e plantas (MANAHAN, 1994):

a) Macronutrientes: são os nutrientes requeridos em grande quantidade (carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, fósforo e enxofre);

b) Micronutrientes: são aqueles requeridos em menor quantidade e que quando empregados em alto teor são freqüentemente tóxicos (ferro, manganês, zinco, cobre, molibdênio, cloro e boro).

Nas Seções seguintes somente serão abordados os principais nutrientes exigidos pelos microrganismos no solo.

2.2.4.1 Nitrogênio

O nitrogênio destaca-se dos demais por apresentar acentuado dinamismo no sistema solo e por ser, normalmente, o nutriente exigido em maior quantidade. Esse dinamismo é devido a sua grande mobilidade no solo e às diversas transformações mediadas por microrganismos. Além disso, o nitrogênio sob a forma de gás pode ser perdido por volatilização.

Ao contrário dos demais nutrientes, o nitrogênio presente no solo praticamente não é originado de rochas de origem. A fonte de nitrogênio é o gás N_2, que constitui 78% da atmosfera terrestre. Considerando que a quase totalidade do nitrogênio presente no solo está sob a forma orgânica (aminoácidos, ácidos nucléicos) e/ou associado a polímeros, tem-se que a incorporação de matéria orgânica ao solo, assim como sua taxa de decomposição ou de mineralização, controla o teor de nitrogênio no solo. O nitrogênio mineral do solo é representado pelas formas iônicas: amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) e raramente nitrito (NO_2^-) (FURTINI NETO *et al.*, 2001).

2.2.4.2 Fósforo

O fósforo é um elemento importante a todas as formas de vida por fazer parte de biomoléculas como ácidos nucléicos e ATP (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). As várias formas de fósforo encontradas no solo são (FURTINI NETO *et al.*, 2001):

a) Fósforo na Solução: as formas de fósforo na solução dependem diretamente da acidez do solo. A remoção de fósforo da solução do solo pode ocorrer tanto por precipitação quanto por adsorção, sendo este fenômeno de remoção denominado de fixação de fósforo.

b) Fósforo Precipitado: a precipitação em solos ácidos ocorre com íons alumínio ou ferro presentes na solução e no caso de solos com íons cálcio. Em solos ácidos, a correção do pH promove a neutralização do alumínio e de grande parte do ferro, reduzindo a fixação do fosfato via precipitação. Por outro lado, o uso excessivo de calcário (pH acima de 7,0) pode ocasionar um novo aumento da fixação pela precipitação do fosfato com cálcio e sua disponibilidade dependerá da solubilidade dos compostos formados.

c) Fósforo Adsorvido: o fósforo pode ser adsorvido na superfície de argilas, óxidos hidratados de ferro e de alumínio ou de carbonato de cálcio, em solos calcários. Parte do fosfato adsorvido permanece por um certo tempo na forma lábil, ou seja, pode retornar à solução.

d) Fósforo Mineralogicamente Estável: o fósforo removido da solução por precipitação ou adsorção forma compostos mineralogicamente estáveis, ou seja, com o passar do tempo, o fósforo lábil torna-se não lábil, tornando-o indisponível no solo.

e) Fósforo Orgânico: pode representar de 20 a 70% do fósforo total da camada arável e sua contribuição será tanto maior quanto maior for o teor de matéria orgânica do solo. Apresenta-se basicamente na forma de ésteres do ácido ortofosfórico, fosfolipídeos, ácidos nucléicos, nucleotídeos e açúcares fosfatados.

Todavia, qualquer que seja a natureza do solo, a concentração de fósforo em solução é extremamente baixa, em virtude do que foi dito anteriormente.

2.2.5 MICRORGANISMOS DO SOLO

A presença de microrganismos em determinado solo é função das condições ambientais dominantes e dos limites da sua informação genética. O sucesso de um organismo em qualquer *habitat* é função da extensão e rapidez de suas respostas fisiológicas às condições ambientais predominantes. O tamanho e forma das células refletem as condições ambientais, de modo que em condições de nutrição reduzida a razão superfície/volume aumenta, as células ficam mais alongadas formando às vezes filamentos de modo a aumentar a superfície de contato com o solo e ter maior acessibilidade a nutrientes. Entretanto, em condições de seca ocorre o inverso, a razão superfície/volume diminui e as células se tornam esféricas para diminuir as perdas de água (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Os microrganismos ocupam em torno de 0,5% do espaço poroso do solo, porém esta porcentagem aumenta significativamente no solo rizosférico devido ao aumento na disponibilidade de substrato. As bactérias, que têm geralmente tamanho menor que 0,5 μm, se localizam nos *pellets* fecais, na matéria orgânica, nos poros e no interior de agregados e os fungos nos poros e fora dos agregados. A ocupação dos poros por microrganismos é função de seu tamanho e conteúdo de água. Poros com alguns diâmetros na faixa de 2 a 6 μm são adequados para entrada de bactérias enquanto fungos necessitam de poros maiores (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

A atividade biológica no solo e os processos bioquímicos correspondentes são fundamentais ou vitais para a fertilidade do solo. A porção viva desse sistema é representada principalmente por microrganismos (bactérias, actinomicetos e algas), raízes de plantas e animais viventes (meso e macrofauna). A reciclagem da água e de nutrientes pelos vegetais superiores complementa este panorama (RESENDE *et al.*, 2002).

A Tabela 6 apresenta os mecanismos pelos quais os microrganismos do solo influenciam as transformações e ciclagem dos nutrientes no solo. Esses organismos influenciam a degradação de matéria orgânica, a quantidade deste material acumulado no solo, o grau de ciclagem de nutrientes, o crescimento da vegetação via relação simbiótica e a agregação de partículas do solo (DRAGUN, 1998).

Tabela 6: Os Mecanismos Microbianos no Solo.

Mecanismo	Efeito/Importância
Mobilização	Liberação de nutrientes imobilizados nos restos vegetais e outros materiais orgânicos depositados no solo e na própria matéria orgânica nativa através da mineralização.
Imobilização	Imobilização na biomassa microbiana e substâncias químicas.
Produção de Metabólitos	Produção e excreção de substâncias quelantes e/ou complexantes que atuam na solubilidade e mobilidade de vários elementos no sistema solo-planta.
Produção de Enzimas	Reações enzimáticas de oxi-redução que controlam a solubilidade de vários compostos ou elementos.
Alteração no pH	Transformações indiretas provocadas por modificações no pH do solo.
Oxi-redução	Redução de formas oxidadas de vários nutrientes, em condições de baixa aeração.
Alteração da Solubilidade	Produção de ácidos orgânicos e inorgânicos com ação solubilizadora de compostos inorgânicos.
Redução Bioquímica	Transformações bioquímicas específicas, como a desnitrificação e redução de sulfato, que resultam na perda de nutrientes na forma gasosa.
Produção de Toxinas	Produção de compostos tóxicos que poluem o ambiente, representando ameaças à saúde pública e reduzindo o crescimento das plantas.
Simbiose Radicular	Fixação biológica do nitrogênio atmosférico, formação de micorrizas e outras associações benéficas com as raízes.

Fonte: MOREIRA e SIQUEIRA (2002).

Em função das características do solo, os organismos com metabolismos distintos conseguem conviver lado a lado, interagindo em estado de equilíbrio dinâmico, muitas vezes com relações de dependência essenciais para sua sobrevivência, proporcionando condições ideais para uma biodiversidade extremamente elevada (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

2.2.6 COMPORTAMENTO DO ÓLEO NO SOLO

O solo por ser um sistema complexo no qual ocorre combinação das partículas primárias (argila, silte e areia) com as fases líquida e gasosa, propicia comportamentos distintos do óleo ao longo do seu perfil. Este perfil pode ser dividido em três zonas distintas em função da saturação de água no solo, como é apresentado na Figura 4: **a)** a zona vadosa ou insaturada corresponde à camada mais próxima da superfície do solo e não se encontra completamente saturada com água; **b)** a zona saturada corresponde àquela que se encontra a uma profundidade onde todos os vazios no solo e nas rochas estão preenchidos com água; **c)** a zona capilar ou franja capilar é representada pela porção de transição entre a zona insaturada e a zona saturada.

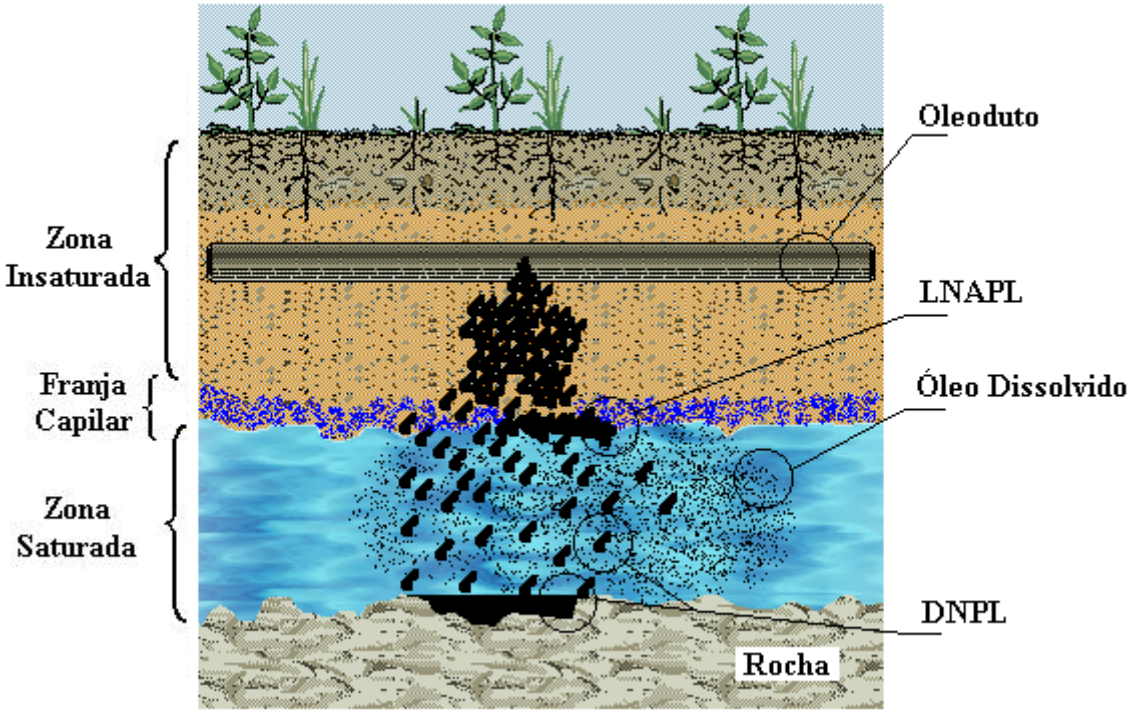


Figura 4: Representação Esquemática de Três Zonas de Saturação e do Comportamento do Óleo no Solo

À medida que o óleo percorre o perfil do solo, parte deste é volatilizado formando uma fase vapor, cujos hidrocarbonetos voláteis podem estar confinados nos poros e/ou nos interstícios do solo. A perda de frações leves de hidrocarbonetos por volatilização altera a viscosidade e a densidade do óleo residual, podendo resultar em mudanças irreversíveis nas características de transporte no meio poroso, em virtude de

interações deste com a matriz do solo (FINE *et al.*, 1997). A outra parcela do óleo pode estar dissolvida na solução do solo e/ou sorvida as partículas do solo.

O grau e a taxa de sorção dos compostos orgânicos no solo estão relacionados ao teor de matéria orgânica (ORTEGA-CALVO *et al.*, 1997) e a hidrofobicidade do óleo (FINE *et al.*, 1997). Na zona insaturada, o óleo dissolvido na solução do solo é transportado para dentro e para fora desta, seguindo geralmente duas direções para cima (pela evaporação na interface solo-atmosfera e pela transpiração devido à liberação de vapor d'água pela vegetação) e para baixo (pela infiltração e percolação a partir da zona de raízes das plantas).

A fração de óleo livre no solo pode continuar a sua trajetória e devido a sua baixa solubilidade forma um líquido de fase não aquosa (NAPL – *non-aqueous phase liquid*) que atua como fonte contínua de contaminação. O aumento do teor de umidade no solo pode diminuir tanto o transporte da fase vapor como a retenção da fração de óleo residual (confinado nos poros ou sorvido nas partículas do solo), resultando no aumento do transporte da NAPL (FINE *et al.*, 1997). Segundo DRAGUN (1998), a NAPL pode formar temporariamente "piscinas" na superfície do solo quando este apresenta elevado teor de argila e baixa permeabilidade. Em contrapartida, em solos arenosos a infiltração da NAPL pode ser mais rápida.

A NAPL pode ser classificada como uma fase mais densa que a água (DNAPL – *dense non-aqueous phase liquid*), tendendo a se depositar na base do aqüífero, e uma fase menos densa (LNAPL - *light non-aqueous phase liquid*) que se mantém sobre o nível d'água (Figura 4). A remediação de locais contaminados com DNAPL é geralmente mais difícil do que naqueles contaminados com LNAPL.

Na zona saturada, a entrada de DNAPL nos poros preenchidos de água requer a superação de uma pressão de entrada resultante da tensão interfacial entre a DNAPL e a água. A pressão de entrada requerida aumenta com a diminuição do tamanho da partícula do solo. A descida do fluxo de DNAPL pode ser interrompida toda vez que uma camada com partículas mais finas é encontrada, tendendo a fluir lateralmente, e acumulando-se até que haja uma camada espessa de DNAPL que possa vencer a pressão de entrada. Sendo assim, variações na granulometria do solo podem produzir significativa alteração no comportamento de uma pluma de DNAPL.

2.4 BIORREMEDIAÇÃO

2.4.1 DEFINIÇÃO

A biorremediação é um processo de tratamento que emprega microrganismos que são os principais responsáveis pela degradação de compostos complexos em outros mais simples, podendo gerar como produtos finais CO_2, H_2O e CH_4. A biorremediação pode ocorrer sob condições aeróbia e anaeróbia, quando os microrganismos utilizam como aceptor final de elétrons o oxigênio molecular e outros tipos de aceptores (CO_2, Fe^{3+}, SO_4^{2-}, etc.), respectivamente, dependendo das condições ambientais do local onde se deseja empregar tal técnica. Além disso, o processo pode ser empregado no local onde ocorreu a contaminação (biorremediação *in situ*) ou através da remoção do meio contaminado (biorremediação *ex situ*). A escolha da técnica a ser utilizada dependerá das condições ambientais (permeabilidade do solo, por exemplo), do custo e do tempo necessário para o tratamento do solo contaminado (Tabela 7).

Tabela 7: Vantagens e Desvantagens das Técnicas de Biorremediação *In Situ* e *Ex Situ*

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Biorremediação *In Situ*	Não requer a escavação do solo contaminado, reduzindo os custos	Processo de tratamento mais lento
	Pode tratar um grande volume de solo de uma só vez	Pode ser difícil o controle do processo
	Há liberação de menos poeira e compostos orgânicos voláteis	Mais eficiente em solos mais permeáveis
Biorremediação *Ex Situ*	Processo de tratamento mais rápido	Requer a escavação do solo contaminado o que onera os custos
	De fácil controle	Pode necessitar de um tratamento prévio do solo contaminado
	Pode ser empregado para o tratamento de uma variedade de contaminantes e tipos distintos de solos	Liberação de poeira e compostos orgânicos voláteis

Fonte: EPA (1996)

Em função disso, antes de dar início ao tratamento do solo contaminado é necessária a caracterização do local para se avaliar qual a técnica mais adequada a ser empregada. Nesta tese foram estudadas duas diferentes técnicas de biorremediação: bioestimulação e bioaumento. Além dessas, ensaios de controle biótico foram realizados para representar uma estratégia de tratamento de solos contaminados, denominada de atenuação natural.

A atenuação natural ou biorremediação intrínseca é uma estratégia que depende dos processos naturais para reduzir a toxicidade da massa e/ou a mobilidade de um contaminante no solo sem a intervenção do homem (SCOW e HICKS, 2005). No entanto, as condições ambientais devem ser adequadas para que essa seja empregada. Além disso, é necessária a presença de microrganismos nativos capazes de biodegradar o contaminante presente no solo.

Se as condições não forem satisfatórias há necessidade de se promover correções dos fatores limitantes à biodegradação do contaminante. Essa técnica é denominada de bioestimulação e visa estimular o crescimento da população microbiana nativa pelo fornecimento de aceptores finais de elétrons, pela adição de nutrientes essenciais, pela correção do pH e do teor de umidade. Se essas medidas forem realizadas de forma apropriada, a biodegradação de hidrocarbonetos será estimulada sem qualquer impacto adverso ao meio ambiente.

Entretanto, quando a concentração de população microbiana capaz de degradar esses compostos orgânicos é baixa, emprega-se o bioaumento. Essa técnica visa o aumento dessa população pela adição de microrganismos endógenos (nativos) ou exógenos (externos) adaptados às condições do solo a ser tratado. Em alguns casos, nem sempre os microrganismos introduzidos no solo são capazes de sobreviver ou mesmo de aumentar a degradação de óleo (McGILL *et al.*, 1981).

A bioestimulação e o bioaumento podem ser potencializados com a adição de surfactantes ou biossurfactantes, visto que estes podem aumentar a taxa de mineralização do óleo no solo, aumentando sua biodisponibilidade aos microrganismos. A biodisponibilidade de contaminantes aos microrganismos influenciada pela adição de surfactante será tratada nas Seções 2.4.7.8 e 2.5.1.4.

2.4.2 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIORREMEDIAÇÃO

A biodegradação de petróleo está relacionada ao movimento e distribuição do óleo no solo e à capacidade de microrganismos de degradá-lo. No entanto, outros fatores podem influenciar a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos no solo. A manipulação e a otimização destes fatores é fundamental para a obtenção de bons resultados na biorremediação.

2.4.2.1 Propriedades Físico-químicas do Óleo

O acúmulo de um dado composto no meio ambiente poderá ser influenciado pela sua estrutura, concentração e toxicidade. Os compostos que não podem ser transformados, tenderão a persistir até que haja migração para outro compartimento do ambiente onde aceptores de elétrons e microrganismos possam estar disponíveis (STREVETT *et al.*, 2002). Alguns compostos são difíceis de serem biodegradados em função do número, do tamanho ou da localização dos grupos funcionais que impedem o ataque enzimático (GODSY, 1994).

Os produtos da biodegradação geralmente são transientes, mas alguns deles podem se acumular no ambiente. Estes produtos gerados podem ser mais tóxicos que o produto de origem (STREVETT *et al.*, 2002). Os alcanos C2 a C6 podem ter efeito inibitório para alguns microrganismos, pois os hidrocarbonetos de baixo peso molecular solvatam e destroem as estruturas da membrana intracelular e pericelular lipídica dos microrganismos. De acordo com SIKKEMA *et al.* (1995), o acúmulo de compostos lipofílicos na membrana de microrganismos apresenta efeitos nas propriedades estruturais e funcionais, ocorrendo a perda de sua integridade e um aumento na permeabilidade de prótons e íons. Observações quanto ao efeito tóxico de aromáticos, cicloalcanos, alcanos, álcoois e fenóis podem ser explicadas pela interação desses compostos com os constituintes da membrana.

Segundo SIKKEMA *et al.* (1995), o óleo refinado pode ser mais tóxico aos microrganismos do que o óleo cru, visto que os hidrocarbonetos voláteis são mais tóxicos do que alcanos de elevado peso molecular. Além disso, o efeito tóxico de

hidrocarbonetos (por exemplo, BTEX) aos microrganismos aumenta com a diminuição de sua viscosidade.

2.4.2.2 Teor de Umidade do Solo

A umidade do solo é essencial para a biodegradação uma vez que a maioria dos microrganismos vive no filme d'água em torno da partícula do solo. A degradação do óleo pelos microrganismos do solo ocorre na interface *óleo-água* (McGILL *et al.*, 1981). O tamanho da interface *óleo-água* limita o espaço de adesão das bactérias e, conseqüentemente, um aumento desta área estimularia a degradação microbiana (POREMBA *et al.*, 1993). A baixa solubilidade de compostos orgânicos em água limita a ação dos microrganismos. Segundo ORTEGA-CALVO *et al.* (1997), os microrganismos do solo degradam os compostos dissolvidos em água mais facilmente que aqueles sorvidos na matriz do solo.

A água é importante para o movimento dos microrganismos unicelulares, que por isso, são restritos aos filmes de água, enquanto fungos filamentosos e actinomicetos podem atravessar os vazios insaturados, através do crescimento micelial (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Ademais, a água serve como meio de transporte para alguns nutrientes e compostos orgânicos que se difundem para a célula microbiana e através da qual os produtos metabólicos são removidos.

O teor de umidade também influencia a aeração e o pH do solo. Quando a matriz do solo está completamente preenchida com água, a difusão dos gases através do solo é severamente restringida, comprometendo assim a atividade metabólica dos microrganismos aeróbios, visto que condições anóxicas são criadas.

De acordo com dados da literatura, o teor de umidade deve estar na faixa de 25-85% da capacidade de campo do solo, sendo a faixa ótima de 50-80% para a biodegradação de contaminantes em solo (WDNRBRRM, 2004). No entanto, não há unanimidade quanto ao teor ótimo de umidade, posto que alguns autores citam que este se encontra na faixa de 35-65% da capacidade de campo do solo (HUPE *et al.*, 2001).

2.4.2.3 Aceptores de Elétrons

Um dos principais fatores que governam a biodegradação é a natureza e a biodisponibilidade de aceptores de elétrons (STREVETT *et al.*, 2002). Na Tabela 8 é apresentada a relação entre a forma de respiração microbiana, os aceptores de elétrons, as características e o potencial de oxi-redução. O potencial de oxi-redução mede a tendência de uma substância doar ou receber elétrons (MADIGAN *et al.*,2000) e por conseguinte, é uma medida quantitativa da energia livre envolvida na transferência de elétrons. Doadores e aceptores de elétrons são denominados redutores e oxidantes, respectivamente.

Tabela 8: Relação entre a Forma de Respiração Microbiana, Aceptores de Elétrons e Potencial Redox.

Forma de Respiração	Aceptor de Elétrons	Produto	Característica	Potencial Redox (mV)
Aeróbia	O_2	H_2O	Aeróbios facultativos e estritos	**+400**
Redução de Ferro III	Fe^{3+}	Fe^{2+}	Aeróbios facultativos e anaeróbios estritos	+77*
Redução de Nitrato	NO_3^-	NO_2^-, N_2O, N_2	Aeróbios facultativos	-100
Redução de Sulfato	SO_4^{2-}	HS^-	Anaeróbios estritos	**-160 a -200**
Metanogênica	CO_2	CH_4	Archaea metanogênica	-300

Fonte: DRAGUN (1998) e MADIGAN *et al.* (2000). *Esse potencial é muito dependente do pH. O valor listado é para pH 2-3, sendo que em pH 7, este valor é de aproximadamente +20mV.

O oxigênio molecular atua como aceptor de elétrons durante a degradação aeróbia enquanto nitrato, sulfato ou dióxido de carbono são os aceptores de elétrons para a degradação anaeróbia. Quando o oxigênio molecular está disponível como aceptor de elétrons, tende a ser preferencialmente utilizado em relação aos outros possíveis aceptores presentes (MADIGAN *et al.*, 2000), pois é a opção termodinamicamente mais favorável (STREVETT *et al.*, 2002). Na Tabela 8, verifica-se que o par O_2/H_2O é o mais eletropositivo; mais energia é disponibilizada quando o O_2 é usado do que quando outro aceptor de elétrons é empregado (MADIGAN *et al.*, 2000).

Em ambiente rico em matéria orgânica, os processos aeróbios consomem rapidamente o oxigênio estabelecendo uma condição de anaerobiose (STREVETT *et al.*, 2002). Se mais do que um aceptor de elétrons está presente, somente um predominantemente suprirá mais energia aos microrganismos nativos e estes tenderão a dominar o ambiente (STREVETT *et al.*, 2002). Essa sucessão de espécies microbianas é função do pH e do potencial redox. À medida que o potencial diminui ocorre transição da predominância de aeróbios para facultativos e em seguida anaeróbios (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Em relação à degradação de hidrocarbonetos no ambiente, sabe-se que hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) e benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) não são facilmente degradados aerobicamente, mas possivelmente sob condição anaeróbia (YOUNG e PHELPS, 2005). SCOW e HICKS (2005) relataram que uma larga faixa de n-alcanos de óleo cru foi degradada anaerobicamente, sob condições metanogênicas e redutoras de sulfato, em sedimentos de um aqüífero contaminado.

2.4.2.4 Teor de Nutrientes

As bactérias são compostas de combinação de elementos que são os componentes de seu material genético, moléculas estruturais, enzimas e plasma intracelular. O metabolismo microbiano e o crescimento são dependentes da disponibilidade desses nutrientes essenciais.

Devido à grande diversidade das bactérias, a proporção de elementos nutricionais requeridos para crescimento varia muito, sendo carbono, hidrogênio, enxofre, nitrogênio e fósforo os principais elementos requeridos. Por isso, em solos e sedimentos aqüíferos contaminados com compostos orgânicos, carbono e hidrogênio não são limitantes pois eles são os principais componentes desses compostos. Os compostos orgânicos biodegradáveis são fonte de carbono que os microrganismos podem utilizar como fonte de energia e crescimento. O enxofre está geralmente disponível em quantidade suficiente para o crescimento de microrganismos. Outros nutrientes (potássio, cálcio, magnésio, etc) são geralmente encontrados em concentrações adequadas para o metabolismo em muitos solos. Entretanto, alta concentração de cálcio pode precipitar fosfato e reduzir a quantidade de fósforo

disponível ao metabolismo microbiano, como visto na Seção 2.2.4.2. Sendo assim, os principais elementos limitantes para crescimento são nitrogênio e fósforo (GODSY, 1994).

De acordo com FERGUSON *et al.* (2003), solos contaminados que apresentam baixo teor de nitrogênio e fósforo necessitam de correção destes nutrientes para permitir um aumento na degradação de hidrocarbonetos.

RIVERA-ESPINOZA e DENDOOVEN (2004) avaliaram o emprego de biossólidos (ricos em nitrogênio, fósforo e matéria orgânica) na bioestimulação de um solo contaminado com óleo diesel. Os autores concluíram que a adição de biossólidos acelerou a mineralização do óleo diesel e diminuiu a concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH – *total petroleum hydrocarbon*) residual. No entanto, nem sempre a correção de nutrientes pode favorecer o aumento da eficiência de biodegradação de TPH, como observado por YERUSHALMI *et al.* (2003) em seus experimentos. BENTO *et al.* (2005) observaram também que a bioestimulação de microrganismos do solo resultou em menor degradação de óleo diesel quando comparado com atenuação natural. Entretanto, esses autores argumentam que a eficiência da bioestimulação pode ter sido afetada pela limitação dos nutrientes, ou seja, estes não estavam prontamente disponíveis para os microrganismos.

2.4.2.5 Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importante que afeta o crescimento e a sobrevivência de microrganismos. À medida que a temperatura aumenta, as reações enzimáticas e químicas na célula ocorrem em maiores taxas e o crescimento torna-se mais rápido. Entretanto, sob temperatura elevada, as proteínas microbianas podem ser irreversivelmente danificadas e, por conseguinte, as funções da célula caem rapidamente a zero e as reações enzimáticas não ocorrem, causando a interrupção das funções da célula (MADIGAN *et al.*, 2000).

De acordo com GODSY (1994), as taxas de degradação enzimática e o metabolismo microbiano dobram a cada aumento de 10ºC até que seja atingida a temperatura de inativação que geralmente encontra-se entre 40 e 50ºC para a maioria

das bactérias. De acordo com MOREIRA e SIQUEIRA (2002), as taxas de reação microbiana são maiores a temperatura em torno de 28ºC e sofrem decréscimos acentuados em temperaturas menores que 25ºC e maiores que 35ºC. A faixa de 30 a 40ºC é considerada ideal, por proporcionar máximos de biodegradação de hidrocarbonetos. Acima desta faixa, a atividade enzimática é reduzida e a toxicidade dos hidrocarbonetos aumenta (LEAHY e COLWELL, 1990).

2.4.2.6 pH

O pH ótimo para mineralização de hidrocarbonetos se encontra na faixa entre 6,5 e 8,0 (DRAGUN, 1998). De acordo com MADIGAN *et al.* (2000), essa faixa é considerada ótima para o crescimento da maioria dos microrganismos. Por isso, os valores extremos de pH podem retardar a capacidade da população microbiana em degradar hidrocarbonetos (LEAHY e COLWELL, 1990).

Além de afetar o crescimento microbiano, o pH pode também influenciar a solubilidade ou a disponibilidade de nutrientes (por exemplo, fósforo) e a toxidez de nutrientes minerais, a mobilidade do material potencialmente tóxico e a reatividade dos minerais.

O ferro, o manganês e o zinco são menos disponíveis em valores de pH acima de 7,0. O ferro, o alumínio e o manganês atingem níveis tóxicos em valores de pH menores que 5,0 e o fósforo está menos disponível em valores extremos de pH (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

2.4.2.7 Densidade de Microrganismos Degradadores de Óleo

O sucesso da biorremediação é dependente do tipo de microrganismos presentes, mais especificamente da presença ou ausência de bactérias hidrocarbonoclásticas. A taxa de biodegradação depende da presença e do número de microrganismos do solo capazes de degradar os compostos orgânicos. Existe uma relação direta entre a taxa de degradação e o tamanho da população, já que quanto maior o número de microrganismos capazes de degradar o composto, mais rápida será a sua degradação (DRAGUN, 1998). O tamanho da população microbiana é maior na superfície do solo, visto que nesta região a temperatura, a umidade, a aeração e a energia são relativamente mais favoráveis para o desenvolvimento dos microrganismos (DRAGUN, 1998).

De acordo com ATLAS (1981), em ecossistemas não poluídos, os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos geralmente constituem menos do que 0,1% da população microbiana. No entanto, em ambientes contaminados, eles podem representar a totalidade da comunidade microbiana presente. O aumento dessa comunidade pode estar relacionado a sua exposição aos hidrocarbonetos em um ambiente não contaminado. Entretanto, quando a concentração de população microbiana degradadora de compostos orgânicos é baixa em determinados solos, uma opção para o aumento desta é a adição de microrganismos endógenos (nativos) ou exógenos (externos) adaptados às condições do solo a ser tratado.

BENTO *et al.* (2005) avaliaram a adição de microrganismos exógenos em solos franco-arenosos e verificaram que cada solo apresentou comportamentos distintos. O solo bioaumentado proveniente de Hong Kong apresentou baixa biodegradação de TPH em relação à atenuação natural. Segundo os autores, os microrganismos exógenos não foram capazes de competir com os microrganismos nativos que estavam mais adaptados ao ambiente. Em contrapartida, o bioaumento do solo de Long Beach, foi positivo tanto para a remoção da fração leve quanto da fração pesada de hidrocarbonetos de petróleo quando comparados com os da atenuação natural.

As bactérias filamentosas (actinomicetos) também desempenham importante papel na biodegradação de petróleo e derivados. Sob o ponto de vista nutricional, são microrganismos pouco exigentes e capazes de utilizar uma grande variedade de substâncias como fonte de carbono, inclusive hidrocarbonetos aromáticos (MADIGAN *et al.*, 2000).

Os fungos promovem a biodegradação de hidrocarbonetos no solo, em especial os fungos filamentosos, que são encontrados com mais freqüência no solo. Segundo DRAGUN (1998), foram identificados mais de 700 espécies e 170 gêneros diferentes no solo.

As bactérias associadas às cianobactérias parecem formar um consórcio eficiente para a biodegradação de óleo. As cianobactérias fornecem oxigênio e nitrogênio, assim como matéria orgânica essencial para a atividade das bactérias heterotróficas aeróbias. Por sua vez, essas bactérias degradam compostos de petróleo reduzindo seu efeito tóxico para as cianobactérias, potencializando a biodegradação de resíduos oleosos (ABED e KÖSTER, 2005). O emprego de consórcios microbianos possibilita a degradação de uma variedade de compostos complexos, posto que diferentes microrganismos contribuirão através de seu complexo sistema enzimático.

2.4.2.8 Biodisponibilidade do Contaminante

A degradação de compostos orgânicos pode ser influenciada pela deficiência de biodisponibilidade do contaminante à população microbiana do solo. Essa deficiência pode estar relacionada tanto às propriedades químicas dos compostos orgânicos quanto às características do solo (MAHRO *et al.*, 2001). Além disso, outro fator que pode influenciar a biodisponibilidade é a transferência de massa do contaminante, ou seja, a taxa com que o substrato pode alcançar a célula microbiana. Como as moléculas apresentam tamanhos muito distintos podem se difundir pelos poros do solo onde a bactéria não tem acesso devido ao seu tamanho (MAHRO *et al.*, 2001). Por conseguinte, a textura e a estrutura do solo influenciam na biodisponibilidade do óleo, visto que os solos que apresentam partículas maiores como areia viabilizam o acesso dos microrganismos no interior dos poros.

Como visto na Seção 2.2.3, os colóides do solo, a matéria orgânica e a argila apresentam elevada capacidade de sorção de compostos orgânicos. Os ácidos fúlvicos, os ácidos húmicos e as argilas freqüentemente coexistem no solo, influenciando a biodegradação dos poluentes orgânicos hidrofóbicos (ORTEGA-CALVO *et al.*, 1997). Segundo HARMS e BOSMA (1997), os compostos químicos podem estar disponíveis aos microrganismos somente quando estão dissolvidos em água. Conseqüentemente, a fase líquida não aquosa (NAPL) tem que se dissolver e os substratos sorvidos têm que estar dessorvidos para que estejam disponíveis.

Dessa forma, as taxas de adsorção e dessorção podem ser influenciadas pelas propriedades das partículas de argila e da matéria orgânica do solo, ao passo que a taxa de difusão do óleo pode ser afetada pelo tamanho do poro, da tortuosidade e da extensão da adsorção do contaminante na superfície da partícula.

No entanto, a taxa de degradação de alguns compostos orgânicos adsorvidos pode ser influenciada pela densidade da população microbiana que se encontra na superfície das partículas do solo e/ou na fase líquida (DRAGUN, 1998). Essa taxa pode ser aumentada pela produção de biossurfactantes, uma vez que estes favorecem a biodisponibilidade do composto.

No entanto, STELMACK *et al.* (1999) verificaram em seus experimentos que o emprego de um surfactante aniônico e não iônico influenciou negativamente a biodegradação da fase líquida não aquosa (NAPL). Sabe-se que para a biodegradação ocorrer, os microrganismos devem ter acesso aos compostos seja pela dissolução destes na fase aquosa ou pela adesão daqueles diretamente na interface *água-NAPL*, como dito na Seção 2.4.7.2. Esses autores verificaram que o emprego de surfactantes em concentrações abaixo da concentração micelar crítica (CMC) inibiu a adesão das bactérias na interface *NAPL-água*, influenciando no seu crescimento. Isso indicou que a relação entre as características da carga do surfactante e da superfície da célula é mais importante para a adesão das bactérias do que as propriedades da NAPL.

Na Seção que se segue será discutido mais detalhadamente as principais características dos surfactantes e biossurfactantes, assim como a sua importância no aumento da biodisponibilidade do óleo na biorremediação de solos contaminados.

2.5 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

2.5.1 SURFACTANTES

2.5.1.1 Definições e Conceitos Básicos

Os surfactantes são amplamente empregados, devido a sua notável habilidade em influenciar as propriedades superficiais e interfaciais de um sólido ou de um líquido. Dentre alguns empregos de surfactantes pode-se destacar o seu uso na indústria de petróleo, por exemplo: na recuperação de petróleo, em poços de perfuração, em poços de injeção, em poços de produção etc (SHCRAMM, 2000). Além disso, podem ser empregados na limpeza de tanques de estocagem, como dispersante de resíduos de óleo e no transporte e combustão de óleo pesado em oleodutos (BOGNOLO, 1999).

Os surfactantes (contração da expressão em inglês ***SURF**ace-**ACT**ive **A**g**ENT***) são compostos anfifílicos (ROSEN, 1988) contêm uma porção hidrofóbica (fração apolar) e hidrofílica (fração polar), capazes de reduzir a energia livre do sistema (MULLIGAN *et al.*, 2001). Segundo ROSEN (1988), a energia livre interfacial é a quantidade mínima de trabalho requerida para se criar uma interface (refere-se ao limite entre duas fases imiscíveis). As propriedades das soluções de surfactantes podem ser distintas em função do grupo hidrofílico (cabeça da molécula) e hidrofóbico (cauda da molécula) na molécula. A Figura 5 apresenta esquematicamente uma molécula de surfactante (monômero) e o agregado destes monômeros (micela).

Os monômeros de surfactantes formam estruturas esféricas, cilíndricas, lamelares e vesículares (estruturas mais ou menos esféricas consistindo de micelas lamelares arranjadas em uma ou mais esferas concêntricas) com uma pseudofase orgânica, causando a redução das tensões interfacial e superficial. A concentração mínima necessária para atingir tal situação é denominada de concentração micelar crítica (CMC) (ROSEN, 1988).

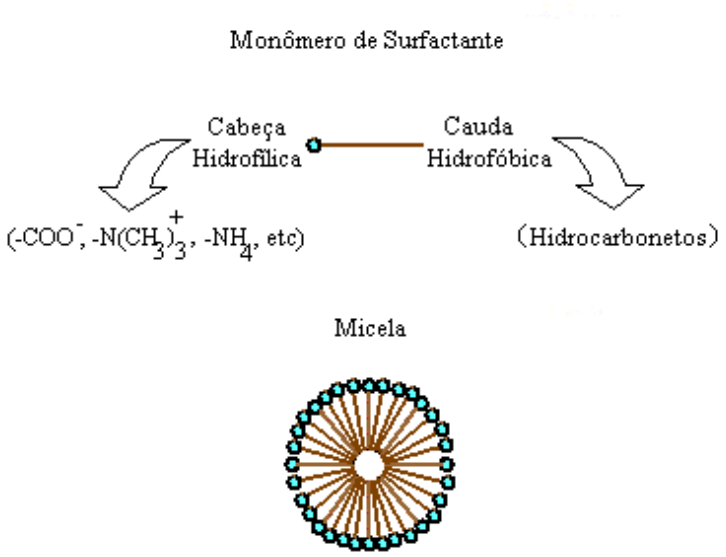


Figura 5: Representação de uma Molécula de Surfactante e uma Micela.

O grupo polar (cabeça da molécula) ou iônico interage fortemente com o meio aquoso, que é solvatado via interação dipolo-dipolo ou íon-dipolo. Em função da cabeça polar, os surfactantes podem ser divididos em classes distintas: aniônicos (apresentam carga negativa), catiônicos (apresentam carga positiva), não-iônicos (não apresentam carga iônica) e zwitteriônicos ou anfóteros (apresentam cargas positiva e negativa) (SCHRAMM, 2000). A Tabela 9 apresenta alguns exemplos das quatro categorias de surfactantes. A porção hidrofóbica geralmente é um hidrocarboneto (linear ou ramificado), apresentando ou não dupla ligação e/ou grupos aromáticos (GEORGIOU *et al*., 1992).

No entanto, devido à formação do agregado, os grupos hidrofílicos (cabeças) do surfactante se encontram muito próximos, ocasionando uma repulsão eletrostática que se opõe ao processo de micelização. Então os contra-íons dos surfactantes (Tabela 9) desempenham um papel fundamental, pois quando em concentração adequada, “blindam” a carga do agregado, diminuindo o potencial elétrico e a repulsão entre as cabeças dos monômeros (*SITE* 2).

Tabela 9: Exemplos de Quatro Categorias de Surfactantes.

Tipo	Surfactante	Estrutura*
Aniônico	Estereato de sódio	$CH_3(CH_2)_{16}COO^-$ **Na^+**
	Dodecil sulfato de sódio	$CH_3(CH_2)_{11}SO_4^-$ **Na^+**
Catiônico	Cloreto de laurilamida	$CH_3(CH_2)_{11}NH_3^+$ **Cl^-**
	Cloreto de trimetil dodecilamônio	$C_{12}H_{25}N^+(CH_2)_3$ **Cl^-**
Não-iônico	Álcool polioxietileno	$C_nH_{2n+1}(OCH_2\ CH_2)_mOH$
	Aquilfenol etoxilato	$C_9H_{19}C_6H_4(OCH_2\ CH_2)_nOH$
Zwitteriônico	Dodecilbetaina	$C_{12}H_{25}N^+(CH_3)_2CH_2COO^-$
	Lauramidopropil betaina	$C_{11}H_{23}CONH(CH_2)_3N^+(CH_3)_2CH_2COO^-$

Fonte: SCHRAMM, 2000. * Os contra-íons estão representados em negrito.

A Figura 6 representa o início do processo de associação das moléculas de surfactantes na formação de agregados, denominados micelas. As caudas hidrofóbicas dos monômeros ficam na superfície da micela esférica, como visto na Figura 5. Segundo SEABRA (1997), a concentração em que as micelas começam a se formar varia em função do tipo (iônico ou não-iônico) do surfactante e da concentração de sais na fase aquosa.

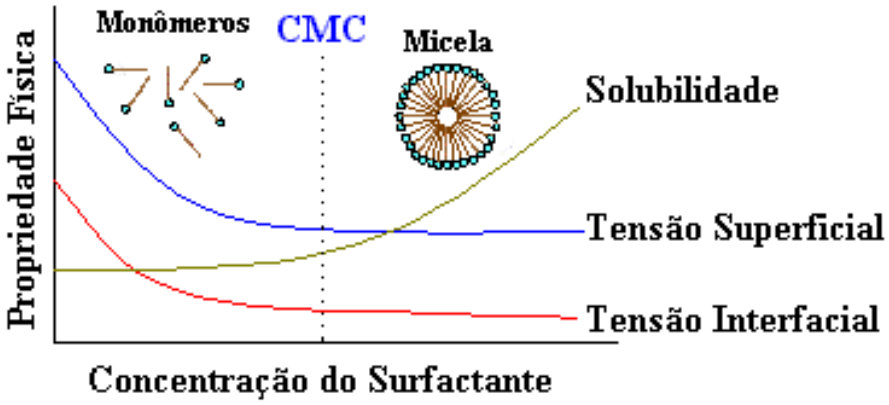


Figura 6: Representação Gráfica da Variação da Solubilidade, Tensão Superficial e Interfacial em Função da Concentração do Surfactante
Fonte: Mulligan *et al.* (2001).

2.5.1.2 Principais Propriedades

Segundo SCHRAMM (2000), as propriedades físico-quimicas de surfactantes variam acima e abaixo da concentração específica do surfactante (Concentração Micelar Crítica). De acordo com ROSEN (1988), essa é uma maneira de se medir a CMC de um surfactante, visto que é possível se verificar alterações pronunciadas nas vizinhanças da concentração micelar crítica.

Como principais propriedades que caracterizam os surfactantes pode-se citar adsorção, formação de micelas, formação de macroemulsões (partículas com diâmetro acima de 0,4 μm) e microemulsões (partículas com diâmetro entre 0,01 e 0,1μm), dipersão ou agregação de sólidos, ação espumante ou anti-espumante, solubilidade, solubilização, molhabilidade ou detergência (PORTER, 1994 *apud* REIS, 1998; ROSEN, 1988).

A adsorção dos surfactantes em superfícies acarreta efeitos como molhabilidade, emulsificação, formação de espumas, dispersão de partículas e detergência (PORTER, 1994 *apud* REIS, 1998). No entanto, a adsorção de surfactantes na interface sólido-líquido é fortemente influenciada por alguns fatores, tais como:

a) A Natureza dos Grupos Estruturais na Superfície do Sólido: quanto à presença de sítios altamente carregados ou grupos essencialmente não-polares e a natureza dos átomos em que estes sítios ou grupos são constituídos;

b) A Estrutura Molecular do Surfactante Adsorvido: se esta é iônica ou não-iônica e se o grupo hidrofóbico é longo ou curto, ramificado ou não, alifático ou aromático;

c) O Ambiente da Fase Aquosa: pH, temperatura, conteúdo eletrolítico e a presença de qualquer aditivo tais como solutos polares de cadeia curta (álcool, uréia, etc.) (ROSEN, 1988).

As soluções aquosas de surfactantes, cujas concentrações se encontram acima da CMC contêm um volume grande de fase não-polar no interior das micelas. Esta fase não-polar é capaz de dissolver solutos relativamente não-polares, como solventes orgânicos, pesticidas clorados, entre outros. Esse fenômeno é conhecido como solubilização micelar (SEABRA, 1997). Na Figura 7 é apresentada esquematicamente a formação da micela acima da CMC em uma fase DNAPL. Acima desse valor, um aumento significativo na solubilidade total dos constituintes da DNAPL é observado, em função de os surfactantes reduzirem a tensão interfacial pelo acúmulo na interface entre a DNAPL e a fase aquosa (NFESC, 2002).

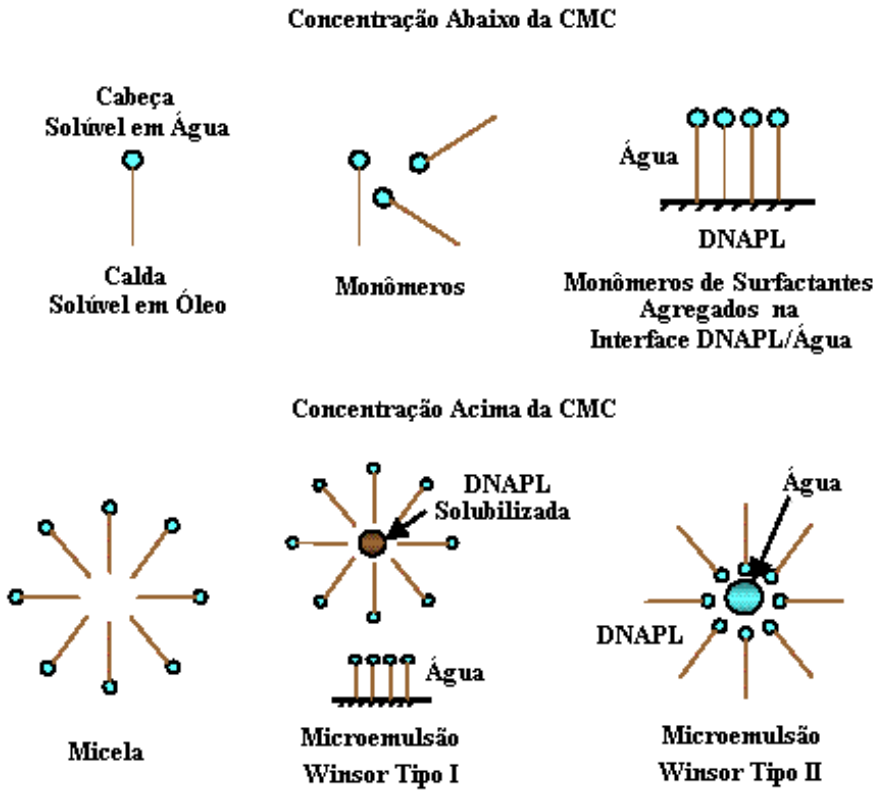


Figura 7: Formação de Micela em uma Fase DNAPL.

Fonte: NFESC (2002).

Devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes formam monocamadas orientadas na interface (SCHRAMM, 2000) entre fases de diferentes polaridades tais como *óleo/água*, *ar/água* ou *água/sólido*, atuando como agente de molhabilidade na superfície do sólido (FIECHTER, 1992).

2.5.1.3 Concentração Micelar Crítica

Em termos de modelo micelar, o valor da concentração micelar crítica (CMC) é definida precisamente no modelo de separação de pseudofase, em que as micelas são tratadas como uma fase separada. A CMC é definida como o ponto a partir do qual ocorre o aumento da solubilidade do monômero num solvente particular. Esse valor é de grande importância para indústria do petróleo, pois possibilita melhorias ou aumento na recuperação de óleo (SHCRAMM, 2000).

Entretanto, em fase aquosa, a CMC do surfactante pode ser afetada por alguns fatores tais como: **a)** estrutura do surfactante; **b)** presença de eletrólitos na solução; **c)** presença de aditivos orgânicos; **d)** presença de uma segunda fase líquida; **e)** temperatura da solução (ROSEN, 1988). A Tabela 10 apresenta resumidamente como esses fatores podem influenciar na CMC.

Alguns valores típicos de CMC para baixas concentrações eletrolíticas e a temperatura ambiente: aniônicos (10^{-3} – 10^{-2} M), anfotéros (10^{-3} – 10^{-1} M), catiônicos (10^{-3} – 10^{-1} M) e não iônicos (10^{-5} – 10^{-4} M) (SHCRAMM, 2000).

Tabela 10: Fatores que Influenciam a Concentração Micelar Crítica em Meio Aquoso

Fator	Efeito
Estrutura do Surfactante	A CMC diminui com o aumento do número de átomos de carbono no grupo hidrofóbico do surfactante. Por exemplo, em surfactantes não-iônicos e anfóteros o aumento de duas unidades de metileno no grupo hidrofóbico reduz a CMC a 1/10 do valor previsto e para surfactantes iônicos este valor diminui de 1/4.
Eletrólito	A presença de eletrólitos causa o aumento ou a diminuição da CMC principalmente devido à diminuição da espessura da atmosfera iônica em torno dos grupos hidrofílicos e a conseqüente diminuição da repulsão entre eles na micela. Esse efeito é mais pronunciado nesta ordem de surfactantes: aniônico > catiônico > zwitteriônicos > não-iônicos.
Compostos Orgânicos	Estes compostos são divididos em duas classes: **classe I** – são geralmente compostos orgânicos polares (álcoois e amidas) que afetam a CMC por serem incorporados na micela, reduzindo a concentração crítica; **classe II** – são compostos orgânicos formados pela uréia, álcool de cadeia curta, formamida, etc que alteram a CMC por modificar a interação da água com a molécula do surfactante ou com a micela.
Segunda Fase Líquida	A CMC é alterada muito pouco pela presença de uma segunda fase líquida em que o surfactante não dissolve apreciavelmente.
Temperatura	Para surfactantes não-iônicos, a CMC diminui com o aumento da temperatura devido ao aumento na hidrofobicidade causado pela destruição das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos hidrofílicos. Em relação aos surfactantes iônicos, a CMC inicialmente diminui com a temperatura até atingir um mínimo e então aumenta com o aumento da temperatura. No entanto, o aumento da temperatura causa diminuição da hidratação do grupo hidrofílico, que favorece a micelização. Por outro lado, esse aumento proporciona o rompimento da água estrutural em torno do grupo hidrofóbico, desfavorecendo a micelização.

Fonte: ROSEN (1988); KIM e LIM (2004)

2.5.1.4 Aplicação de Surfactantes na Biorremediação

O uso dos surfactantes na remediação de solos e aqüíferos contaminados com substâncias orgânicas hidrofóbicas talvez tenha se iniciado a partir do emprego de agentes tensoativos na recuperação terciária de petróleo. O seu emprego para a remediação iniciou-se com o Texas Research Institute, que desenvolveu, com sucesso, um estudo de recuperação de gasolina por inundação *in situ*, de uma mistura de surfactantes aniônicos e não-iônicos (HILL *et al.*, 1973; EPA, 1990 *apud* SEABRA, 1997).

De acordo com a Agência Norte Americana de Proteção Ambiental (EPA, 1995b), a aplicação de surfactantes pode aumentar a remediação do solo sob três maneiras: **a)** aumento da mobilidade e solubilidade para melhorar o desempenho da técnica *pump-and-treat*; **b)** diminuição da mobilidade do contaminante para prevenir sua migração; **c)** aumento da taxa de biodegradação do contaminante no solo.

Os surfactantes podem tanto mobilizar ou solubilizar a DNAPL dependendo do grau de redução da tensão interfacial envolvida. O grau de redução da tensão interfacial está relacionado com o comportamento da fase do surfactante ou da estabilidade e qualidade da água, microemulsão e fases DNAPL que formam quando uma solução de surfactante e DNAPL está misturada. Quando surfactantes aniônicos são empregados, o tipo preferido de solubilização ou mobilização pode ser conduzido pela mudança da salinidade da mistura de surfactante injetado. Como a salinidade da solução aumenta, as interações entre o grupo hidrofílico do surfactante e as moléculas de água são reduzidas, o que resulta em grandes interações entre o grupo hidrofóbico do surfactante e a DNAPL. A salinidade pode ser ajustada continuamente no campo para otimizar o desempenho do surfactante. A possibilidade de se poder ajustar facilmente as propriedades do surfactante tal como a tensão interfacial é uma vantagem significativa do uso de surfactantes aniônicos sobre não-iônicos (NFESC, 2002).

Um sistema foi desenvolvido para descrever as complexas interações entre DNAPL, água e surfactantes. Três tipos de comportamento de fase são esperados quando a DNAPL e as soluções de surfactante são misturadas. A Tabela 11 apresenta

esses três tipos de comportamentos e a Figura 8 representa graficamente o comportamento da fase em função do aumento da salinidade.

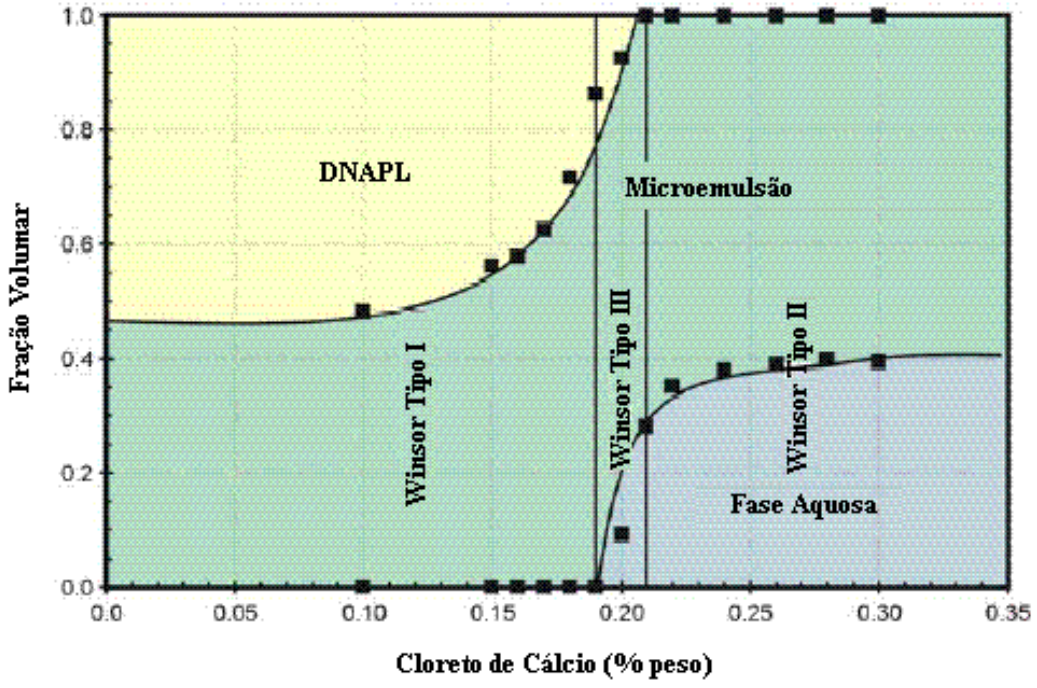
Tabela 11: Três Tipos de Comportamento de Fase quando DNAPL e a Solução de Surfactantes Encontram-se Misturadas

Tipo	Comportamento
Winsor Tipo I	Há a solubilização da DNAPL na solução de surfactante na fase aquosa. Neste tipo, forma-se uma microemulsão óleo-em-água e componentes da DNAPL encontram-se solubilizados no centro da micela.
Winsor Tipo II	A solubilização da DNAPL não ocorre. Verifica-se a formação de microemulsão água-em-óleo ou microemulsão invertida e no centro da micela se encontra água.
Winsor Tipo III	Observa-se a presença de três fases (aquosa, microemulsão e DNAPL) coexistindo na solução. A fase de separação mediana apresenta densidade entre a da água e da DNAPL. A formação dessa fase está associada com baixíssimas tensões interfaciais e alta solubilização.

Fonte: NFESC, 2002.

No entanto, a transição de uma fase para outra pode ser influenciada também pela adição de eletrólitos (para surfactantes aniônicos), adição de álcool pesado, pelo aumento da cauda do surfactante ou pela redução de temperatura.

Muitos estudos têm mencionado o pré-tratamento do solo com surfactantes para solubilizar compostos hidrofóbicos (MULLIGAN *et al.*, 2001), visto que estes podem aumentar a taxa de biodegradação pois aumenta a sua biodisponibilidade (GUHA e JAFFE, 1996 *apud* HUA *et al.*, 2003). Como dito na Seção 2.4.7.2, o tamanho da interface *óleo-água* limita a biodegradação de óleo e o emprego de surfactantes pode aumentar a área desta interface estimulando os microrganismos. Além disso, os surfactantes podem ser úteis na biorremediação *in situ* não permitindo o movimento do contaminante na água subterrânea (ALEXANDER, 1995). No entanto, segundo ROSENBERG *et al* (1992), o uso desses agentes emulsificantes tanto pode estimular quanto inibir a sua biodegradação.



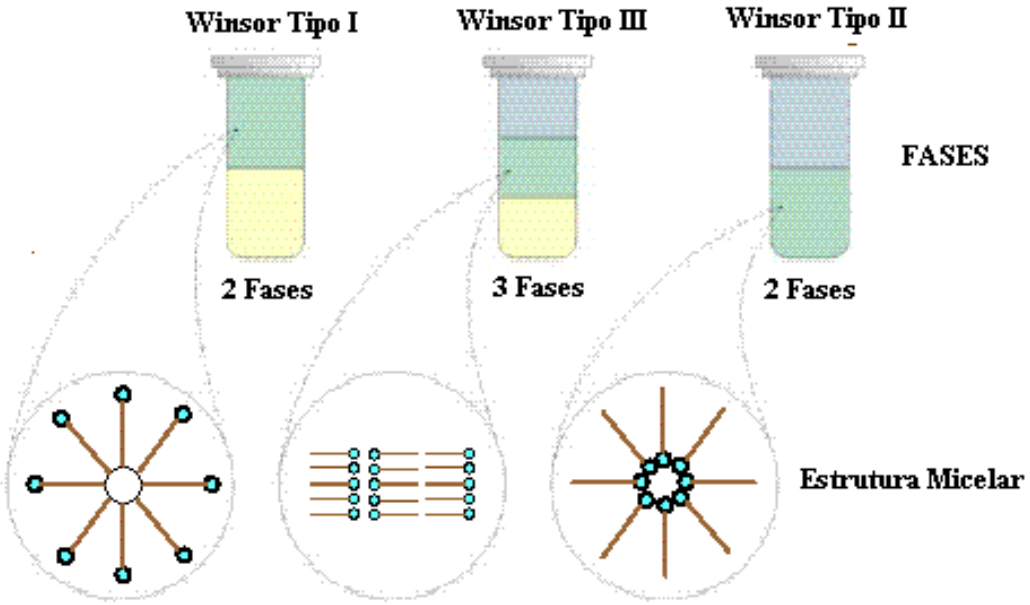


Figura 8: Representação Gráfica do Comportamento da Fase quando DNAPL e a Solução de Surfactantes Encontram-se Misturadas.
Fonte: NFESC, 2002.

COLORES *et al.* (2000) observaram que o uso de Witconol SN70 (surfactante não-iônico, álcool etoxilato, CMC = 13 mg/g) em solo contaminado com hexadecano e fenantreno não afetou a taxa de mineralização destes hidrocarbonetos quando empregado em concentrações abaixo da CMC (2 mg/g). No entanto, quando empregada uma concentração próxima da CMC (10 mg/g), verificou-se um retardo na mineralização de hexadecano e total inibição na mineralização de fenantreno. Entretanto, quando se adicionou o surfactante em concentração acima da CMC (40 mg/g), verificou-se total inibição na mineralização desses hidrocarbonetos.

Segundo os autores, a partir de análise molecular verificou-se que a adição de surfactante de fato causou mudança drástica nas populações microbianas presentes no solo contaminado. Essa mudança coincidiu com a inibição da mineralização de hidrocarbonetos, o aparente desaparecimento de um grupo de populações degradadoras de hidrocarbonetos e o aparecimento de populações capazes de degradar tanto surfactante quanto hexadecano. Isso demonstrou a dinâmica da população microbiana no sistema contaminante-solo. A aplicação de surfactantes em concentração próxima ou acima da CMC resultou em significante redução na taxa de degradação de compostos orgânicos não-polares por microrganismos.

SEABRA (1997) buscou tratar areia contaminada com óleo diesel GOR 86 em colunas (100 cm de altura e 6 cm de diâmetro). Nesse meio poroso adicionou-se um *pool* microbiano e uma solução RESOL 30 (mistura de tensoativos aniônicos e não-iônicos). Foram usadas duas soluções com diferentes concentrações em matéria ativa da mistura 0,05 e 1% em peso seco.

O autor verificou que a eficiência de remoção de óleo alcançada na etapa da biodegradação foi maior nos ensaios em que se realizou a lavagem da areia com surfactantes (RESOL 30 a 1%). A presença de um menor teor de óleo residual na areia tratada, facilitou a sua biodegradação, em função de uma melhor disponibilidade de nutrientes e oxigênio, além de apresentar uma menor toxicidade. O uso de RESOL 30 a 0,05%, na etapa de estímulo à biodegradação, apresentou efeito positivo na porcentagem de biodegradação dos hidrocarbonetos, no caso em que o teor de óleo residual na areia foi pequeno. Isso ocorreu nos testes em que houve a etapa preliminar de lavagem com RESOL 30 a 1%. Nos testes sem a etapa de lavagem com RESOL 30 a 1%, a solução de tensoativo (RESOL 30 a 0,05%), utilizada na etapa de estímulo à

biodegradação, foi provavelmente usada como substrato de mais fácil metabolização, em detrimento dos hidrocarbonetos aromáticos, principalmente os poliaromáticos.

Segundo o mesmo autor, houve aparentemente uma degradação biológica dos tensoativos aniônicos ao se analisar seus teores nos efluentes das duas colunas acompanhadas. Em resumo, o emprego da etapa preliminar de lavagem com RESOL 30 a 1% foi benéfico à etapa de estímulo a biodegradação. Além disso, o uso da solução RESOL 30 a 0,05%, durante a etapa de estímulo a biodegradação, só apresentou efeitos positivos quando os teores de óleo residual foram baixos. Enfim, a técnica de inundação do solo com surfactantes deve ser empregada nos sítios em que a hidrogeologia possa garantir que toda a zona contaminada seja atingida pela solução de surfactantes, e que possa ser totalmente recuperada.

A seguir são apresentados alguns critérios de seleção de surfactantes com o propósito de avaliar seu desempenho.

2.5.1.5 Critério de Seleção de Surfactantes

É necessária uma avaliação cuidadosa dos surfactantes empregados na remediação de ambientes contaminados em função das características do solo, da água subterrânea e do próprio contaminante, no sentido de se obter bons resultados. As características desejáveis de um surfactante são as seguintes:

a) Propensão Mínima de Formar Cristais, Géis e Macroemulsões: surfactantes podem precipitar na solução formando cristais, géis e macroemulsões. Estas fases impedem o transporte através de aqüíferos, tampa os poros e reduzem a permeabilidade do aqüífero. A adição de co-solvente ou co-surfactante minimizará a formação dessas fases indesejáveis. A formação dessas podem ser limitadas pelo uso de surfactante com uma cauda hidrofóbica ramificada (NFESC, 2002);

b) Rápida Coalescência: quando uma solução de surfactante e DNAPL se misturam, uma microemulsão é formada com pequenas gotas de DNAPL suspensas em micelas de surfactante, que está dispersa na fase aquosa. Um importante parâmetro para seleção de surfactante é a rápida coalescência das misturas surfactante-DNAPL em microemulsões termodinamicamente estáveis. Surfactantes com tempo de coalescência de menos de 24 horas são desejáveis (NFESC, 2002);

c) Elevada Solubilização do Contaminante: o surfactante deve ser capaz de aumentar a solubilidade efetiva do contaminante em muitas ordens de grandeza acima da solubilidade normal do mesmo na água, enquanto que minimiza a possibilidade deste se mobilizar. Isso reduzirá o uso excessivo de surfactante (NFESC, 2002);

d) Ambientalmente Aceitável: informações quanto a sua biodegradabilidade e toxicidade seriam úteis para avaliar a segurança ambiental, em virtude de possíveis efeitos deletérios de quantidades residuais de surfactante no subsolo (NFESC, 2002);

e) Baixa Adsorção em Sólidos no Solo: sorção de surfactante nas superfícies dos minerais, como por exemplo em frações de argila, pode causar sua substancial perda e redução de sua disponibilidade e seu desempenho (MULLIGAN *et al.*, 2001). Além disso, pode reduzir a permeabilidade do contaminante no solo (NFESC, 2002). Surfactantes aniônicos são preferidos desde que apresentem baixa sorção nos contaminantes (POPE e BAVIERE, 1991 *apud* NFESC, 2002). Isso porque a carga negativa do surfactante é repelida pela carga líquida negativa dos aluminosilicatos e outros minerais que se encontram em aqüíferos aluvionais a valores típicos de pH de água subterrânea. Segundo WEST *et al.* (1992) *apud* MULLIGAN *et al.* (2001), surfactantes aniônicos e não-iônicos são menos propensos a se adsorverem no solo;

f) Baixa CMC: é desejável uma quantidade suficiente de surfactante para que a sua concentração permaneça acima da CMC após diluição e dispersão em aqüífero. O uso de surfactantes com baixa CMC permite reduzir a quantidade do mesmo empregado, enquanto que aqueles com elevada CMC necessitará uma maior quantidade de massa injetada para obter os mesmos níveis de remediação em aqüíferos (NFESC, 2002);

g) Reciclável: a possibilidade de reciclagem e reuso de surfactante pode potencialmente reduzir os custos. A capacidade de recuperar surfactante a partir de um efluente depende tanto do tamanho das moléculas do surfactante quanto do comportamento da formação de micelas. A molécula de surfactante teria que ser grande o suficiente e formar uma grande micela para permitir eficiente filtração e reciclagem, isto é, elevada remoção da água com mínima perda de surfactante durante a filtragem (NFESC, 2002).

Em suma, as características desejáveis de um surfactante podem ser: biodegradabilidade, baixa toxicidade, solubilidade em temperaturas da água subterrânea, baixa adsorção no solo, eficiência em baixas concentrações (<3%), baixa dispersão no solo, tensões superficiais reduzidas e CMC reduzida (KIMBALL, 1992 *apud* MULLIGAN *et al.*, 2001).

2.5.2 BIOSSURFACTANTES

2.5.2.1 Definições e Conceitos Básicos

Os biossurfactantes são importantes produtos que apresentam uma ampla aplicação em algumas indústrias (KOSARIC, 1996). No entanto, segundo BANAT (1995), os biossurfactantes ganharam notoriedade recentemente, em função das suas vantagens de biodegradabilidade, produção a partir de recursos renováveis e funcionalidade sob condições extremas. No entanto, existem opiniões contrárias quanto à eficácia e à economia de sua aplicação e produção. O seu emprego é principalmente focado na indústria de petróleo, onde são empregados em função da sua capacidade de emulsificação na recuperação terciária e na remediação de sítios contaminados (BANAT, 1995).

Os biossurfactantes são um grupo heterogêneo de tensoativos produzidos por microrganismos. Essas moléculas reduzem a tensão superficial, a concentração micelar crítica e a tensão interfacial em misturas contendo hidrocarbonetos e soluções aquosas. Essas propriedades criam microemulsões, em que a formação de micelas ocorre onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água ou água em hidrocarbonetos (BANAT, 1995).

Assim como os surfactantes químicos, a estrutura de biossurfactantes possui uma porção hidrofílica e hidrofóbica. A porção hidrofílica é composta de aminoácidos ou peptídeos, ânions ou cátions, ou mono-, di- ou polissacarídeos. Entretanto, BOGNOLO (1999) e MULLIGAN *et al.* (2001) relatam que os biossurfactantes são principalmente de dois tipos (aniônicos ou não-iônico) e que casos de estruturas catiônicas são encontradas naquelas contendo aminas. A porção hidrofóbica da molécula é composta por ácidos graxos de longa cadeia (MULLIGAN *et al.*, 2001), por ácidos graxos hidroxilados, saturados ou insaturados (GEORGIOU *et al.*, 1992).

Os biossurfactantes são produzidos principalmente pelo crescimento de microrganismos em meio aquoso contendo fontes de carbono, como por exemplo carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e graxas ou misturas destes. Os emulsificantes são

secretados no meio durante o crescimento dos microrganismos, facilitando o transporte de substratos insolúveis através das membranas celulares (BOGNOLO, 1999).

2.5.2.2 Classes de Biossurfactantes

Os agentes tensoativos microbianos são agrupados principalmente por sua natureza bioquímica e pela sua origem microbiana, ao contrário dos surfactantes sintéticos, os quais são geralmente classificados de acordo com a natureza do seu grupo polar (REIS, 1998). Sendo assim, os biossurfactantes podem ser classificados em 5 grupos distintos (ZAJIC e SEFFENS, 1984 *apud* BOGNOLO, 1999): glicolipídeos, lipopolisacarídeos, lipopeptídeos, fosforolipídeos e ácidos graxos.

Os glicolipídeos podem conter várias porções de açúcar tais como ramnose, trealose, sacarose e glicose (KOSARIC, 1996). Dentre os mais conhecidos pode-se citar ramnolipídeos, trealolipídeos (ou trealoselipídeos), soforolipídeos (ou soforoselipídeos) e lipídeos manosileritritol (ZAJIC e SEFFENS, 1984 *apud* BOGNOLO, 1999).

Os ramnolipídeos podem conter uma ou duas unidades de ramnose e estão ligados a uma ou duas moléculas de ácido β–hidroxidecanóico (DESAI e BANAT, 1997). Os trealolipídeos estão, em muitos casos, associados à célula (KOSARIC, 1996). ZAJIC e SEFFENS (1984) relatam que estes são principalmente produzidos por actinomicetos. São compostos constituídos de duas moléculas de ácido β–hidroxicarboxílico de cadeia longa e ramificada, ligadas aos grupamentos hidroxila dos átomos de carbono 6 e 6’ do dissacarídeo, por meio de ligação éster (DESAI e BANAT, 1997). Os soforolipídeos são produzidos principalmente por leveduras e consistem de um dímero do carboidrato soforose ligado a uma longa cadeia de ácido graxo hidroxilado (DESAI e BANAT, 1997). A Figura 9 apresenta as estruturas de ramnolipídeo, trealolipídeo e soforolipídeo.

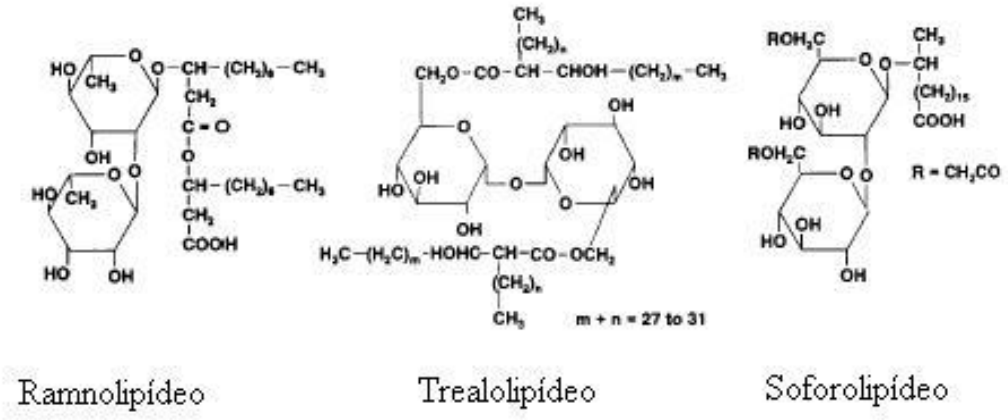


Figura 9: Estrutura de Alguns Biossurfactantes Glicolipídeos.
Fonte: DESAI e BANAT (1997)

Os lipopolissacarídeos apresentam elevado peso molecular e são emulsificantes extracelulares solúveis em água produzidos pela degradação de hidrocarbonetos por bactérias como *Acinetobacter calcoaceticus* (ZAJIC e SEFFENS, 1984 *apud* BOGNOLO, 1999). A principal característica desse bioemulsificante parece ser sua alta afinidade na interface óleo-água, sendo assim excelente estabilizador de emulsão formando um filme estável em torno da gota de óleo e prevenindo a coalescência. Além disso, acredita-se que esse biossurfactante apresente um importante papel na adaptação de microrganismos em mudanças específicas tais como adesão e adsorção da superfície e na utilização de fontes carbono e energia (KOSARIC, 1996). Um dos bioemulsificantes mais estudado é o Emulsan (Figura 10), produzido a partir de bactérias degradadoras de óleo – *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 – e é um heteropolissacarídeo polianiônico (KAPLAN e ROSENBERG, 1982; ZUCKERBERG *et al.*, 1979 *apud* KOSARIC, 1996).

A Tabela 12 apresenta algumas classes de biossurfactantes, assim como as espécies produtoras.

Tabela 12: Classificação e Origem de Biossurfactantes

Classe	Microrganismos
Trealoselipídeos	*Arthrobacter paraffineus*
	Corynebacterium spp.
	Mycobacterium spp.
Ramnolipídeos	*Pseudomonas aeruginosa*
Soforoselipídeos	*Candida apícola*
	Candida bombicola
Glicose-, frutose-, sacarose lipídeos	*Arthrobacter* spp.
	Corynebacterium spp.
	Rhodococcus erythropolis
Celobioselipídeos	*Ustilago maydis*
Poliol lipídeos	*Rhodotorula glutinus*
	Rhodotorula graminus
Lipopolisacarídeos	*Acinetobacter calcoaceticus* RAG 1
	Pseudomonas spp.
Lipopeptídeos	*Arthrobacter* sp.
	Bacillus subtilis
	Bacillus pumilis
Ornitina, lisina peptídeos	*Acidithiobacillus tiooxidans*
	Streptomyces sioyaensis
Fosfolipídeos	*A. thiooxidans*
	Corynebacterium alkanolyticum
Ácidos Graxos	*Penicillium spiculisporum*
	Corynebacterium lepus
	Arthrobacter parafineus

Fonte: MULLIGAN *et al.* (2001)

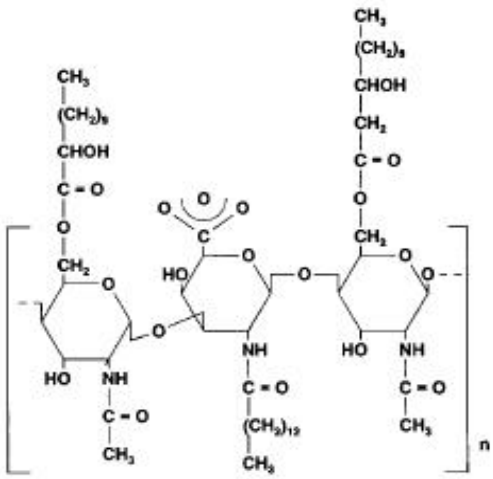


Figura 10: Estrutura do Emulsan Produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*.
Fonte: DESAI e BANAT (1997)

Um grande número de lipopeptídeos cíclicos, dentre eles antibióticos decapeptideo (gramicidina) e lipopeptideo (polimixina), apresentam notável propriedade tensoativa (DESAI e BANAT, 1997). Dentre os lipopeptídeos, destacam-se lipídeos ornitina e subtilisina (conhecida como surfactina) produzido por *Bacillus subtilis* (ZAJIC e SEFFENS, 1984 *apud* BOGNOLO, 1999). A Figura 11 apresenta um lipopeptídeo cíclico produzido por *Bacillus subtilis* ATCC 21332, sendo um dos biossurfactantes mais eficientes (ARINA *et al.*, 1968 *apud* DESAI e BANAT, 1997).

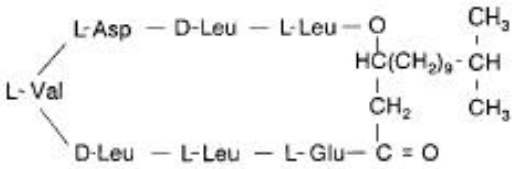


Figura 11: Estrutura de Surfactina Lipopeptídeo Cíclico Produzido por *Bacillus subtilis*.
Fonte: DESAI e BANAT (1997)

Fosfolipídeos são formados por uma molécula de glicerol unida a dois ácidos graxos, através de ligações éster, e a um grupamento fosfato que pode apresentar diferentes substituintes. Apesar deles estarem presentes em muitos microrganismos, há alguns exemplos de produção extracelular, sendo os de maior destaque os

biossurfactantes produzidos pela *Corynebacterium lepus* (ZAJIC e SEFFENS, 1984 *apud* BOGNOLO, 1999).

2.5.2.3 Principais Propriedades

Os biossurfactantes podem ser divididos em moléculas de baixo peso molecular que diminuem as tensões interfaciais e superficiais eficientemente e polímeros de alto peso molecular que unem as superfícies. Esses biossurfactantes, produzidos por uma larga variedade de microrganismos, têm estruturas químicas e propriedades superficiais muito distintas. Além disso, como apresentam diferentes propriedades superficiais e estruturais, tais emulsificantes provavelmente possibilitam vantagens em ambientes distintos (RON e ROSENBERG, 2001).

Muitos biossurfactantes apresentam propriedades antibacteriana ou antifúngica, por exemplo àqueles produzidos por *Bacillus subtilis* (lipopeptídeos da família iturina e fengicina – ação antifúngica - e surfactina - antibacteriana) (LANG, 2002), produzidos por *Candida antartica* e *Bacillus licheniformis* (atividade antimicrobiana) (KITAMOTO *et al.*, 1993 *apud* BANAT, 1994; FIECHTER, 1992). Por outro lado, os bioesmulsificantes aumentam o crescimento bacteriano em substratos hidrofóbicos pelo aumento de sua biodisponibilidade, presumivelmente pelo aumento de sua área superficial, os desorvendo das superfícies e aumentando sua aparente solubilidade. Os bioemulsificantes também apresentam um importante papel na regulação da aderência ou não de microrganismos nas superfícies (RON e ROSENBERG, 2001).

Suas propriedades de interesse são fenômenos de mudança da atividade da superfície tais como redução da tensão interfacial e superficial, ações de molhabilidade e penetração, espalhamento, hidrofilicidade e hidrofobicidade, emulsificação e desemulsificação, detergência, formação de espuma, ação floculante, gelificante, aumento do crescimento microbiano, seqüestro de metais e ação anti-microbiana (KOSARIC, 1996).

De acordo com GEORGIOU *et al.* (1992), a maioria dos biossurfactantes produzidos por via fermentativa possui a capacidade de reduzir a tensão superficial a valores inferiores a 30 mN/m e a tensão interfacial em n-alcano a valores menores que

1 mN/m. A Tabela 13 apresenta a influência de diferentes biossurfactantes na redução da tensão superficial da água e da tensão interfacial do sistema água/n-hexadecano, assim como a respectiva concentração micelar crítica.

Tabela 13: Influência de Glicolipídeos na Redução da Tensão Superficial da Água e da Tensão Interfacial do Sistema Água/n-Hexadecano.

Composto	**Tensão Superficial (mN/m)**	**Tensão Interfacial[2] (mN/m)**	**CMC (mg/L)**
Ramnolipídeo RL-2($R_2C_{10}C_{10}$)	28,8	-	110
Mistura de ramnolipídeo[1]	26,6	-	150
Soforolipídeo SL-1 (Nativo)	35	-	40
2-Tetradecil soforosida	30	-	40
Glicosil-mannosil-glicerolipídeo GGL.2	33	5	200
Surfactina	27	<1	-

Fonte: LANG (2002). [1] Tensão superficial da água (72 mN/m) influenciada por glicolipídeos a 25ºC; [2] Tensão interfacial do sistema água/n-hexadecano = 43 mN/m; [3] – $R_2C_{10}C_{10}$ + $R_1C_{10}C_{10}$ + $R_2C_{10}C_{12}$ + $R_1C_{10}C_{12}$ + $R_1C_{12:1}C_{10}$ + $R_1C_{12:2}$ + $R_1C_{8:2}$; $R_{1\ ou\ 2}$ = representa o número de unidades de ramnose e $C_{10}C_{12}$ = representa o comprimento de dois ácidos 3-hidroxi.

Pela Tabela 13 é possível verificar que surfactina diminuiu a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m e a tensão interfacial do sistema água/n-hexadecano de 43 mN/m para valores abaixo de 1 mN/m. Quanto ao glicosil-manosil-glicerolipídeo (GGL.2) produzido pela espécie *Microbacterium* diminuiu a tensão superficial da água a 33 mN/m e a tensão interfacial do sistema água/n-hexadecano a 5 mN/m

Alguns biossurfactantes também podem apresentar boas características térmicas e de estabilidade química, como por exemplo os lipopeptídeos de *Bacillus licheniformis* JF-2 que são estáveis a temperatura acima de 75ºC durante 140 horas. Além disso, são estáveis em valores de pH na faixa de 5,5 a 12, mas sob condições muito ácidas perdem sensivelmente sua atividade (LIN, 1996 *apud* REIS, 1998).

2.5.2.4 Produção de Biossurfactantes

Biossurfactantes podem ser produzidos a partir de substratos como hidrocarbonetos e carboidratos. Os microrganismos são capazes de assimilar os hidrocarbonetos excretando surfactantes iônicos que emulsificam o hidrocarboneto no meio, facilitando sua quebra pela célula. Esse mecanismo é típico de algumas espécies de *Pseudomonas* e *Torulopsis*, que produzem ramnolipídeos e soforolipídeos. No entanto, existem microrganismos que alteram a estrutura de sua parede celular pela produção de lipopolisacarídeos ou surfactantes não-iônicos. Desse grupo faz parte, *Candida lipolytica* e *Candida tropicalis* que produzem lipopolissacarídeos na parede celular quando crescem em n-alcanos (KOSARIC, 1996).

Atualmente, a produção de biossurfactantes não tem interesse comercial devido aos maiores custos do processo em relação aos surfactantes químicos. Entretanto, esses custos poderão ser reduzidos, pela utilização de fontes renováveis e de baixo custo ou pelo emprego de resíduos industriais (KOSARIC, 1996).

Dentre os parâmetros do processo que influenciam o tipo e a quantidade de biossurfactantes produzidos são: **a)** a natureza da fonte de carbono; **b)** possíveis limitações nutricionais; **c)** parâmetros físico-químicos, tais como aeração, temperatura e pH. Além disso, um outro fator importante é a seleção de organismos ou cepas potencialmente produtoras de biossurfactantes empregados no processo de produção (FIECHTER, 1992). A seguir são discutidas as influências de alguns desses parâmetros na produção de biossurfactantes.

a) <u>Fonte de Carbono</u>: A fonte de carbono é um importante parâmetro do processo. O tipo, a quantidade e a qualidade do biossurfactante produzido depende da natureza da fonte de carbono (GEORGIOU *et al.*, 1992). A mudança do substrato altera a estrutura do produto, então alterando as propriedades do surfactante. A escolha da fonte de carbono é determinada de acordo com a finalidade do biossurfactante desejado, como por exemplo em culturas de *Arthrobacter*, que produzem trealoselipídeos, mas quando crescem em sacarose produzem sacaroselipídeos. Além disso, a fonte de carbono também parece determinar se o biossurfactante é extracelular ou intracelular (SUZUKI *et al.*, 1974; ROSENBERG *et al.*, 1979 *apud* FIECHTER, 1992).

b) Limitações Nutricionais: um outro mecanismo regulador da produção de biossurfactante é nitrogênio e íons multivalentes (DESAI e BANAT, 1997). A limitação de nitrogênio é um outro parâmetro importante, assim como a natureza da fonte deste nutriente (KOSARIC, 1996) e a relação C:N que influencia a síntese de biossurfactantes (FIECHTER, 1992). Em função disso, a adição de nitrogênio tanto pode estimular quanto pode inibir a produção de surfactantes pelos microrganismos.

2.5.2.5 Parâmetros Físico-Químicos

Os fatores ambientais tais como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio afetam a produção de biossurfactantes através de seus efeitos na atividade e no crescimento celular (DESAI e BANAT, 1997).

Segundo CLARK *et al.* (1981) *apud* BANAT (1995), os microrganismos empregados para recuperação de óleo em poços produtores resistiram a altas temperaturas, pressões e salinidade, ademais seriam capazes de crescer sob condições microaerofílicas e anaeróbias. Estimou-se que 50-70% dos poços de óleo nos EUA poderiam suportar crescimento microbiano com pH entre 4 a 8, temperaturas abaixo de 75ºC e salinidade abaixo de 10%. Observação similar foi feita por ROCHA *et al.*, 1992 *apud* BANAT, 1994, cujos autores relatam que os biossurfactantes (ramnolipídeos) não foram afetados por extremos valores de pH, temperatura, salinidade e de concentração de cálcio ou magnésio em alguns reservatórios de óleo na Venezuela.

Quanto ao pH a produção máxima de ramnolipídeo por *Pseudomonas* spp. ocorreu entre os valores de 6,0-6,5 e um decréscimo em pH 7. Por outro lado, a produção de penta e dissacarídeolipídeo por *Nocardia corynbacteroides* não foi afetada entre os valores de pH 6,5 a 8 (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; .POWALLA *et al.*, 1989 *apud* DESAI e BANAT, 1997).

Em relação à temperatura, a produção de surfactina por uma linhagem recombinante de *Bacillus subtilis* MI113 atingiu um valor máximo a 37ºC. OHONO *et al.* (1995) *apud* REIS (1998) verificaram baixo rendimento para a produção do biossurfactante em temperaturas acima e abaixo desse valor.

2.5.2.6 Aplicação de Biossurfactantes na Biorremediação

Segundo BAI *et al*. (1997), os biossurfactantes têm despertado um grande interesse na remediação de solos, posto que apresentam uma estrutura química que pode ter propriedades benéficas para a remediação, são produtos biodegradáveis, o que os tornam aceitáveis na aplicação em ambientes contaminados, a produção *ex situ* destes pode conferir um baixo custo em comparação aos surfactantes sintéticos e além disto, pode-se possivelmente estimular a produção *in situ* de biossurfactantes no ambiente contaminado.

Segundo KIRSHNER *et al.* (1980), existem dois tipos de interações dos hidrocarbonetos com os microrganismos durante a biodegradação: adesão ao óleo e uma hipotética pseudosolubilização em que bactérias hidrocarbonoclásticas assimilam pequenas gotas de óleo emulsificado.

Além disso, em função da diversidade de ambientes, existem alguns fatores que dificultam a remoção de poluentes do solo, tais como: **a)** compostos altamente hidrofóbicos que são irreversivelmente adsorvidos no solo, diminuindo a biodisponibilidade do contaminante; **b)** microrganismos introduzidos no local contaminado, são freqüentemente adsorvidos ao solo, dificultando o contato com os contaminantes e limitando a mobilidade microbiana (KITAMOTO *et al.*, 2002).

Os biossurfactantes com elevada atividade emulsificante, dispersante ou de solubilização, auxiliam a liberação de contaminantes que se encontram adsorvidos no solo, aumentando assim a sua biodisponibilidade e biodegradação (KITAMOTO *et al.*, 2002).

ROSENBERG e ROSENBERG (1981) *apud* BARATHI e VASUDEVAN (2001), relatam que o crescimento de bactérias em ambientes com hidrocarbonetos é geralmente acompanhado pela produção de surfactantes que auxiliam na aderência das células às gotas de óleo. Tal afirmativa foi observada por BARATHI e VASUDEVAN (2001) que verificaram a produção de biossurfactantes medindo a tensão superficial durante o período de crescimento dos microrganismos (*Pseudomonas fluorescens*) isolados de um solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. Segundo os autores,

essa espécie poderia desempenhar uma importante função na biorremediação de solos e ecossistemas aquáticos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.

HUA *et al.* (2003) investigaram a influência do biossurfactante BS-UC nas propriedades superficiais de células microbianas e na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. O biossurfactante BS-UC foi produzido por *Candida antarctica* utilizando n-undecano como substrato. Os autores verificaram que a adição de BS-UC influenciou positivamente a emulsificação e a biodegradação de uma variedade de substratos de n-alcanos. A eficiência de biodegradação de mistura de n-alcanos foi 82%, em biorreatores de leito fixo com BS-UC, contra 68%, naqueles sem biossurfactante. Além disso, BS-UC também alterou a hidrofobicidade e o potencial zeta da superfície celular e proporcionou a adesão da célula microbiana ao substrato hidrofóbico. O teste em coluna também indicou que a adição de BS-UC melhorou a retenção da célula no meio. Ademais, a biodegradação de hidrocarbonetos pela adição de biossurfactante seria vantajosa caso os hidrocarbonetos apresentassem estruturas similares àquelas do substrato que deu origem ao biossurfactante BS-UC. HUA *et al.* (2003) determinaram também o efeito da adição de surfactantes químicos (Span 80 e Tween 40), verificando que não houve efeito positivo na adição de surfactantes químicos na biodegradação de n-undecano.

SCHIPPERS *et al.* (2000) avaliaram a influência da mistura de soforolipídeos na biodegradação de fenantreno, por *Sphingomonas yanoikuyae*, em meio líquido (frascos Erlenmeyer) e em suspensão contendo 10% de solo (biorreatores). A mistura de soforolipídeos foi produzida por *Candida bombicola* ATCC 22214. O solo empregado nos ensaios em biorreatores apresentava a seguinte distribuição granulométrica: 31% areia, 59% silte e 10% argila, sendo classificado como solo siltoso-arenoso. Para controle abiótico o solo foi esterilizado com 1% NaN_3.

Os autores verificaram nos ensaios em biorreatores que a taxa máxima de biodegradação de fenantreno após 24 horas, para diferentes concentrações de biossurfactante (0, 2, 25, 100, 500 mg/L), foi 16 mg/L.h contra 2 mg/L.h no biorreator de controle, com 500 mg/L de soforolipídeos produzidos. Quanto aos ensaios em frascos, a eficiência máxima de degradação de fenantreno foi aproximadamente 90%, com 55 mg/L de sorofolipídeo produzidos em 24 horas, enquanto que nos frascos onde

não houve adição deste biossurfactante esta eficiência foi 60%. Assim sendo, os melhores resultados observados nos ensaios foram aqueles em que se empregou soforolipídeos.

Além disso, os autores observaram que a CMC do biossurfactante foi muito maior no solo que no meio líquido, pois as moléculas deste foram adsorvidas nas partículas do solo, e o efeito tóxico do biossurfactante dependeu fortemente das condições experimentais empregadas.

GOGOI *et al.* (2003) conduziram experimentos em laboratório dentre eles a dessorção e biodegradação de óleo cru em solo (teor de areia 68-79% e argila-silte 25-31%). Os autores avaliaram o efeito de biossurfactante (ramnolipídeo isolado de *Pseudomonas sp.*) e surfactante químico (Tween 80, não-iônico) na dessorção e degradação em biorreatores de lama operados por 48 horas. Foram realizados dois ensaios: **a)** dessorção - 5 g de solo contaminado foram introduzidos no frasco em 150 mL de meio aquoso e foram posteriormente agitados em um shaker; **b)** biodegradação – foi estimada a partir do teor de óleo no solo (em base seca), antes e após o tratamento. Nesse ensaio de biodegradação, foi inoculado no solo um consórcio microbiano. O teor de óleo no sobrenadante foi determinado por método gravimétrico (teor de óleos e graxas).

Os autores verificaram que o efeito de ambos os surfactantes proporcionou aumento na dessorção de hidrocarbonetos da matriz do solo, 13,27% em solo esterilizado, 71,05% e 77,27% em solo tratado com biossurfactante e Tween 80, respectivamente. Quanto ao percentual de biodegradação, em solos bioaumentados, os resultados se mostraram semelhantes tanto para biossurfactantes quanto para Tween 80, aproximadamente 29%, e para solos sem adição de surfactantes, este percentual foi 21%.

2.6 VANTAGENS E DESVANTAGENS QUANTO AO EMPREGO DE SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES NA BIORREMEDIAÇÃO

Os surfactantes químicos têm sido empregados na indústria de petróleo, por exemplo para aumentar a recuperação de petróleo (BANAT, 1995). No entanto, nos últimos anos tem crescido o interesse quanto ao uso de biossurfactantes, visto que estes apresentam vantagens tais como baixa toxicidade e alta biodegradabilidade tornando-os compatíveis ao meio ambiente (DESAI e BANAT, 1997).

Além disso, apresentam capacidade de atuação até mesmo em valores extremos de temperatura, pH e salinidade (KOSARIC, 1996). Por exemplo, alguns biossurfactantes não são afetados por temperatura elevada como 90ºC. Os biossurfactantes não são precipitados acima de 10% de solução salina, enquanto que 2-3% de sal é suficiente para desativar surfactantes químicos (KRETSCHMER *et al*., 1982; BOGNOLO, 1999).

Em função disso, há interesse no possível uso de surfactantes biológicos na mobilização de óleo cru pesado, transporte em oleodutos, gerenciamento em derrames, controle de poluição, limpeza de borras oleosas em tanques de estocagem, biorremediação de solos e aumento na recuperação de óleo estimulada microbiologicamente (MEOR – *microbial enhanced oil recovery*). A MEOR apresenta vantagens quanto ao baixo custo, energia e química (SARKER *et al.*, 1989 *apud* BANAT, 1995).

Os efeitos positivos de surfactantes podem resultar na estimulação da taxa de dissolução ou desorsão, assim como na dispersão, solubilização ou emulsificação de substratos pouco solúveis. No entanto, os efeitos negativos podem ser em função de sua toxicidade ou biodegradação preferencial. Além disso, podem reduzir o contato das células aos substratos que estão presentes como uma fase separada, que pode diminuir a taxa de degradação caso o contato seja necessário para que ocorra a quebra (VOLKERING *et al.*, 1995; CHURCHILL e CHURCHILL, 1997 *apud* NOORDMAN *et al.*, 2002).

O custo da produção de biossurfactantes é cerca de 3 a 10 vezes maior que os surfactantes químicos com propriedades equivalentes (ROSENBERG, 1993 *apud* DESAI e BANAT, 1997). Entretanto, dependendo da sua especificidade o uso de biossurfactante pode ser vantajoso, pois são produtos não tóxicos ao ambiente. Devido ao alto custo de produção uma estratégia para simplificar a atuação dos biossurfactantes é o emprego de mosto fermentado com células inativadas, eliminando assim os custos relativos à fase de extração, concentração e purificação do biossurfactante (SANTA ANNA, 2002). No entanto, a possibilidade do emprego de resíduos industriais na produção de biossurfactantes viabilizaria ainda mais o processo pela redução de seu custo (KOSARIC, 1996). A Tabela 14 apresenta uma comparação dos custos entre surfactantes biológicos e químicos.

Tabela 14: Comparação dos Custos entre Surfactantes Biológicos e Químicos.

Tipo		Custo (US$/kg)
Biossurfactantes		
R. erythropolis		12.20
P. aeruginosa		5.90
T. bombicola		2.80
B. subtilis		20.30
Surfactantes (aniônico)		
Dodecilbenzeno (detergente alquilado)		1.03
Lauril sulfato de sódio	30%	0.95
	98%	26.00

Fonte: SANTA ANNA (2002)

Por conseguinte, o uso de surfactantes e de biossurfactantes dependerá do objetivo de destino e de seu custo, visto que apresentam propriedades similares.

2.7 TOXICIDADE DE SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

A toxicidade de surfactantes é um dos parâmetros importantes que determinam sua adequabilidade para aumentar a biodegradação. De acordo com CSERHATI *et al.* (1991) *apud* TIEHM e STIEBER (2001), a toxicidade dos surfactantes às bactérias do solo está relacionada ao balanço hidrofílico-lipofílico (HLB). O valor de HLB descreve a lipofilicidade de um surfactante, ou seja, este valor indica se um surfactante formará

emulsões *água-em-óleo* ou *óleo-em-água* (DESAI e BANAT, 1997), como visto na Figura 7. A lipofilicidade diminui com o aumento do HLB (CSERHATI *et al.*, 1991). Sendo assim, emulsificantes com valores de HLB menores do que 6 favorecem a estabilização de emulsão *água-em-óleo*, ao passo que emulsificantes com valores entre 10 e 18 favorecem a emulsão *óleo-em-água* (DESAI e BANAT, 1997). KANTIN (1980) *apud* REIS (1998) relata que os compostos tensoativos agem sobre a membrana citoplasmática desnaturando as proteínas celulares e alterando o equilíbrio osmótico. A toxicidade está provavelmente relacionada à estrutura molecular, pois moléculas contendo cadeias ramificadas, com número de átomos de carbono maior que 16, ou anéis aromáticos são as mais tóxicas.

Os surfactantes químicos tendem ser tóxicos aos microrganismos, o que acarreta diminuição das taxas de degradação dos contaminantes. Em contrapartida, geralmente, os biossurfactantes são mais biodegradáveis e menos tóxicos que os surfactantes químicos (RISER-ROBERTS, 1998).

Os surfactantes apresentam diferentes graus de toxicidade, destacando-se os compostos catiônicos como os mais nocivos, normalmente também apresentam acentuada atividade bactericida. Em menor grau, estão os compostos aniônicos seguidos dos não iônicos, os quais apresentam variação de toxicidade em função de sua estrutura química (KANTIN, 1980 *apud* REIS, 1998).

Em relação aos efeitos tóxicos dos biossurfactantes na população aquática de rios e mares, existem vários estudos comparando o comportamento dos biossurfactantes com os surfactantes químicos. LANG e WAGNER (1993) descreveram várias metodologias para avaliar a toxicidade dos biossurfactantes em ambientes aquáticos, tais como: peixes, *daphnia* e/ou algas; testes de germinação; testes enzimáticos; bioluminescência de bactéria. Esses autores mostraram o comportamento comparativo de toxicidade dos biossurfactantes e dos surfactantes químicos em quantidades relacionadas as suas CMC com adição de óleo cru, utilizando microrganismos marinhos do tipo *Corophium volutator* e microcrustáceos como artemia. Os resultados mostraram baixa toxicidade dos biossurfactantes tais como, os ramnolipídeos (28% de mortalidade) em relação ao surfactante químico aniônico, Corexit (95% de mortalidade) para *C. volutator*.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 METODOLOGIAS

Inicialmente, foi levantada uma série de metodologias para a caracterização dos solos argiloso e arenoso. O mesmo foi feito para avaliar as propriedades do biossurfactante empregado neste trabalho. Além disso, essas metodologias serviram para monitorar a biodegradação do óleo diesel e a população microbiana nos solos em estudo. É importante ressaltar que todos os ensaios foram realizados no mínimo em duplicata, a fim de garantir a confiabilidade dos dados levantados.

3.1.1 TEOR DE MATÉRIA ORGÂNICA

O teor de matéria orgânica presente nas amostras de solo foi determinado de acordo com o método de WALKEY e BLACK (1934) *apud* JARAMILLO (1996), que consiste num procedimento indireto por meio do qual se determina o teor de carbono da matéria orgânica. Esta quantificação foi realizada por combustão úmida, empregando-se o ácido crômico como oxidante (resultante da reação do dicromato de potássio com o ácido sulfúrico).

O dicromato de potássio residual, que permanece após a reação de oxidação, é titulado com uma solução de sulfato ferroso 0,5 N. Segundo a metodologia, 77% do carbono total da matéria orgânica é oxidado nas condições do ensaio, obtendo-se uma aproximação aceitável do conteúdo de carbono orgânico no solo. Para a conversão de matéria orgânica a carbono, considera-se que 58% da matéria orgânica é formada por carbono orgânico (JARAMILLO, 1996). Um ensaio em branco foi feito sem a adição de solo, para se descontar qualquer carbono orgânico presente nos reagentes.

O cálculo do teor de matéria orgânica (% m/m) das amostras de solo foi realizado segundo a Equação 3.1.

$$\%MO = V_{dicromato} * \left(1 - \left(\frac{V_{amostra}}{V_{branco}}\right)\right) * K \quad \text{(Equação 3.1)}$$

Onde:

%MO = teor de matéria orgânica

$V_{dicromato}$ = volume de dicromato de potássio utilizado [mL]

$V_{amostra}$ = volume de sulfato ferroso 0,5 N utilizado na titulação da amostra [mL]

V_{branco} = volume de sulfato ferroso 0,5 N utilizado na titulação do branco [mL]

K = N*(0,003/0,77)*(100/*m*)*1,72

1,72 = fator de conversão do carbono na matéria orgânica

Sendo que: N = normalidade da solução de dicromato de potássio

0,003 = miliequivalente grama do carbono

m = massa da amostra de solo [g]

0,77 = fator de conversão (77% do carbono total da matéria orgânica é oxidado)

3.1.2 TEOR DE HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO (TPH)

A dosagem de TPH tem sido o método mais específico para análise de solo contaminado com óleo. Esse método utiliza o solvente S-316 para extrair o óleo do solo e um espectrofotômetro de infravermelho (equipamento OCMA-350), no qual é realizada a leitura da amostra (HORIBA, 1995). O equipamento opera numa faixa de comprimento de onda de 3,38 a 3,50 μm, sendo capaz de medir as configurações CH (3,38 μm), CH_2 (3,42 μm) e CH_3 (3,50 μm) (EPA, 2001).

Para extrair os hidrocarbonetos totais de petróleo, foi utilizado 0,2 grama de solo seco em 20 mL de solvente S-316 em um recipiente de vidro devidamente limpo. Essa extração foi feita a frio por banho de ultra-som durante 1 hora. Após a extração, a solução resultante foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 40 com 2 gramas de sílica gel (60 a 200 *mesh*). A leitura é feita no equipamento OCMA-350, devidamente calibrado.

3.1.3 TEOR DE NITROGÊNIO TOTAL

A determinação de nitrogênio nas amostras de solo foi feita pelo método descrito por JARAMILLO (1996). Esse método consiste em uma modificação do método de Kjeldahl para que a análise inclua os nitratos presentes na amostra. Através deste ensaio, o nitrogênio orgânico e os nitratos são convertidos a sulfato de amônio, destilados e coletados em ácido bórico. Em seguida, procedeu-se a titulação com solução de HCl 0,1 N, utilizando-se vermelho de metila como indicador. Um ensaio em branco, sem adição de solo, foi feito para eliminar a possível interferência causada pela presença de nitrogênio nos reagentes utilizados.

O teor de nitrogênio é calculado de acordo com a Equação 3.2.

$$\boxed{\%N = \left(\frac{V_{HCl}^{amostra} - V_{HCl}^{branco}}{m}\right) * 0{,}1 * 1{,}4} \quad \text{(Equação 3.2)}$$

Onde:

$\%N$ = teor de nitrogênio na amostra [% m/m]

$V_{HCl}^{amostra}$ = volume de HCl gasto para titular as amostras de solo [mL]

V_{HCl}^{branco} = volume de HCl gasto para titular o branco [mL]

m = massa de solo amostrada [g]

0,1 = normalidade de HCl

1,4 = fator de conversão

3.1.4 TEOR DE FÓSFORO TOTAL

O teor de fósforo total foi medido segundo metodologia descrita por JARAMILLO (1996), com algumas modificações, visando adequar o método ao tipo de solo estudado. Com isso, pesou-se 13 gramas de solo e adicionou-se 91 mL de solução extratora, contendo fluoreto de amônio 1 N em solução ácida diluída (HCl). Este procedimento tem por finalidade extrair do solo as formas de fósforo facilmente solúveis em meio ácido, assim como grande parte dos fosfatos de cálcio e uma fração dos fosfatos de alumínio e ferro devido à formação de complexos com os íons metálicos

quando se encontram em solução ácida. Em geral, esse método permite a obtenção de bons resultados em solos ácidos, neutros e ligeiramente alcalinos (JARAMILLO, 1996*)*.

Após um período de 24 horas de contato entre o solo estudado e a solução extratora, o extrato obtido foi centrifugado e posteriormente filtrado em membrana Millipore (0,45 μm de poro). Em seguida, adicionou-se a 35 mL do extrato, 10 mL de uma solução de molibdato vanadato (1 N) e o volume completado para 50 mL. Após 10 minutos, foi feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro marca HACH modelo DR/2000 no comprimento de onda de 450 nm. A concentração de fósforo total foi obtida de acordo com curva-padrão previamente preparada, empregando-se KH_2PO_4 como padrão. O teor de fósforo foi calculado de acordo com a Equação 3.3.

$$\boxed{P = \left(\frac{C_{extrato} * V_{extratora}}{m_{solo} * 1.000} \right)} \quad \text{(Equação 3.3)}$$

Onde:

P = teor de fósforo no solo [g/kg]

$C_{extrato}$ = concentração de fósforo total [mg/L]

$V_{extratora}$ = volume utilizado da solução extratora [mL]

m_{solo} = massa de solo [g]

1000 = fator de conversão

3.1.5 pH

O pH do solo foi medido através do método potenciométrico descrito por JARAMILLO (1996), utilizou-se um medidor de pH (QUIMIS), previamente calibrado com solução tampão (pH 7,0 e 4,0). Essa técnica permitiu a dosagem do pH real do solo, utilizando-se água destilada.

3.1.6 TEOR DE UMIDADE TOTAL

A determinação do teor de umidade total foi realizada através de método gravimétrico, empregou-se a balança IV2000 Gehaka, que utiliza um sistema de secagem por infravermelho e fornece automaticamente o teor de água presente na amostra.

3.1.7 CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA

O ensaio foi realizado segundo metodologia adaptada de WATWOOD *et al.* (1991). Para se medir a capacidade de retenção de água, 20g de solo foi transferido para um funil com papel de filtro e o conjunto foi suportado em uma proveta de 1 L de capacidade. A essa proveta foi adicionada água até que se atingisse o nível do solo no funil. Depois de observada a condição de saturação do solo por capilaridade, retirou-se a água da proveta e deixou-se escoar toda água presente no solo por aproximadamente 15 minutos. Não sendo mais observado o gotejamento de água do solo, foi retirada uma amostra e feita a medida do teor de umidade do solo (U_{final}) conforme apresentado na Seção 3.1.6. O cálculo para determinação da capacidade de retenção de água é obtido a partir da equação 3.4 que depende também da determinação da umidade natural do solo ($U_{natural}$).

$$\boxed{CRA = \left(\frac{U_{final} - U_{natural}}{U_{natural}} \right) * 100} \quad \text{(Equação 3.4)}$$

Onde:

CRA = capacidade de retenção de água [%]

$U_{natural}$ = teor de umidade natural do solo [%]

U_{final} = teor de umidade do solo final [%]

3.1.8 DENSIDADE CELULAR

3.1.8.1 Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias

A avaliação da densidade de bactérias heterotróficas totais foi feita pelo método do espalhamento em superfície (*spread plate method*). Uma amostra inicial de solo (20 g) foi adicionada a uma solução salina (0,85% NaCl) e colocada sob agitação por 30 minutos para a extração das bactérias presentes. Em seguida, com o sobrenadante foram preparadas diluições em solução salina (0,85% NaCl) variando de 10^{-1} a 10^{-7} e, a partir de cada diluição, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para placa de Petri contendo meio de cultura TSA (*Tryptic Soy Agar*). A alíquota foi espalhada na superfície do meio de cultura com auxílio de uma alça de Drigalsky, método *Spread-Plate*. Em seguida, as placas foram incubadas a 30ºC durante 48 horas e após este período, as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC (unidade formadora de colônia) por grama de solo seco. Na Tabela 15 é apresentada a composição do meio TSA utilizado.

Tabela 15: Composição do Meio TSA (DIFCO™)

Componentes	Quantidade (g/L)
Hidrolisado Enzimático de Caseína	5,0
Extrato de Lêvedo	2,5
Dextrose	1,0
Agar	9,0

3.1.8.2 Bactérias Hidrocarbonoclásticas

A contagem de bactérias hidrocarbonoclásticas foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP) (VOLPON *et al.*,1997). Para esse procedimento também foram preparadas diluições de até 10^{-7} em solução salina (NaCl 0,85%) e, de cada uma delas, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL para 5 poços de uma placa com 24 poços, contendo 1,7 mL de meio mineral *Bushnell Haas*, cuja composição se encontra na Tabela 16, e 5 μL de óleo. As placas foram incubadas a 30ºC durante 7 dias e o crescimento foi avaliado visualmente. Ao se observar alguma modificação em relação ao teste em branco, considerou-se o teste como positivo. Os resultados foram expressos em NMP/g de solo seco. O teste em branco consiste da adição de meio estéril a 4 poços da placa, seguido da adição do óleo também estéril. Dessa forma, pode-se descontar qualquer efeito que não seja causado pela presença dos microrganismos a serem quantificados.

Tabela 16: Composição do Meio Mineral *Bushnell Haas*

Componentes	Quantidade (g/L)
Sulfato de magnésio	0,20
Cloreto de cálcio	0,02
Fosfato de potássio monobásico	1,00
Fosfato de potássio dibásico	1,00
Nitrato de amônio	1,00
Cloreto férrico	0,05

Fonte: SIGMA (1997)

3.1.8.3 Bactérias Heterotróficas Totais Anaeróbias

A contagem de bactérias anaeróbias foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP) (HARRISON JR., 1982) e os resultados foram expressos em NMP/g de solo seco. Para tanto, 10 g de solo foram distribuídos em frasco do tipo penicilina de 50 mL de capacidade contendo 40 mL de solução redutora (Tabela 17). A seguir, uma alíquota de 1 mL de suspensão celular obtida foi diluída de 10^{-1} até 10^{-10} também em solução redutora contida em frascos de penicilina com 10 mL de capacidade. Logo após, uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida para

frascos do tipo penicilina contendo 9 mL de Meio Fluido ao Tioglicolato (Merck). Os frascos foram incubados por 4 dias a 30±1ºC e o crescimento foi avaliado visualmente pelo turvamento do meio. O tempo de incubação empregado nesse ensaio foi suficiente para verificar a densidade de população microbiana anaeróbia, visto que foram feitos ensaios em duplicata para avaliar o tempo de crescimento desta população e verificou-se que após o 4º dia não foi observada variação quanto ao crescimento de bactérias anaeróbias.

Tabela 17: Composição da Solução Redutora

Componentes	Quantidade
Ácido ascórbio	0,1 g/L
Resarsurina	4,0 mL/L
Tioglicolato de sódio (VETEC)	0,124 g/L

3.1.9 TESTE DE BIODEGRADABILIDADE E DE ECOTOXICIDADE DO BIOSSURFACTANTE

De acordo com a literatura, os biossurfactantes apresentam toxicidade inferior ao ambiente comparável aos surfactantes sintéticos. Com o objetivo de avaliar a biodegradabilidade e a toxicidade do biossurfactante empregado nos experimentos, foram realizados três ensaios: teste de biodegradabilidade imediata, teste de mortalidade de minhoca e teste de atividade desidrogenásica para avaliação da atividade microbiana.

3.1.9.1 Teste de Biodegradabilidade Imediata

Esse teste avalia a biodegradabilidade imediata de uma substância orgânica hidrossolúvel e não-volátil, permitindo a determinação da biodegradação total (IBAMA, 1988).

O biossurfactante, empregado nos experimentos como única fonte de carbono e de energia, foi submetido a metabolização por uma cultura mista de microrganismos oriundos de esgoto sanitário, numa solução nutriente mineral definida. Posteriormente, o biossurfactante foi diluído em solução-nutriente a 100-200 mg DQO/L. O pH da solução foi ajustado para 7. Em uma proveta de 1 L de capacidade foi transferido 450

mL da solução e 50 mL de esgoto sanitário. O sistema foi aerado e um volume de 10 mL de amostra foi coletado, diariamente, de cada proveta para determinação da DQO-solúvel num intervalo de 7 dias. O grau de decaimento da concentração de matéria orgânica solúvel, medida como Demanda Química de Oxigênio (DQO), informou se a substância é biodegradável ou biorresistente, num intervalo de tempo de 7 dias. A determinação do decaimento da DQO-solúvel, neste tipo de teste, permite a avaliação da biodegradação do biossurfactante.

3.1.9.2 Teste de Mortalidade de Minhocas

Este teste empregou um anelídeo da espécie *Eisenia foetida*, uma minhoca vermelha que tem sido amplamente empregada para avaliar a toxicidade de vários compostos (YERUSHALMI *et al.*, 2003). O método empregado foi uma adaptação da metodologia descrita no Guia para Testes Químicos nº207 (OECD, 1984). Os ensaios de toxicidade do biossurfactante foram realizados diretamente nos diferentes tipos de solo virgem (argiloso e arenoso) e, após 7 dias, a porcentagem de organismos sobreviventes foi quantificada. Foram pesados e misturados 200 g de solo e 20 g de esterco. Os teores de biossurfactantes avaliados foram 15 e 30 mg/L para o solo arenoso e 30 e 60 mg/L para o solo argiloso, sendo o volume empregado equivalente a 50% da capacidade de retenção de água do solo. Além disso, foi feito também um ensaio sem a adição biossurfactante visando avaliar a influência do biossurfactante na mortalidade de minhocas nos diferentes experimentos realizados.

Para esse ensaio foram empregadas 10 minhocas para cada amostra de solo. Os solos foram acondicionados em recipientes de vidro envoltos com papel (Figura 12) a fim de reproduzir o ambiente natural das minhocas, visto que estas são sensíveis à luminosidade direta. Visando evitar a fuga das minhocas, os recipientes foram tampados com um tecido (*Perfex*), fixados com um elástico e acondicionados em local seco, a temperatura ambiente.

Figura 12: Recipientes de Vidro Empregados no Teste de Mortalidade de Minhocas.

3.1.9.3 Determinação da Atividade Desidrogenásica

A atividade desidrogenásica tem sido a melhor correlação entre a remoção de hidrocarbonetos e a produção de CO_2 em muitos solos (RISER-ROBERTS, 1998).

O método empregado é uma adaptação da metodologia descrita por ALEF e NANNIPIERE (1995). Nesse ensaio, os efeitos tóxicos são determinados pelo decréscimo da atividade da enzima desidrogenase. As desidrogenases são enzimas da membrana envolvidas no processo de transporte de elétrons que é acoplado à síntese de ATP que por isto podem ser empregadas como medida da atividade biológica (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). O método é baseado na estimativa da taxa de redução de trifeniltetrazolium clorídrico (TTC) a trifenil formazan (TPF) após incubação dos solos a 30ºC por 24 horas. O TTC funciona como um aceptor artificial de elétrons, sendo portanto um dos métodos mais freqüentemente usado para se estimar a atividade desidrogenásica do solo (ALEF e NANNIPIERE, 1995).

Neste teste, para se avaliar a influência do biossurfactante na atividade microbiana, empregou-se o solo proveniente do inóculo aeróbio cuja população de bactérias heterotróficas totais era $7{,}7 \times 10^6$ UFC/g solo e a atividade desidrogenásica era $235{,}7 \pm 14{,}8$ μg TPF/g.

Em um frasco âmbar foram adicionados 5 g de solo, 1 mL de biossurfactante e 5 mL de solução de TTC. As concentrações de biossurfactante avaliadas foram 15, 30 e 60 mg/L, correspondendo àquelas empregadas nos experimentos de biorremediação. Posteriormente, os frascos foram fechados e mantidos em uma estufa a 30ºC por 24 horas. Após a incubação, foram adicionados 40 mL de metanol em cada frasco para extração do TPF. Posteriormente, agitou-se o frasco por mais alguns minutos e transferiu-se o conteúdo do mesmo para tubos de centrífugas. Para melhorar a extração do TPF, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos. As amostras foram filtradas com algodão e em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro a 485 nm. Além disso, foi feito também um ensaio sem a adição biossurfactante visando avaliar a influência do biossurfactante no desenvolvimento de cor nos diferentes experimentos. A Figura 13 apresenta a coloração da amostra após a filtração e quanto mais intensa a cor, maior é a atividade microbiana.

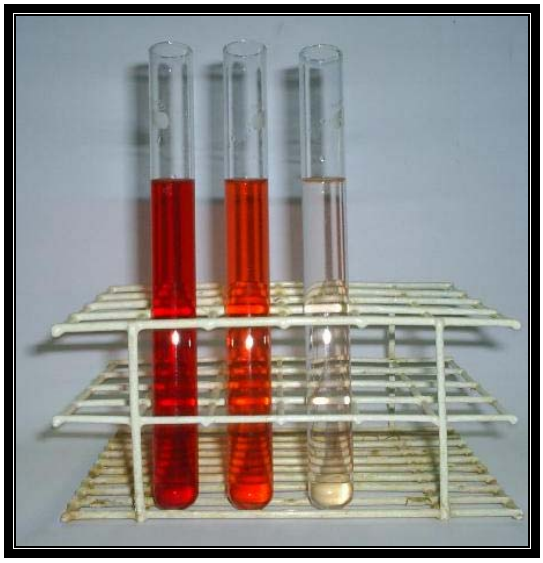


Figura 13: Teste de Atividade Desidrogenásica – Coloração da Amostra após a Filtração

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO VIRGEM

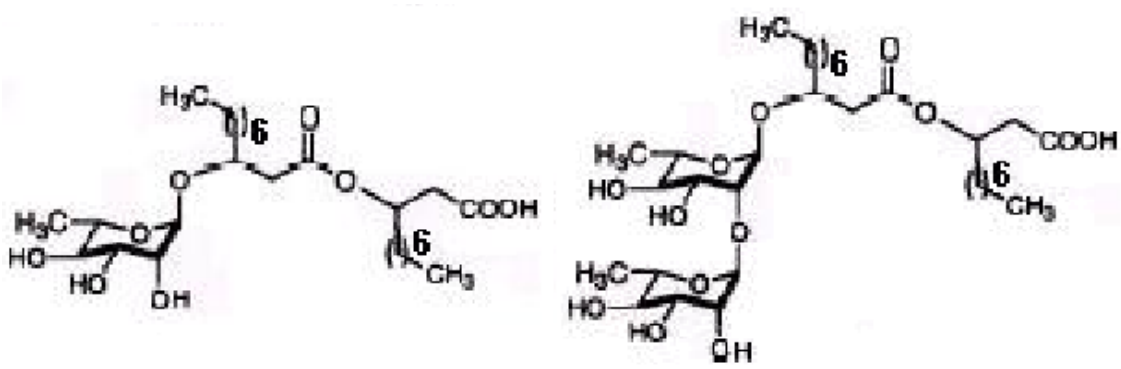
Os solos de característica argilosa e arenosa foram coletados, respectivamente, nas cidades de Duque de Caxias e Seropédica, no estado do Rio de Janeiro. Esses solos foram devidamente peneirados para retirada de resíduos indesejáveis, tais como capim e raízes de plantas. Posteriormente, os solos foram quarteados com o propósito de se obter uma composição mais homogênea dos mesmos. Após o quarteamento, foram feitas as caracterizações dos solos argiloso (54% argila, 8% silte e 38% areia) e arenoso (4% argila, 8% silte e 88% areia) de acordo com as metodologias apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18: Metodologias Empregadas na Caracterização dos Solos

Metodologia	Seção
Teor de Matéria Orgânica (MO)	3.1.1
Teor de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH)	3.1.2
Teor de Nitrogênio	3.1.3
Teor de Fósforo	3.1.4
pH	3.1.5
Teor de Umidade	3.1.6
Capacidade de Retenção de Água (CRA)	3.1.7
Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias (BHT)	3.1.8.1
Bactérias Hidrocarbonoclásticas Aeróbias (BHc)	3.1.8.2
Bactérias Heterotróficas Totais Anaeróbias (BAN)	3.1.8.3

3.2.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

O biossurfactante empregado nos experimentos é uma solução aquosa de ramnolipídeos cuja concentração é 10%. De acordo com o fabricante, o biossurfactante foi produzido a partir de um caldo de fermentação sendo esterilizado e centrifugado. Os principais ramnolipídeos presentes na solução, RRL (R1) e RRLL (R2), são apresentados respectivamente na Figura 14.



RRL (R1) RRLL(R2)

Figura 14: Estrutura Molecular dos Principais Ramnolipídeos Presentes na Solução do Biossurfactante

A concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante foi obtida a partir da medida da sua tensão superficial em diferentes concentrações (0-70 mg ramnolipídeo/L). A medida da tensão superficial foi feita no equipamento Dynometer cujo método empregado foi o do anel *Du Noüy* (ASTM D 1331 – 56). Esse método permite medir a força necessária para se desprender o anel da superfície do líquido (Figura 15), sendo expressa em mN/m. De acordo com a literatura, a CMC do biossurfactante pode ser influenciada em função do meio ao qual está sendo empregado (SCHIPPERS *et al.*, 2000) e em função disto, foi feita a medida da tensão superficial do biossurfactante em diferentes condições:

- Biossurfactante em diferentes concentrações;
- Biossurfactante em diferentes concentrações + solo argiloso;
- Biossurfactante em diferentes concentrações + solo arenoso.

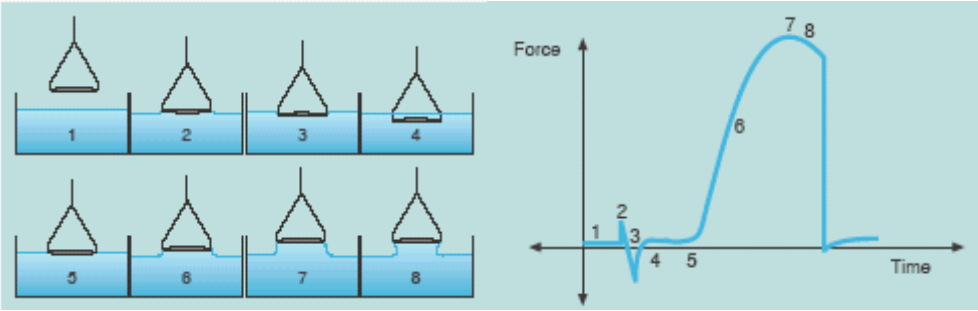


Figura 15: Representação Esquemática da Medição da Tensão Superficial de um Líquido pelo Método do Anel *Du Nouy*

Fonte: www.ksvltd.com.

Nos experimentos onde se avaliou a influência das partículas dos solos na medida da tensão superficial, empregou-se 10 g de solo para cada 25 mL de solução de biossurfactante. A mistura foi agitada por 15 minutos e, posteriormente, deixou-se decantar as partículas do solo para ser feita a medida da tensão superficial.

Uma vez medida a CMC do biossurfactante, avaliou-se a sua biodegradabilidade e toxicidade, de acordo com as metodologias apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19: Metodologias Empregadas na Caracterização do Biossurfactante

Metodologia	Seção
Teste de Biodegradabilidade Imediata	3.1.10.1
Teste de Mortalidade de Minhoca	3.1.10.2
Determinação da Atividade Desidrogenásica	3.1.10.3

3.2.3 Desenvolvimento de Inóculos em Fase Sólida

O desenvolvimento do inóculo em meio sólido apresentou bom resultado para a adaptação da microbiota em solo contaminado, a qual foi empregada em ensaios de biodegradação de óleo diesel em solo. Alguns experimentos anteriormente realizados no Laboratório de Tecnologia Ambiental obtiveram uma boa adaptação da microbiota através do seu desenvolvimento em meio sólido (PALA, 2003; PALA *et al.*, 2004). O

uso dessa microbiota como inóculo em biorreatores aeróbios contendo solo reconstituído indicaram a efetiva possibilidade do uso da técnica de bioaumento em processos de biorremediação de solos contaminados.

3.2.3.1 Desenvolvimento de Inóculo sob Condição Aeróbia

No desenvolvimento do inóculo foi utilizado um solo contaminado acidentalmente por óleo cru proveniente de uma região do estado de São Paulo, cujos microrganismos nativos foram bioestimulados por meio da adição de 30 mL de meio mineral *Bushnell Haas* (Tabela 16) e de óleo diesel comercial como fonte de carbono. O inóculo foi desenvolvido a partir de 3 kg de solo, em leito com aproximadamente 5 cm de altura (30 cm de comprimento e 20 cm de largura) coberto com um tecido arejado para evitar perda excessiva de umidade (Figura 16). A umidade foi monitorada e mantida em torno de 20% (m/m), a temperatura ambiente. O pH foi corrigido com carbonato de cálcio e mantido dentro da neutralidade.

Figura 16: Inóculo Aeróbio em Leito (20x30x5 cm).

O solo foi revolvido a cada dois dias para auxiliar na sua aeração e, posteriormente, a sua umidade foi corrigida. O crescimento da população de bactérias no inóculo foi determinado a partir da contagem de bactérias heterotróficas totais e hidrocarbonoclásticas aeróbias, respectivamente, a cada 15 e 30 dias.

3.2.3.2 Desenvolvimento de Inóculo sob Condição Anaeróbia

No desenvolvimento desse inóculo foi utilizado um solo contaminado acidentalmente por óleo cru proveniente de uma região do estado de Sergipe. Essa área possui uma extensa cobertura vegetal (principalmente da espécie taboa) e se encontra alagada a maior parte do ano. Os microrganismos nativos foram bioestimulados por meio da adição de uma solução contendo somente fonte de fósforo (KH_2PO4 e K_2HPO4), visto que o solo apresentava teor de nitrogênio elevado segundo metodologia de JARAMILLO (1996), e de óleo diesel comercial como fonte de carbono. O inóculo foi desenvolvido a partir de 3 kg de solo, em leito com aproximadamente 5 cm de altura (30 cm de comprimento e 20 cm de largura) hermeticamente fechado (Figura 17). O pH foi corrigido com carbonato de cálcio e mantido dentro da neutralidade (7,2±0,2). O teor de umidade foi mantido em torno de 37±2% (m/m), a 30±1ºC.

O crescimento da população de bactérias do inóculo foi determinado a partir da contagem de bactérias anaeróbias cujo monitoramento foi realizado a cada 20 dias. A cada retirada de amostra, purgava-se nitrogênio no recipiente para se manter uma atmosfera isenta de oxigênio em seu interior.

Figura 17: Inóculo Anaeróbio em Leito (20x30x5 cm).

3.2.4 BIORREMEDIAÇÃO AERÓBIA DOS SOLOS ARGILOSO E ARENOSO

3.2.4.1 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Argiloso

O planejamento empregado foi o fatorial $\mathbf{2^k}$, cujo ***k*** corresponde ao número de variáveis independentes e ***2*** o número de níveis (-1,+1), resultando uma condição de 2^3 (8 experimentos). Além disso, foi avaliado o nível intermediário (0) que representa exatamente a média dos valores superior (+1) e inferior (-1), também denominado de ponto central. Os ensaios no ponto central podem fornecer informações úteis sobre o comportamento das respostas entre os níveis avaliados, além de evidenciar a qualidade da repetibilidade do processo (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Os dados obtidos nesses ensaios foram avaliados no *software* STATISTICA$^{TM'99}$ for Windows versão 5.5, produzido pela *StatSoft*.

Esses experimentos foram realizados em biorreatores constituídos de coluna de 20 cm de altura, sendo 15 cm de leito, e 5cm de diâmetro, mantidos à temperatura ambiente e foi empregada uma vazão de ar 3 L/h. As Figuras 18 e 19 apresentam o esquema de um biorreator utilizado, indicando alguns detalhes da montagem do experimento.

Os experimentos foram realizados com 400 g de solo argiloso contaminado em 5% de óleo diesel comercial (S500). Em cada experimento, foram adicionados 10% (m/m) do inóculo aeróbio para aumentar a população microbiana no solo e corrigiu-se o seu pH para valores em torno de 7. Nos reatores a umidade do solo manteve-se em torno de 70% da sua capacidade de retenção de água, não sendo necessária a sua correção ao longo dos experimentos.

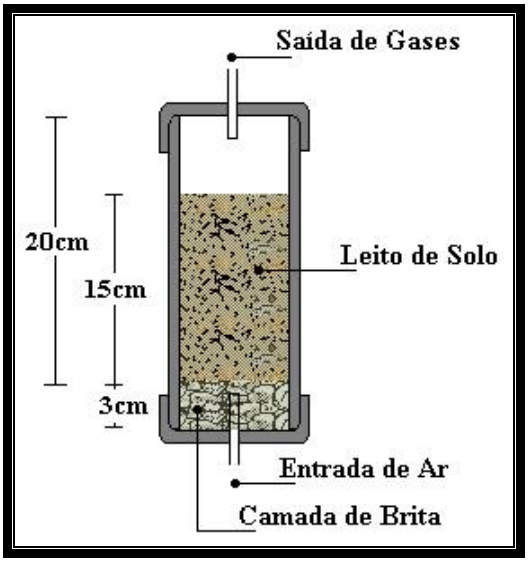


Figura 18: Representação Esquemática do Biorreator Aeróbio de Leito Fixo Empregado no Planejamento Experimental.

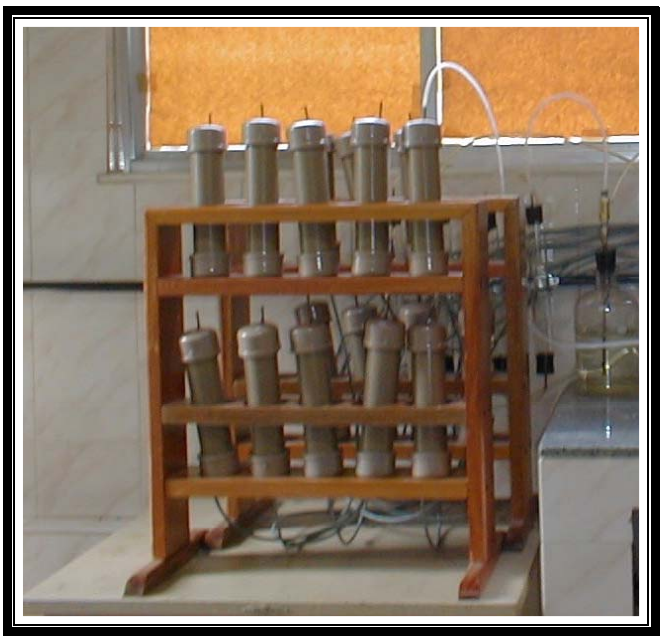


Figura 19: Biorreatores Aeróbios de Leito Fixo Empregados no Planejamento Experimental.

As Tabelas 20 e 21, respectivamente, apresentam os níveis estudados no planejamento experimental e a matriz do planejamento experimental fatorial 2^3. A variável de resposta empregada no planejamento fatorial foi o percentual de remoção de TPH.

Tabela 20: Variáveis Independentes e seus Respectivos Níveis Empregados no Planejamento Experimental 2^3 sob Condição Aeróbia

Variáveis Independentes	**Níveis**		
	-1	**0**	**+1**
Teor de Fertilizante (mg/kg fósforo)	0	25	50
Teor de Biossurfactante (mg/L)	0	30*	60**
Tempo (dias)	30	40	50

(*concentração equivalente a 6,79 mg ramnolipídeo/kg solo argiloso; **concentração equivalente a 13,58 mg ramnolipídeo/kg solo argiloso)

Tabela 21: Matriz do Planejamento Experimental 2^3 para o Solo Argiloso sob Condição Aeróbia

Condição	**Variáveis do Planejamento – Níveis**		
	Teor de Fertilizante	**Teor de Biossurfactante**	**Tempo**
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9 (Ponto Central)	0	0	0

Os teores de fertilizante avaliados no planejamento se basearam na concentração de fósforo que deveria conter no solo. Utilizou-se o teor de fósforo como parâmetro, pois parte dele pode ser adsorvida pela matriz do solo ou ainda pode ser precipitada reduzindo assim a sua concentração na solução do solo (FURTINI NETO *et al.*, 2001). Segundo a metodologia descrita por JARAMILLO (1996), o solo é considerado rico em fósforo quando o seu teor encontra-se acima de 30 mg P/kg solo, em função disto, o maior nível estudado no planejamento experimental foi 50 mg P/kg

solo. A relação de Nitrogênio:Fósforo:Potássio no fertilizante comercial era 4:14:8. A Tabela 22 apresenta a composição do fertilizante empregado nos experimentos.

Tabela 22: Composição do Fertilizante Comercial Empregado nos Experimentos

Composição	Concentração (% m/m)
Nitrogênio Total (N)	4
Fósforo Solúvel (P_2O_5)	14
Potássio Solúvel (K_2O)	8
Magnésio (Mg), Enxofre (S), Boro (B), Cobre (Cu), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo), Zinco (Zn)	74*

(* O fabricante não cita na embalagem do produto o percentual de cada componente na composição do fertilizante.)

Em relação aos teores de biossurfactante empregados para o tratamento do solo, o maior nível avaliado se baseou na medida da concentração micelar crítica (CMC) do mesmo em presença de partículas do solo argiloso que será apresentada na Seção 4.2.1. Os teores de biossurfactante de 30 e 60 mg ramnolipídeo/L correspondem, respectivamente, a uma concentração de 6,79 e 13,58 mg ramnolipídeo/kg solo, baseando-se no volume de solução empregado no solo argiloso.

3.2.4.2 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Arenoso

Assim como nos experimentos realizados em solo argiloso, os experimentos foram realizados também em biorreatores constituídos de coluna de 20 cm de altura, sendo 15 cm de leito, e 5 cm de diâmetro (Figuras 18 e 19), mantidos à temperatura ambiente e foi empregada uma vazão de ar 3 L/h. Os experimentos foram realizados com 400 g de solo arenoso contaminado em 5% de óleo diesel comercial (S500). Em cada experimento, foram adicionados 10% (m/m) do inóculo aeróbio para aumentar a população microbiana no solo e corrigiu-se o seu pH para valores em torno de 7. A umidade do solo manteve-se em torno de 70% da sua capacidade de retenção de água.

As Tabelas 23 e 24 apresentam, respectivamente, os níveis estudados no planejamento experimental e a matriz do planejamento experimental fatorial 2^3.

Tabela 23: Variáveis Independentes e seus Respectivos Níveis Empregados no Planejamento Experimental 2^3 sob Condição Aeróbia

Variáveis Independentes	**Níveis**		
	-1	**0**	**+1**
Teor de Fertilizante (mg/kg fósforo)	0	25	50
Teor de Biossurfactante (mg/L)	0	15*	30**
Tempo (dias)	30	40	50

(*concentração equivalente a 1,34 mg ramnolipídeo/kg solo arenoso; **concentração equivalente a 2,68 mg ramnolipídeo/kg solo arenoso)

Tabela 24: Matriz do Planejamento Experimental 2^3 para o Solo Arenoso sob Condição Aeróbia

Condição	**Variáveis do Planejamento – Níveis**		
	Teor de Fertilizante	**Teor de Biossurfactante**	**Tempo**
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9 (Ponto Central)	0	0	0

Assim como nos experimentos realizados com solo argiloso, os teores de fertilizante avaliados no planejamento se basearam na concentração de fósforo que deveria conter no solo. Quanto aos teores de biossurfactante empregados nos experimentos, o maior nível avaliado também se baseou na medida da concentração micelar crítica (CMC) do mesmo em presença de partículas do solo arenoso que será apresentada na Seção 4.2.1. Os teores de biossurfactante de 15 e 30 mg ramnolipídeo/L correspondem, respectivamente, a uma concentração de 1,34 e 2,68 mg ramnolipídeo/kg solo, baseando-se no volume de solução empregado no solo arenoso.

3.2.4.3 Planejamento Fatorial 2^2 dos Experimentos Realizados com Solo Arenoso

Um novo planejamento experimental foi necessário ser realizado, visto que com os resultados obtidos anteriormente não foi possível estimar as variáveis significativas para o processo de biodegradação.

Os experimentos foram realizados também em biorreatores constituídos de coluna de 20 cm de altura, sendo 15 cm de leito, e 5cm de diâmetro (Figuras 18 e 19), mantidos à temperatura ambiente e foi empregada uma vazão de ar 3 L/h. Os experimentos foram realizados com 400 g de solo arenoso contaminado em 5% de óleo diesel comercial (S500). Em cada experimento, foram adicionados 10% (m/m) do inóculo aeróbio para aumentar a população microbiana no solo e corrigiu-se o seu pH para valores em torno de 7. A umidade do solo manteve-se em torno de 70% da sua capacidade de retenção de água. No entanto, diferentemente do planejamento apresentado na Seção 3.2.4.2, neste o tempo não foi considerado como uma variável relevante a ser avaliada, fixando-o em 40 dias.

A Tabela 25 apresenta a matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 realizados com solo arenoso sob condição aeróbia. A variável de resposta empregada no planejamento fatorial foi o percentual de remoção de TPH.

Tabela 25: Matriz do Planejamento Experimental 2^2 para o Solo Arenoso sob Condição Aeróbia

Condição	**Variáveis do Planejamento**	
	Teor de Fertilizante (mg/kg)	**Teor de Biossurfactante (mg/L)**
1	0	0
2	50	0
3	0	30
4	50	30
5 (Ponto Central)	25	15
6 (Ponto Central)	25	15

3.2.5 BIORREMEDIAÇÃO ANAERÓBIA DOS SOLOS ARGILOSO E ARENOSO

3.2.5.1 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Argiloso

Esses experimentos foram realizados em biorreatores constituídos de coluna de 20 cm de altura, sendo 15 cm de leito, e 5cm de diâmetro, mantidos à temperatura de 30ºC. A Figura 20 mostra o esquema de um biorreator utilizado, indicando alguns detalhes da montagem do experimento. Os experimentos foram realizados com 400 g de solo argiloso contaminado em 5% de óleo diesel comercial (S500). Em cada experimento, foram adicionados 10% (m/m) do inóculo anaeróbio para aumentar a população microbiana no solo e corrigiu-se o seu pH para valores em torno de 7. Posterior a montagem dos reatores, purgou-se nitrogênio nos mesmos para se manter uma atmosfera isenta de oxigênio. Nos reatores a umidade do solo manteve-se em torno de 70% da sua capacidade de retenção de água, não sendo necessária a sua correção ao longo dos experimentos.

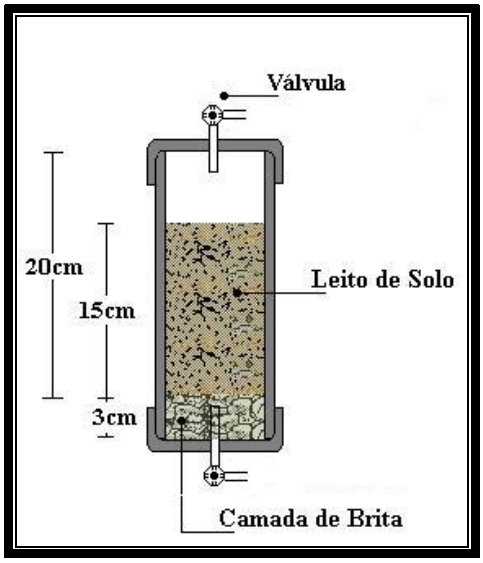


Figura 20: Representação Esquemática do Biorreator Anaeróbio de Leito Fixo Empregado no Planejamento Experimental.

Os diferentes níveis avaliados nesse planejamento experimental são apresentados na Tabela 26. Assim como nos ensaios aeróbios a variável de resposta foi o percentual de remoção de TPH no solo. A matriz do planejamento experimental para os experimentos sob condição anaeróbia é apresentada na Tabela 27.

Tabela 26: Variáveis Independentes e seus Respectivos Níveis Empregados no Planejamento Experimental sob Condição Anaeróbia

Níveis Estudados	Variáveis do Planejamento		
	Teor de Fertilizante (mg/kg fósforo)	**Teor de Biossurfactante (mg/L)**	**Tempo (dias)**
-1	0	0	30
0	25	30*	45
1	50	60**	60

(*concentração equivalente a 6,79 mg ramnolipídeo/kg solo argiloso; **concentração equivalente a 13,58 mg ramnolipídeo/kg solo argiloso)

Tabela 27: Matriz do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso sob Condição Anaeróbia

Condição	Variáveis do Planejamento – Níveis		
	Teor de Fertilizante	**Teor de Biossurfactante**	**Tempo**
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9 (Ponto Central)	0	0	0
10 (Ponto Central)	0	0	0

Assim como nos experimentos realizados em condição aeróbia, os teores de fertilizante avaliados neste planejamento se basearam na concentração de fósforo que deveria conter no solo. Em relação aos teores de biossurfactante empregados nos experimentos, o maior nível avaliado também se baseou na medida da concentração micelar crítica (CMC) do mesmo em presença de partículas do solo argiloso que será apresentada na Seção 4.2.1. Os teores de biossurfactante de 30 e 60 mg ramnolipídeo/L correspondem, respectivamente, a uma concentração de 6,79 e 13,58 mg ramnolipídeo/kg solo, baseando-se no volume de solução empregado no solo arenoso.

3.2.5.2 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Arenoso

Os diferentes níveis avaliados nesse planejamento experimental são apresentados na Tabela 28 e a matriz do planejamento experimental é apresentada na Tabela 29.

Tabela 28: Variáveis Independentes e seus Respectivos Níveis Empregados no Planejamento Experimental sob Condição Anaeróbia

Níveis Estudados	**Variáveis do Planejamento**		
	Teor de Fertilizante (mg/kg fósforo)	**Teor de Biossurfactante (mg/L)**	**Tempo (dias)**
-1	0	0	30
0	25	15	45
1	50	30	60

(*concentração equivalente a 1,34 mg ramnolipídeo/kg solo arenoso; **concentração equivalente a 2,68 mg ramnolipídeo/kg solo arenoso)

Tabela 29: Matriz do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso sob Condição Anaeróbia

Condição	Variáveis do Planejamento		
	Teor de Fertilizante	Teor de Biossurfactante	Tempo
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9 (Ponto Central)	0	0	0
10 (Ponto Central)	0	0	0

3.2.6 EXPERIMENTOS DE CONTROLE BIÓTICO

Nos experimentos de controle biótico não foi feita a correção de nutrientes, a adição de inóculo e nem a adição de biossurfactante. A umidade do solo foi mantida em torno de 70% da sua capacidade de retenção de água. Os solos foram contaminados com 5% (m/m) de óleo diesel e as temperaturas empregadas nesse experimento foram as mesmas sob a condição aeróbia (temperatura ambiente) e anaeróbia (30ºC). Os biorreatores utilizados para este ensaio foram os mesmos apresentados nas Figuras 18 e 20.

No planejamento experimental para o solo argiloso e arenoso em condição aeróbia, os controles bióticos foram representados por:

- BIO30: controle biótico realizado em 30 dias de experimentos;
- BIO40: controle biótico realizado em 40 dias de experimentos;
- BIO50: controle biótico realizado em 50 dias de experimentos.

No planejamento experimental para o solo argiloso e arenoso em condição anaeróbia, os controles bióticos foram representados por:

- BIO30: controle biótico realizado em 30 dias de experimentos;
- BIO45: controle biótico realizado em 45 dias de experimentos;
- BIO60: controle biótico realizado em 60 dias de experimentos.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SOLOS

Na caracterização dos solos foram determinados alguns dos parâmetros mais relevantes para a biodegradação do óleo. A Tabela 30 apresenta os principais parâmetros físico-químicos e microbiológicos de cada solo virgem.

Tabela 30: Caracterização dos Solos Arenoso e Argiloso

Parâmetros	**Solo**	
	Arenoso	**Argiloso**
Teor de Carbono (g/kg)	9,9±0,3	17,7±1,4
Teor de Nitrogênio (g/kg)	0,20±0,02	0,28±0,02
Teor de Fósforo (mg/kg)	13,7±0,5	2±1
Teor de Matéria Orgânica (g/kg)	17,0±2,0	30,5±2,5
Teor de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (g/kg) – **TPH**	1,20±0,02	1,23±0,01
pH	5,6±0,1	4,5±0,1
Umidade (%)	3,6±0,2	13,9±0,3
Capacidade de Retenção de Água (%) - **CRA**	17,9±0,4	52,2±0,3
Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias (UFC/g) - **BHT**	$8,4x10^4$	$4,0x10^2$
Bactérias Hidrocarbonoclásticas Aeróbias (NMP/g) - **BHc**	nd	nd
Bactérias Heterotróficas Totais Anaeróbias (NMP/g) - **BAN**	$4,2x10^3$	$9,8x10^2$
Relação Areia:Silte:Argila (%)	88:8:4	38:8:54

(nd: não detectado)

Os dois tipos de solo apresentaram baixos teores de matéria orgânica (MO) e TPH, confirmando que os mesmos não se apresentavam contaminados. De acordo com a antiga Legislação Holandesa/1994, um solo merece intervenção quando o teor de TPH exceder a 5g/kg (CETESB, 1999). Entretanto, é importante ressaltar que houve uma atualização dessa legislação cujo teor de TPH não é mais contemplado. De acordo com WEISMAN (1998), o teor de TPH é um dos parâmetros que não pode ser empregado como resposta para quantificar o risco à saúde humana e ao meio ambiente, visto que engloba diferentes tipos de hidrocarbonetos em distintas proporções dependendo da

amostra. No entanto, pode ser empregado como uma ferramenta útil cujas finalidades podem ser: identificação de uma contaminação, avaliação do grau de contaminação e avaliação do progresso de uma contaminação.

Considerando-se as condições mais adequadas para o processo de biorremediação, o pH dos solos se encontrava abaixo do ideal (pH 6,5 a 8,0) para a atividade microbiana conforme mencionado na literatura (RISER-ROBERTS, 1998). Por isso, foi necessário adicionar carbonato de cálcio aos solos nos ensaios de biodegradabilidade de modo a elevar o pH para valores em torno de 7.

Quanto ao teor de umidade, verificou-se que também estava abaixo da condição necessária para a atividade microbiana, em especial de bactérias, o que certamente seria um impeditivo para a biorremediação. Segundo DAVIS e MADSEN (1996), quando o teor de umidade do solo atinge a valores próximos de 2%, mesmo que seja feita a adição de água, a atividade microbiana não é restabelecida e por conseguinte, a taxa de biodegradação pode ser quatro vezes inferior à da sua condição original. De acordo com RISER-ROBERT (1998), o teor de umidade do solo deve apresentar de 30 a 90% do valor de sua capacidade de retenção de água (CRA) para garantir altas taxas de biodegradação.

Segundo metodologia de JARAMILLO (1996), os solos também apresentavam baixo teor de nitrogênio e fósforo, visto que estes teores encontravam-se abaixo de 2,22 g N/kg solo e 30 mg P/kg solo, respectivamente. De acordo com FERGUSON *et al*. (2003), solos contaminados que apresentam baixo teor de nitrogênio e fósforo necessitam ser corrigidos para permitir um aumento na degradação microbiana de hidrocarbonetos. Por isso, a adição de fertilizante comercial foi uma das variáveis consideradas para avaliação no planejamento experimental.

No que concerne às populações microbianas dos solos em estudo, observou-se que o número de bactérias heterotróficas totais (BHT e BAN) encontrava-se baixo para o processo de biorremediação. Além disso, não foi detectada a presença de bactérias hidrocarbonoclásticas (BHc). Um número reduzido de bactérias era previsto em decorrência do baixo conteúdo de matéria orgânica e inorgânica presente nos solos. Ademais, em ecossistemas não poluídos, os microrganismos degradadores de

hidrocarbonetos geralmente constituem menos do que 0,1% da população microbiana (ATLAS, 1981). Em função disso, foi elaborado um procedimento para aumentar a população microbiana capaz de degradar o óleo no solo, com a adição de um inóculo aeróbio e anaeróbio preparado previamente.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE EMPREGADO

4.2.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA DO BIOSSURFACTANTE

Na Figura 21 são apresentados os resultados provenientes da medição da tensão superficial da água em presença do biossurfactante em diferentes condições de ensaios, como citado na Seção 3.2.2.

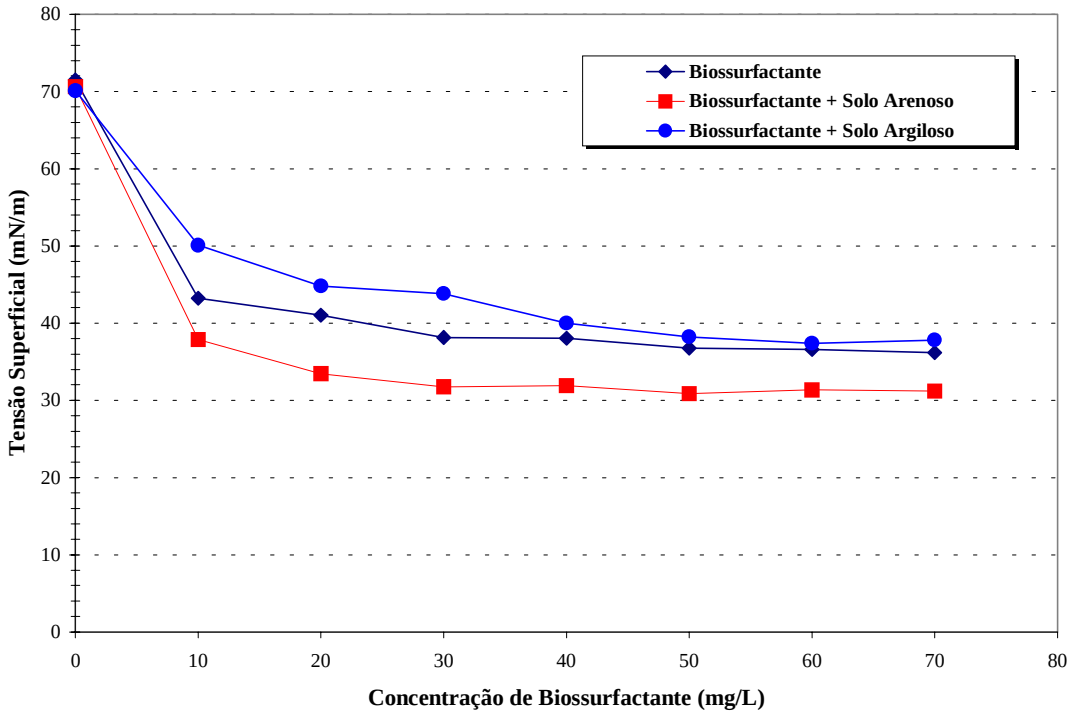


Figura 21: Medição da Tensão Superficial da Água em Presença do Biossurfactante em Diferentes Condições de Ensaios (Biossurfactante (◆), Biossurfactante/Solo Argiloso (■) e Biossurfactante/Solo Arenoso (●)).

Da Figura 21, observa-se que a tensão superficial da água diminuiu de 72 mN/m para aproximadamente 38 mN/m quando se empregou uma concentração de biossurfactante de 30 mg/L. Maiores concentrações do biossurfactante não tiveram influência expressiva na variação da tensão superficial, indicando ser a concentração de 30 mg/L o valor correspondente a CMC do biossurfactante em meio aquoso. No entanto, quando se mediu a tensão superficial da água com biossurfactante em presença do solo arenoso, observou-se que a tensão superficial da água atingiu o valor mínimo de aproximadamente 32 mN/m em uma concentração de 30 mg/L. Tal efeito pode ter sido devido à formação de uma espécie de emulsão no sistema que foi observada durante a medição. Quanto à medida da tensão superficial da água com biossurfactante em presença de solo argiloso, a mesma atingiu o valor mínimo de 38 mN/m em uma concentração de 60 mg/L. Não sendo mais observada a variação quanto à tensão superficial da água, sendo essa concentração considerada como sendo a CMC do biossurfactante em presença de partículas argilosas. Por conseguinte, a CMC do biossurfactante em presença de partículas arenosas e argilosas foi de 30 e 60 mg/L, respectivamente.

A Tabela 31 apresenta a relação da tensão superficial da água e a concentração micelar crítica do biossurfactante nas diferentes condições de ensaios.

Tabela 31: Relação da Tensão Superficial da Água e a Concentração Micelar Crítica do Biossurfactante em Diferentes Condições de Ensaios

Condição de Ensaio	Tensão Superficial (mN/m)	Concentração de Biossurfactante – CMC (mg/L)
Água	72	-
Água/Biossurfactante	38	30
Água/Biossurfactante/Solo arenoso	32	30
Água/Biossurfactante/Solo argiloso	38	60

Comparando-se os resultados obtidos, pode-se observar que a CMC do biossurfactante não foi alterada em presença do solo arenoso, em contrapartida, o mesmo não foi verificado em solo de característica argilosa. Verificou-se que a CMC

foi maior em solo argiloso, possivelmente devido à característica de adsorção e absorção inerente à partícula argilosa, diminuindo assim a concentração do biossurfactante no meio. De acordo com SCHIPPERS *et al.* (2000), a CMC do biossurfactante pode ser muito maior no solo que no meio líquido, pois as suas moléculas são adsorvidas nas partículas do solo.

4.2.2 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE E DA ECOTOXICIDADE DO BIOSSURFACTANTE

O resultado do teste de biodegradabilidade é apresentado na Figuras 22 que relaciona o percentual de biodegradação do biossurfactante versus tempo.

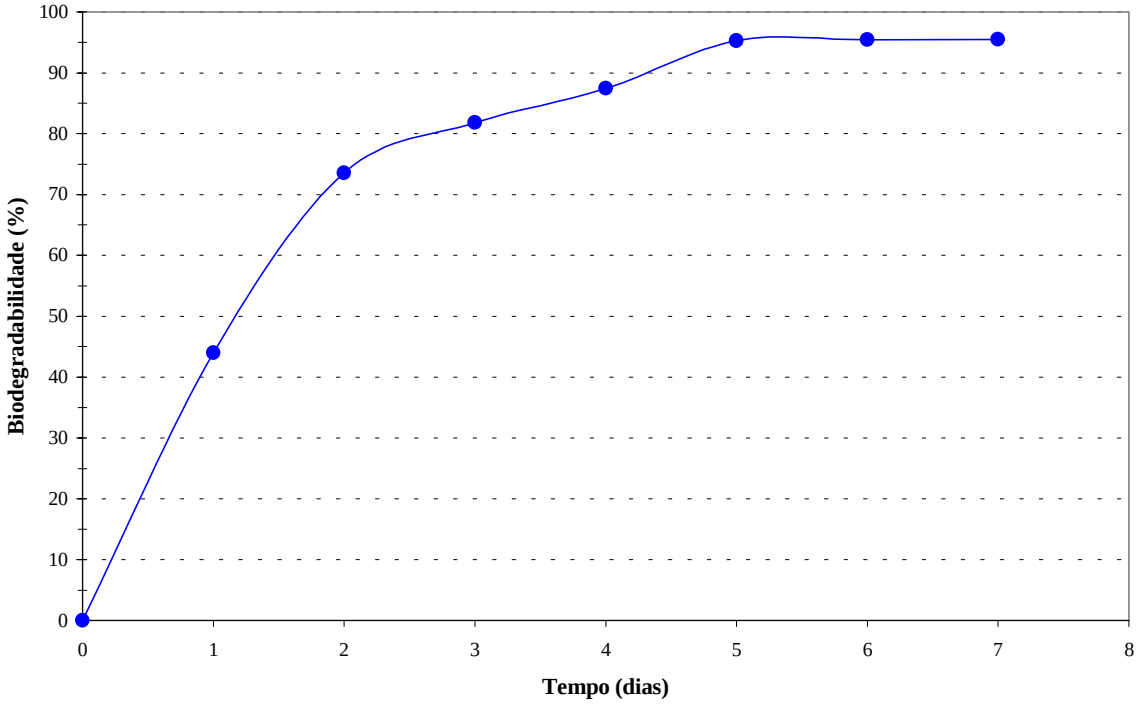


Figura 22: Variação do Percentual de Biossurfactante Degradado em Função do Tempo.

Da Figura 22, observa-se que o biossurfactante empregado apresentou uma alta biodegradabilidade, cerca de 95% da substância em solução foi biodegradada em 7 dias de experimento. Tal resultado vai ao encontro das observações feitas por alguns autores que relatam a importância do emprego de biossurfactante na remediação de solos, visto

que são produtos mais biodegradáveis que os surfactantes químicos (RISER-ROBERTS, 1998; BAI *et al*. 1997).

Uma vez observado que o biossurfactante era biodegradável, buscou-se avaliar a toxicidade do mesmo nas concentrações determinadas pela CMC: 15 mg/L, 30 mg/L e 60 mg/L. Foram realizados ensaios cujo objetivo foi observar os possíveis efeitos da influência do biossurfactante na mortalidade de minhocas e na atividade microbiana do inóculo aeróbio.

A Tabela 32 apresenta os resultados do teste de mortalidade de minhocas (*Eisenia foetida*) avaliando-se as diferentes concentrações de biossurfactante empregadas nos solos argiloso e arenoso em 7 dias de experimentos.

Tabela 32: Percentual de Minhocas Sobreviventes nos Solos Argiloso e Arenoso em Diferentes Concentrações de Biossurfactantes Empregados nos Experimentos

Concentração de Biossurfactante (mg/L)	**Percentual de Indivíduos Sobreviventes (%)**	
	Solo Arenoso	**Solo Argiloso**
15	100	-
30	100	100
60	-	100

No teste de mortalidade de minhocas, foi possível observar que o biossurfactante não foi tóxico a esta população, visto que não houve qualquer alteração do número de indivíduos presente nos solos de característica argilosa e arenosa.

A Figura 23 apresenta uma comparação da atividade desidrogenásica do solo com diferentes concentrações empregadas de biossurfactante.

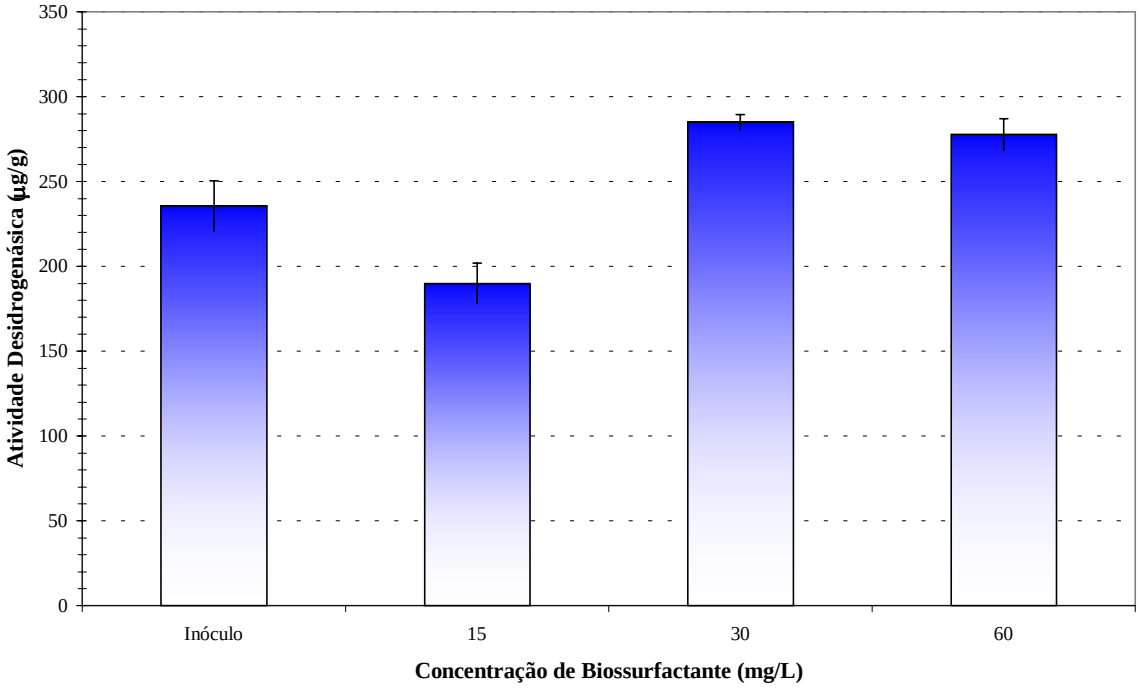


Figura 23: Teste da Atividade Desidrogenásica em Diferentes Concentrações de Biossurfactante.

Comparando-se a atividade microbiana inicial do inóculo, observou-se que as concentrações empregadas nos experimentos, à medida que se aumentou a concentração de biossurfactante de 15 mg/L para 30 e 60 mg/L, houve um aumento na atividade microbiana indicando que nestas concentrações o produto não teve influência negativa, portanto não sendo tóxico aos microrganismos.

Por conseguinte, nos níveis de concentração em que o biossurfactante foi empregado para o tratamento do solo, observou-se que o mesmo apresentou alta biodegradabilidade e baixa toxicidade tanto aos microrganismos quanto às minhocas da espécie *Eisenia foetida*, assim como citado na literatura (RISER-ROBERTS, 1998).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO EM FASE SÓLIDA SOB CONDIÇÃO AERÓBIA E ANAERÓBIA

Nesta Seção, visou-se apresentar a caracterização dos inóculos empregados nos ensaios tanto sob condição aeróbia quanto anaeróbia.

Na Tabela 33 é apresentada a caracterização do inóculo aeróbio e anaeróbio dos parâmetros considerados relevantes para o processo de biorremediação.

Tabela 33: Caracterização do Inóculo Aeróbio e Anaeróbio

Parâmetros	Inóculo Aeróbio	Inóculo Anaeróbio
Teor de Nitrogênio (g/kg)	1,7±0,3	5,2±0,7
Teor de Fósforo (mg/kg)	112,8±9,1	28,5±1,5
Teor de Matéria Orgânica (g/kg)	67,6±3,4	102,4±4,7
pH	7,4±0,1	7,1±0,1
Umidade (%)	20,2±0,3	38,4±0,1
Atividade Desidrogenásica (μgTPF/g)	235,7±14,8	280,6±16,8
Bactérias Heterotróficas Totais (UFC/g)	$7,7x10^6$	$5,4x10^6$
Bactérias Hidrocarbonoclásticas (NMP/g)	$2,0x10^4$	-

Em termos nutricionais, o inóculo aeróbio apresentava um valor mediano quanto ao teor de nitrogênio e sendo considerado um solo rico em relação ao teor de fósforo e matéria orgânica, segundo a metodologia descrita por JARAMILLO (1996). Em relação à fertilidade do inóculo anaeróbio, verificou-se que o solo era rico em nitrogênio, sendo considerado um solo medianamente rico em relação ao teor de fósforo e rico em matéria orgânica (MO). Segundo a metodologia descrita por JARAMILLO (1996), o solo é considerado rico em nitrogênio, fósforo e matéria orgânica quando os teores encontram-se acima de 2,22 g N/kg solo, 30 mg P/kg solo e 42 g MO/kg solo, respectivamente.

A Tabela 34 apresenta a população de bactérias heterotróficas totais aeróbias (BAN) durante 155 dias de monitoramento. No inóculo aeróbio, a população de bactérias heterotróficas totais e de bactérias hidrocarbonoclásticas se manteve, respectivamente, dentro da ordem de 10^6-10^7 UFC/g solo e 10^3-10^4 NMP células/g solo durante os ensaios realizados.

Tabela 34: Monitoramento da População de Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias e Hidrocarbonoclásticas do Inóculo Aeróbio em 155 Dias

Tempo (dias)	**Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias (UFC/g de solo seco)**	**Bactérias Hidrocarbonoclásticas (NMP/g de solo seco)**
0	$1,97x10^5$	$1,4x10^3$
14	$3,63x10^5$	-
30	$5,69x10^6$	$1,7x10^3$
45	$2,39x10^6$	-
60	$1,50x10^7$	$1,2x10^4$
75	$4,51x10^7$	-
90	$9,76x10^6$	$1,7x10^5$
105	$8,11x10^6$	-
120	$2,07x10^7$	$5,4x10^4$
140	$2,77x10^7$	-
155	$1,06x10^7$	$6,2x10^4$

A Tabela 35 apresenta a população de bactérias heterotróficas totais anaeróbias (BAN) durante 220 dias de monitoramento. Do monitoramento, observou-se que a população microbiana cresceu três ordens de grandeza em 60 dias. No entanto, a partir de 160 dias a população manteve-se dentro da ordem de 10^6 NMP células/g solo seco.

Tabela 35: Monitoramento da População de Bactérias Heterotróficas Totais Anaeróbias do Inóculo Anaeróbio em 220 Dias

Tempo (dias)	**Bactérias Heterotróficas Totais Anaeróbias (NMP/g de solo seco)**
0	$6,8x10^5$
40	$8,1x10^7$
60	$3,1x10^8$
80	$1,7x10^7$
100	$3,2x10^6$
120	$3,5x10^5$
140	$9,6x10^6$
160	$7,2x10^6$
180	$5,7x10^6$
200	$3,7x10^6$
220	$7,7x10^6$

Em ambos os inóculos, o pH foi mantido dentro da neutralidade e o teor de umidade do solo permaneceu em torno de 20% no inóculo aeróbio e 38% no inóculo anaeróbio.

4.4 BIORREMEDIAÇÃO AERÓBIA

4.4.1 PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM SOLO ARGILOSO SOB CONDIÇÃO AERÓBIA

A Tabela 36 apresenta os resultados do planejamento experimental fatorial para o solo argiloso sob condição aeróbia nas diferentes condições experimentais avaliadas.

Tabela 36: Resultados do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso sob Condição Aeróbia

Condição	Variáveis Independentes			Remoção de TPH (%)
	Teor de Fertilizante (mg P/kg)	Teor de Biossurfactante (mg/L)	Tempo (dias)	
1	0	0	30	11,4±0,2
2	0	0	50	21,4±0,1
3	0	60	30	66,6±0,1
4	0	60	50	64,3±0,2
5	50	0	30	76,4±0,4
6	50	0	50	67,5±0,1
7	50	60	30	79,6±0,3
8	50	60	50	71,9±0,2
9 (Ponto Central)	25	30	40	55,3±0,1

Da Tabela 36, observa-se que o emprego de fertilizante e/ou biossurfactante promoveu um aumento na eficiência de remoção de TPH, acima de 50%, enquanto nos reatores onde não se fez adição de nenhum deles a eficiência foi aproximadamente de 21%, em 50 dias. Além disso, a maior eficiência de remoção de TPH (79,6±0,3%) foi alcançada em 30 dias quando se empregou uma maior concentração de fertilizante e biossurfactante (condição 7). Nos solos onde não foi feita qualquer correção (controle biótico) não foi detectada a remoção de TPH em 30 dias. No entanto, foram atingidos valores de 3,5 e 4,0 % em 40 e 50 dias, respectivamente.

Esses resultados indicam que estimulando a população microbiana presente no solo argiloso pode-se potencializar a remoção do óleo. Entretanto, em função da relação custo/benefício, possivelmente seria economicamente mais viável empregar maior

concentração de fertilizante e menor concentração de biossurfactante (condição 5), para se ter uma eficiência de remoção próxima de 76,4%.

No planejamento experimental realizado com o solo argiloso os valores obtidos de remoção de TPH foram significativos considerando-se um intervalo de confiança de 95% (R^2=0,99, P≤0,05), ou seja, correspondente ao menor nível em que os dados são significativos estatisticamente.

A Figura 24 apresenta o diagrama de Pareto cujas variáveis independentes avaliadas são apresentadas, tendo como variável de resposta a eficiência de remoção de TPH. Nesse gráfico, as variáveis relevantes para o processo são aquelas cujos valores a partir do qual seus efeitos são significativos estatisticamente.

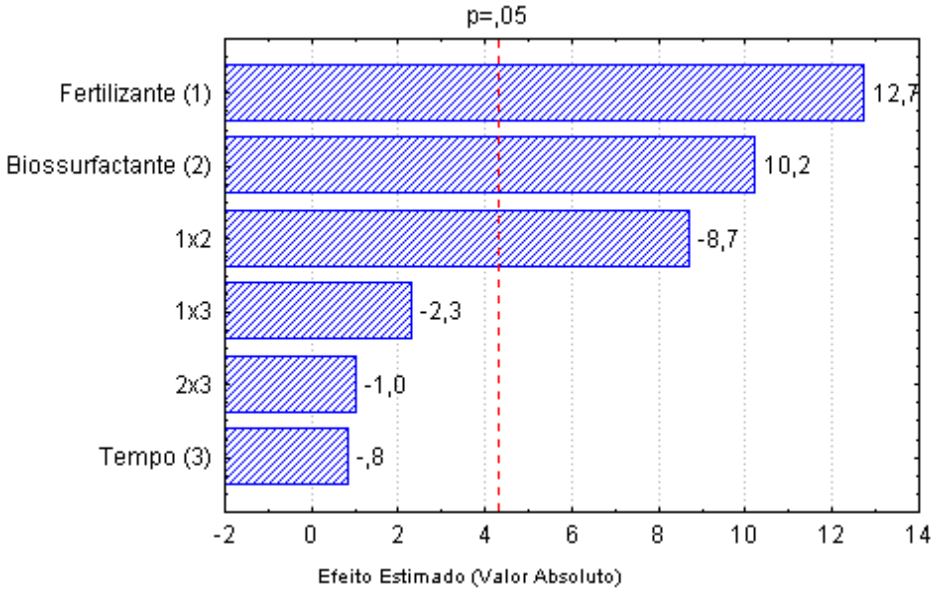


Figura 24: Diagrama de Pareto do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH.

Da Figura 24, observa-se que para os níveis estudados de fertilizante e biossurfactante, ambas as variáveis avaliadas foram significativas, apresentando um efeito positivo na remoção de TPH. Isso indica que se empregando concentrações maiores de fertilizante ou biossurfactante pode-se obter um aumento na eficiência de remoção de TPH. Entretanto, quando se combinaram os efeitos de fertilizante e

biossurfactante, observou-se que a interação de ambos contribuiu negativamente para a eficiência de remoção de TPH.

Em relação à variável tempo, observa-se que para os níveis estudados (30, 40 e 50 dias) não foi significativo o seu efeito, ou seja, aumentando-se o tempo dos experimentos não foi observada uma grande diferença na eficiência de remoção de TPH. Essa afirmativa pode ser observada também a partir do gráfico das médias marginais (Figura 25) que representa a relação entre as três variáveis avaliadas, considerando-se um limite de confiança de 95%. Além disso, essa Figura 25 possibilita verificar a existência de uma interação entre as variáveis teor de fertilizante e teor de biossurfactante, posto que no planejamento experimental fatorial quando há uma interação significativa as linhas representando o teor de fertilizante dos níveis –1 e +1 tendem a se cruzar, indicando a existência de interação entre elas.

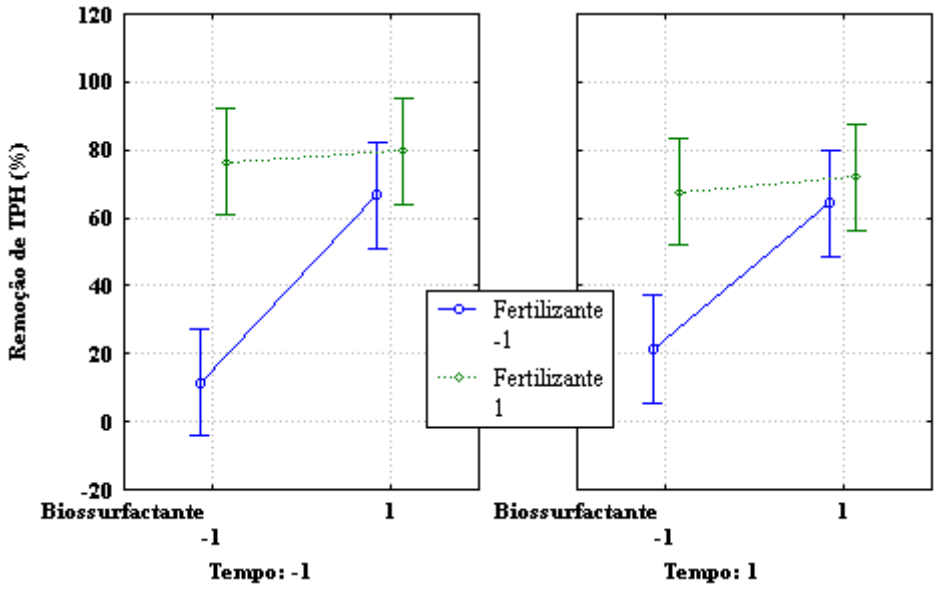


Figura 25: Gráfico das Médias Marginais do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH.

Da Figura 25, pode-se ainda observar que quando se emprega uma menor concentração de fertilizante no solo, a remoção de TPH tende aumentar com o aumento da concentração do biossurfactante, independente dos níveis avaliados para o tempo. Entretanto, quando se emprega o maior nível de fertilizante, a remoção de TPH independe tanto da concentração do biossurfactante quanto do tempo avaliado.

A Figura 26 é um gráfico de superfície de resposta que é útil para se determinar as condições operacionais do processo, relacionando as variáveis de interesse: teor de biossurfactante, teor de fertilizante e eficiência de remoção de TPH.

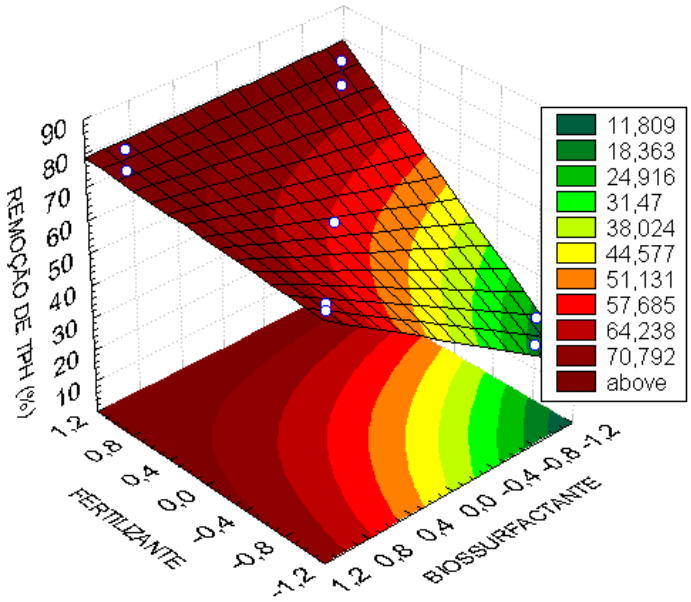
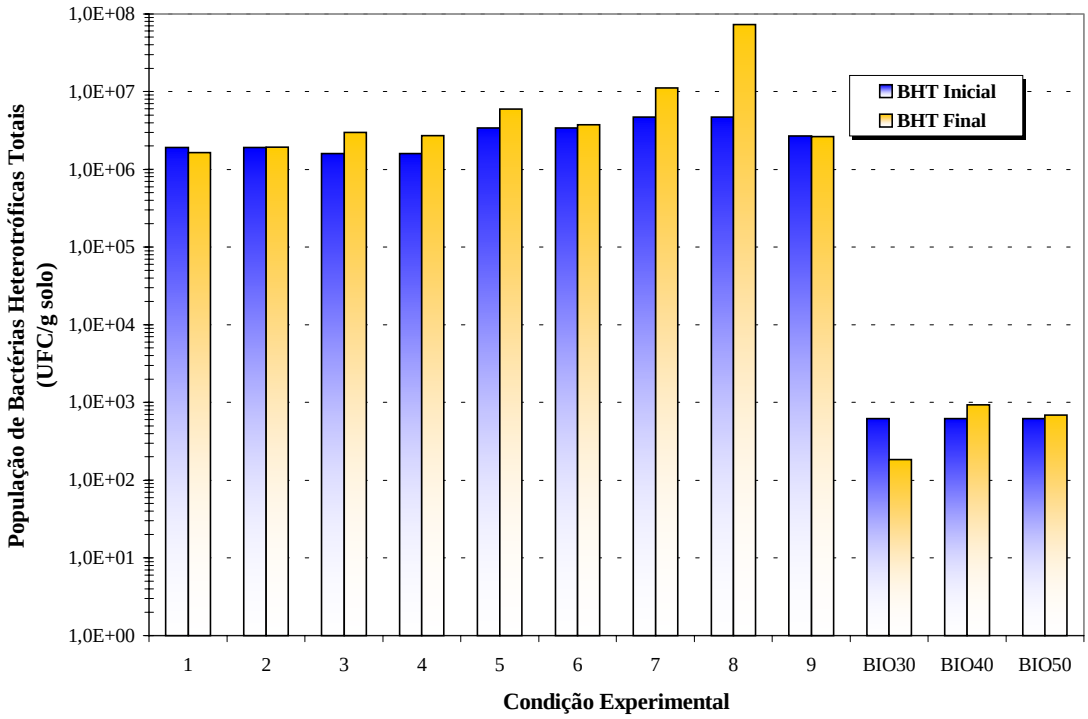


Figura 26: Gráfico de Superfície de Resposta do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH.

Da Figura 26, nota-se que de acordo com o modelo obtido pelo planejamento, verifica-se uma tendência no aumento de remoção de TPH quando há um aumento na concentração de fertilizante e biossurfactante, observação feita anteriormente da Figura 25. Possivelmente, aumentando-se a concentração de fertilizante pode-se convergir a uma condição ótima de remoção do óleo. No entanto, é importante ressaltar que para se alcançar a melhor condição de remoção de TPH, a concentração de fertilizante e de biossurfactante a ser empregada pode onerar o tratamento do solo, tornando-o inviável economicamente.

A Figura 27 apresenta a quantificação da população de bactérias heterotróficas totais aeróbias (BHT) no início e no final dos ensaios, nas diferentes condições experimentais avaliadas no solo argiloso. Observa-se a importância da adição do inóculo visto que no solo a população de bactérias aeróbias inicialmente presente era de apenas 10^2 UFC/g solo (BIO30, BIO40 e BIO50). Pela adição de inóculo, conseguiu-se

alcançar valores de 10^6 UFC/g solo (condição 1 a 9), em média, correspondendo a um aumento de quatro ordens de grandeza. Ressalta-se que essa população manteve-se elevada ao final dos experimentos, mostrando que as condições empregadas foram efetivas para garantir a atividade metabólica desses microrganismos em especial na condição 8, onde foi detectado o maior número de BHT. Nos biorreatores de controle biótico a população de bactérias também se manteve na ordem de 10^2 UFC/g solo em 30, 40 e 50 dias de experimentos (BIO30, BIO40 e BIO50).

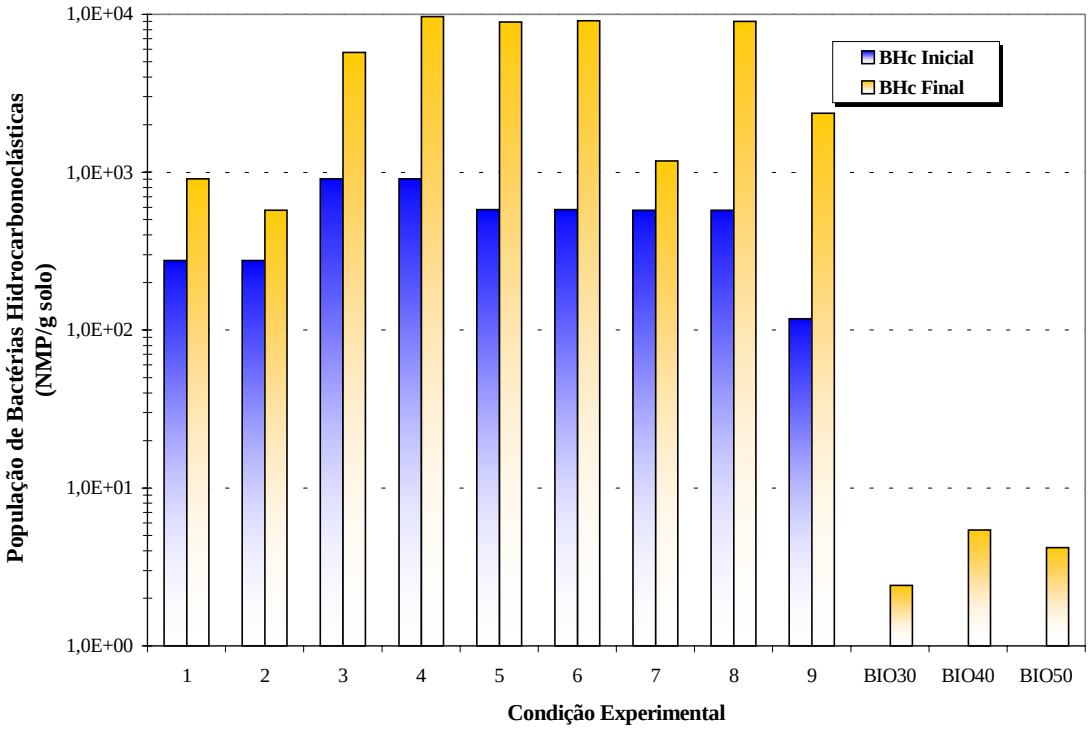


(BIO30: controle biótico realizado em 30 dias; BIO40: controle biótico realizado em 40 dias; BIO50: controle biótico realizado em 50 dias)

Figura 27: População de Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias (BHT) Quantificada Durante o Planejamento Experimental nas Diferentes Condições Avaliadas no Solo Argiloso.

A Figura 28 apresenta a quantificação da população de bactérias hidrocarbonoclásticas aeróbias (BHc) no início e no final dos ensaios nas diferentes condições experimentais avaliadas no solo argiloso. Observa-se que a adição de um inóculo contendo uma população de bactérias degradadoras de óleo da ordem de 10^4 NMP/g solo, possibilitou um aumento de duas ordens de grandeza desta população. Sendo importante ressaltar que durante a caracterização do solo não foi detectada a

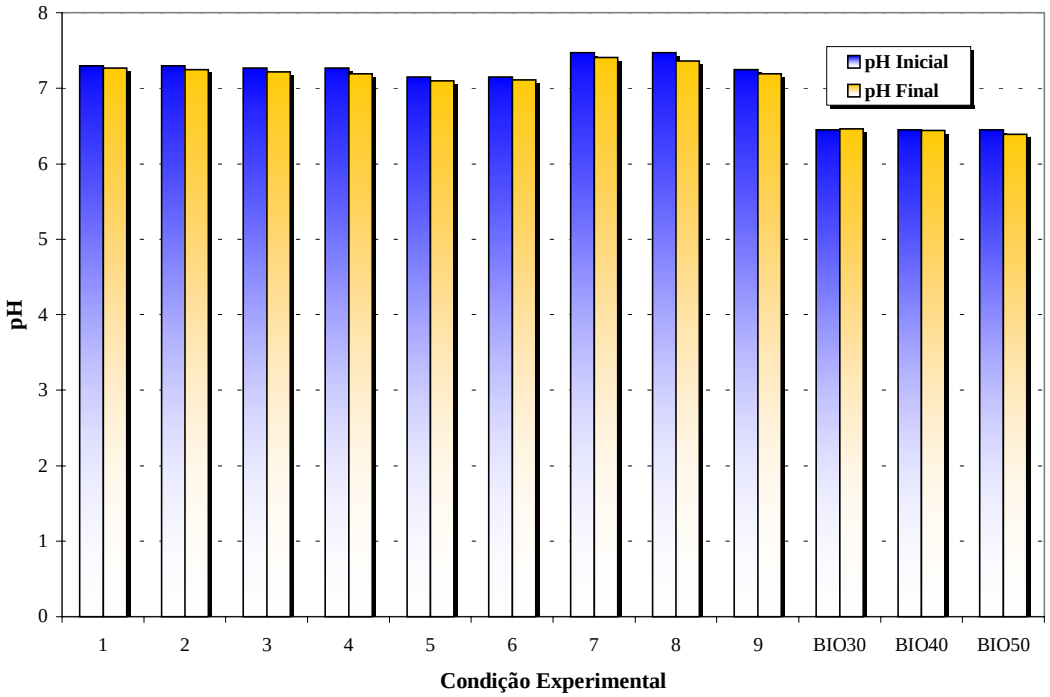
presença de bactérias hidrocarbonoclásticas (BIO30, BIO40 e BIO50). No final dos ensaios, essa população estava presente em menos de uma ordem de grandeza nos biorreatores de controle, enquanto foram registrados valores de 10^3-10^4 NMP/g solo nas demais condições avaliadas (condição 1 a 9). Em geral, foi observado um aumento do número de BHc ligeiramente superior da população de BHT, principalmente nas condições 3, 4, 5, 6 e 8 cujas remoções de TPH foram as maiores. Na condição 7, a população de BHc foi de 10^3 NMP/g solo em 50 dias, apesar da remoção ter sido maior (79,6%) comparativamente aos demais experimentos. Contudo, como não foi feito o monitoramento diário da população de BHc nos biorreatores, possivelmente este valor registrado da condição 7, em 50 dias, represente a queda desta após a atingir um máximo de crescimento.



(BIO30: controle biótico realizado em 30 dias; BIO40: controle biótico realizado em 40 dias; BIO50: controle biótico realizado em 50 dias)

Figura 28: População de Bactérias Hidrocarbonoclásticas Aeróbias (BHc) Quantificada Durante o Planejamento Experimental nas Diferentes Condições Avaliadas no Solo Argiloso.

Na Figura 29 é apresentado o monitoramento do pH inicial e pH final nas diferentes condições experimentais avaliadas no solo argiloso. Nota-se que o pH se manteve dentro da faixa recomendada para a biorremediação, citada na Seção 2.4.7.6 (DRAGUN, 1998; MADIGAN *et al.*, 2000).



(BIO30: controle biótico realizado em 30 dias; BIO40: controle biótico realizado em 40 dias; BIO50: controle biótico realizado em 50 dias)

Figura 29: Monitoramento do pH Inicial e pH Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Argiloso sob Condição Aeróbia.

4.4.2 PLANEJAMENTO FATORIAL DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM SOLO ARENOSO SOB CONDIÇÃO AERÓBIA

4.4.2.1 Planejamento Fatorial 2^3 dos Experimentos Realizados com Solo Arenoso sob Condição Aeróbia

A Tabela 37 apresenta os resultados do planejamento experimental para o solo arenoso sob condição aeróbia nas diferentes condições experimentais avaliadas.

Tabela 37: Resultados do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso sob Condição Aeróbia

Condição	Variáveis Independentes			Remoção de TPH (%)
	Teor de Fertilizante (mg P/kg)	Teor de Biossurfactante (mg/L)	Tempo (dias)	
1	0	0	30	19,5±0,2
2	0	0	50	36,7±0,3
3	0	30	30	27,9±0,3
4	0	30	50	34,7±0,1
5	50	0	30	28,0±0,1
6	50	0	50	14,7±0,4
7	50	30	30	35,7±0,4
8	50	30	50	44,4±0,4
9 (Ponto Central)	25	15	40	55,8±0,4

Da Tabela 37, pode-se observar que o efeito promovido pelo emprego de fertilizante e biossurfactante somente foi relevante na condição 9, isto é, quando se combinaram as suas interações, em seus valores médios. Dos experimentos, verificou-se ainda que a simples adição de um inóculo no solo (condição 1 e 2) favoreceu o aumento do percentual de remoção de TPH alcançando um valor de 36,7% em 50 dias. Mesmo assim, esses valores foram maiores que aqueles obtidos no controle biótico (BIO30, BIO40 e BIO50) cujo percentual variou de 5,2 a 6,8% nos mesmos períodos avaliados. Os resultados desse planejamento foram bem distintos dos obtidos para o solo argiloso. Isto denota a necessidade de uma análise criteriosa do local a ser tratado de modo a definir as estratégias a serem adotadas caso a caso.

No planejamento experimental realizado com o solo arenoso considerando-se um intervalo de confiança de 95% (Análise ANOVA), os resultados obtidos não permitiram a obtenção de um modelo matemático que representasse os efeitos promovidos pelas variáveis, nos níveis estudados.

Analisando as Tabelas 36 e 37, observa-se que as eficiências de remoção de TPH foram maiores para o solo argiloso comparativamente ao arenoso, quando se empregou o biossurfactante. Esse efeito, no solo arenoso, pode ser atribuído à redução do contato das células microbianas ao óleo, conseqüentemente, diminuindo a taxa de degradação (NOORDMAN *et al*., 2002). Além dos solos arenosos apresentarem maior permeabilidade que os argilosos, a adição de biossurfactante pode ter intensificado a mobilidade do óleo e, portanto, reduzido o contato célula-óleo. Somado a isso, o efeito tóxico dos hidrocarbonetos de petróleo aos microrganismos possivelmente foi maior em solos arenosos, devido ao baixo teor de matéria orgânica e argila. A matéria orgânica e a argila tendem a sorver o contaminante diminuindo o seu transporte e a sua biodisponibilidade na fase aquosa e gasosa do solo. Em função do baixo teor de matéria orgânica no solo arenoso, o efeito inibitório foi maior para a população microbiana quando comparado com os resultados obtidos dos ensaios realizados com o solo argiloso (LABUD *et al*., 2007). Por outro lado, o solo argiloso, devido a sua capacidade de sorção (FINE *et al*., 1997), provavelmente possibilitou uma melhor interação célula-óleo resultando em maiores remoções de TPH, em torno de 70%.

A Figura 30 apresenta a quantificação da população de bactérias heterotróficas totais aeróbias (BHT) no início e no final dos ensaios nas diferentes condições experimentais avaliadas no solo arenoso. Observa-se que a adição do inóculo no solo a população de bactérias heterotróficas aeróbias aumentou de 10^4 UFC/g solo para 10^6 UFC/g solo, em média, correspondendo a um aumento de duas ordens de grandeza. Contudo, essa população variou de 10^5 a 10^7 UFC/g solo, ao final dos ensaios. Nos biorreatores de controle biótico não foi observado aumento da população de bactérias heterotróficas totais, mantendo-se na ordem de 10^4 UFC/g solo em 30, 40 e 50 dias (BIO30, BIO40 e BIO50).

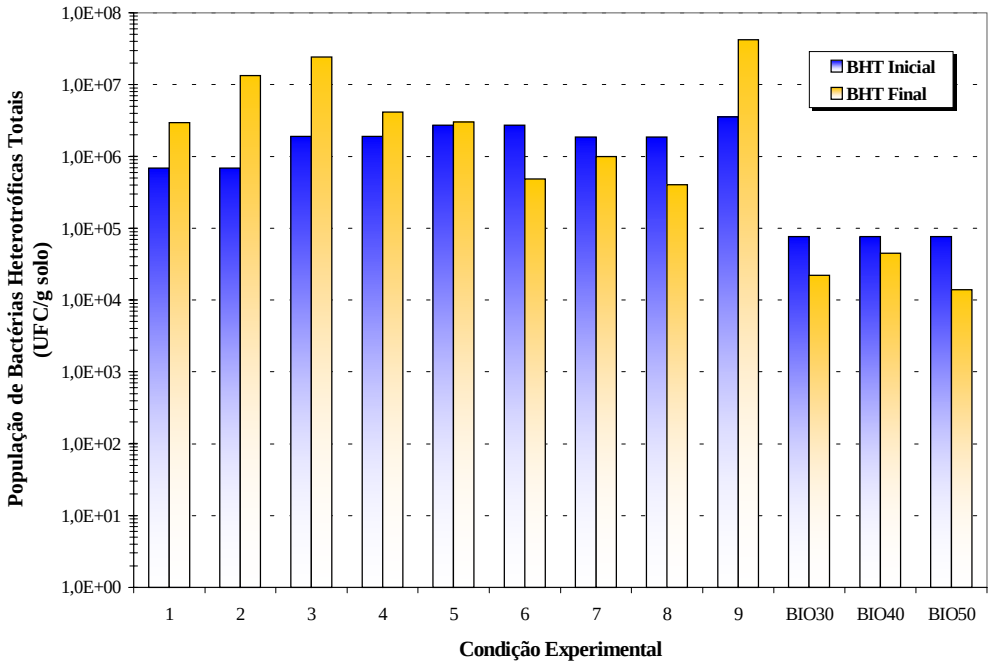


Figura 30: População de Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias (BHT) Quantificada Durante o Planejamento Experimental nas Diferentes Condições Avaliadas no Solo Arenoso.

A Figura 31 apresenta a quantificação da população de bactérias hidrocarbonoclásticas aeróbias (BHc) no início e no final dos ensaios nas diferentes condições experimentais avaliadas no solo arenoso. Observa-se que com a adição do inóculo contendo uma população de bactérias degradadoras de óleo da ordem de 10^4 NMP/g solo, possibilitou um aumento de duas ordens de grandeza desta população. É importante ressaltar que nos reatores de controle biótico (BIO30, BIO40 e BIO50) não foi detectada a presença de bactérias hidrocarbonoclásticas ao final dos experimentos.

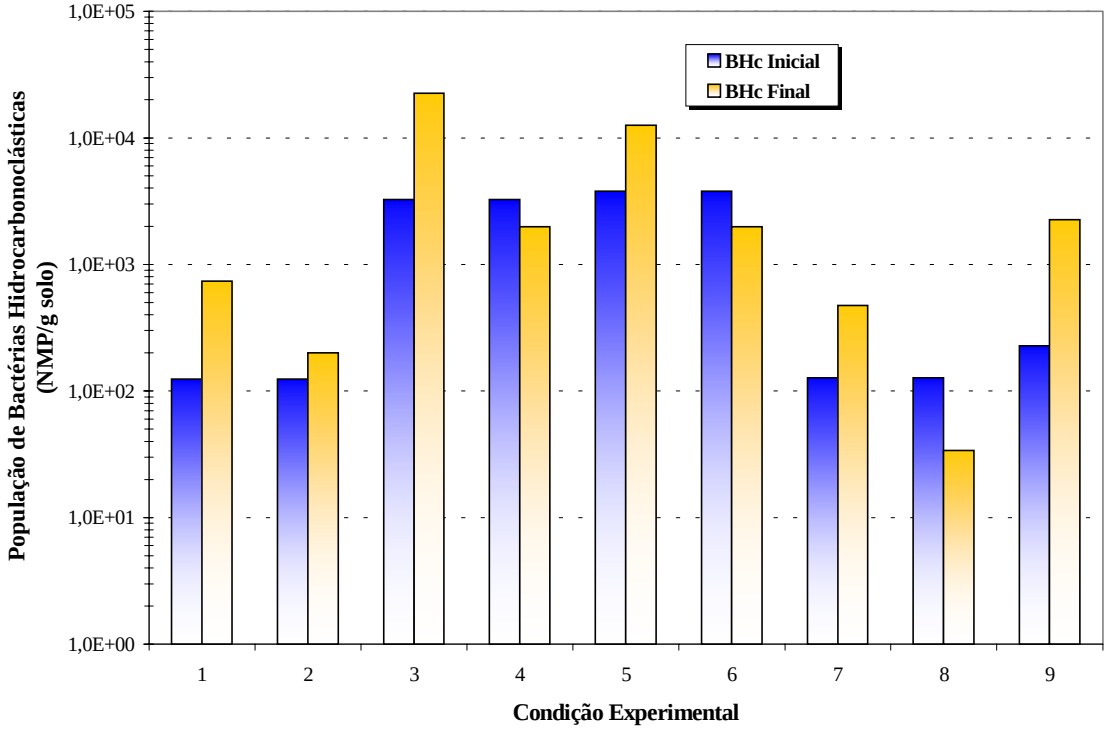


Figura 31: População de Bactérias Hidrocarbonoclásticas Aeróbias (BHc) Quantificada Durante o Planejamento Experimental nas Diferentes Condições Avaliadas no Solo Arenoso.

Da Figura 31, observa-se ainda que para algumas das condições experimentais ocorreu uma queda da população de BHc com o aumento do tempo de 30 para 50 dias. Comportamento distinto foi observado quando o tratamento foi realizado com o solo argiloso (Figura 28).

Na Figura 32 é apresentado o monitoramento do pH inicial e pH final nas diferentes condições experimentais avaliadas no solo arenoso. Observa-se que houve uma pequena variação do pH nos biorreatores. No entanto, esta se manteve dentro da faixa considerada ideal (6,5-8,0) para a biodegradação do óleo no solo (DRAGUN, 1998).

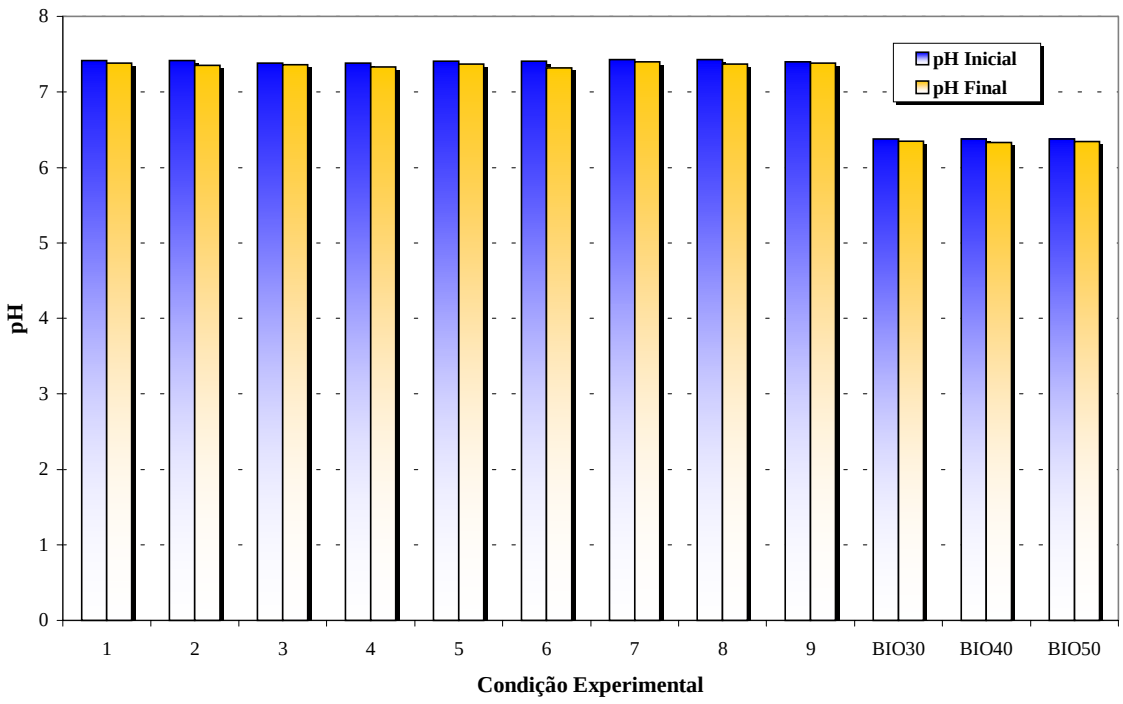


Figura 32: Monitoramento do pH Inicial e pH Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Arenoso

4.4.2.2 Planejamento Fatorial 2^2 dos Experimentos Realizados com Solo Arenoso sob Condição Aeróbia

Um novo planejamento experimental foi necessário, visto que com os resultados obtidos anteriormente não foi possível estimar as variáveis significativas para o processo de biodegradação. Diferentemente do planejamento apresentado na Seção 4.2.2.1, neste o tempo não foi considerado como uma variável relevante a ser avaliada.

A Tabela 38 apresenta os resultados obtidos do planejamento experimental 2^2 para o solo arenoso sob condição aeróbia. É possível observar da Tabela 38 que tanto a adição de biossurfactante quanto à correção de nutrientes no solo não foram relevantes para o processo quando empregados isoladamente. Como dito anteriormente, o biossurfactante apresenta elevada biodegradabilidade e isto pode ter influenciado na baixa remoção de TPH (12,97%) na condição 3. Existe a possibilidade que o biossurfactante empregado para a biorremediação tenha sido utilizado pela população

microbiana como substrato, resultando em baixa taxa de degradação do contaminante (SINGH *et al.*, 2007). No entanto, a combinação de ambas as variáveis (condição 4, 5 e 6) potencializou a remoção de TPH no solo.

Em relação à condição 1, pode-se destacar a importância da adição de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que mesmo na ausência de fertilizante e biossurfactante foi possível alcançar uma remoção de aproximadamente 33%. Segundo KOSARIC (1996), o emprego de uma população microbiana adaptada ao contaminante pode ser uma alternativa eficaz no tratamento de solos contaminados.

Tabela 38: Resultados do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso

Condição	**Variáveis Independentes**		**Remoção de TPH (%)**
	Teor de Fertilizante (mg P/kg)	**Teor de Biossurfactante (mg/L)**	
1	0	0	33,27±0,5
2	50	0	29,11±0,8
3	0	30	12,97±1,0
4	50	30	61,17±1,0
5 (Ponto Central)	25	15	42,23±0,3
6 (Ponto Central)	25	15	43,41±0,3

A Figura 33 apresenta o digrama de Pareto do planejamento experimental para o solo arenoso cuja variável de resposta foi a remoção de TPH. A partir dessa Figura, observa-se que o emprego isolado do biossurfactante no solo não foi significativo estatisticamente tendo a remoção de TPH como variável de resposta. No entanto, quando o mesmo está associado à correção de nutrientes no solo esta remoção tende a aumentar, potencializando a biodegradação do óleo. Além disso, pode-se observar que o efeito da interação positiva fertilizante-biossurfactante foi maior comparativamente ao emprego somente do fertilizante. Talvez isso tenha ocorrido, posto que o biossurfactante não somente é capaz de aumentar a biodegradação do óleo no solo, como também pode aumentar a disponibilidade dos nutrientes (BREDHOLT *et al.*, 1998 *apud* CHRISTOFI e IVSHINA 2002) e isto pode ter contribuído para uma maior remoção de TPH.

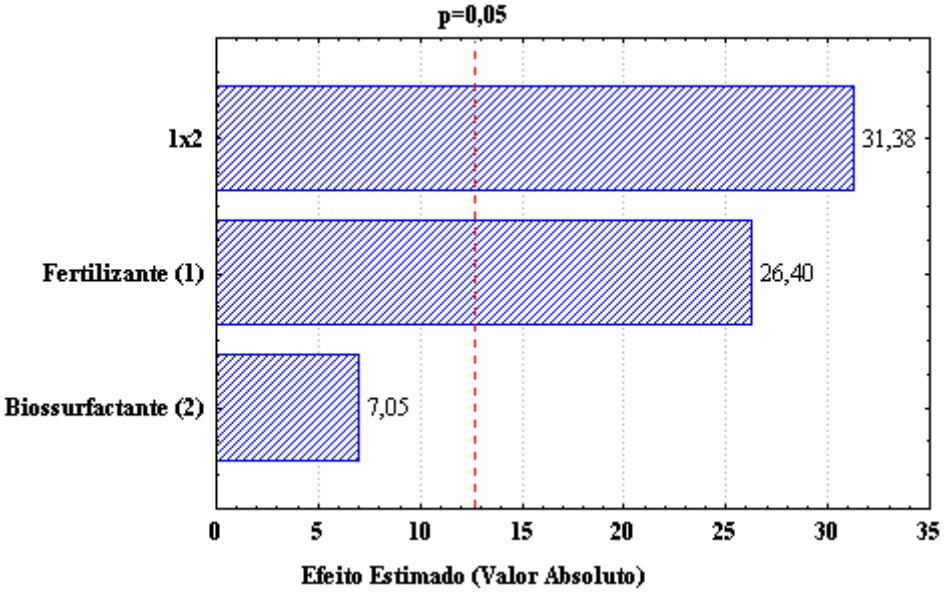


Figura 33: Diagrama de Pareto do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH.

A Figura 34 apresenta o gráfico das médias marginais que relaciona as duas variáveis avaliadas, considerando-se um limite de confiança de 95%.

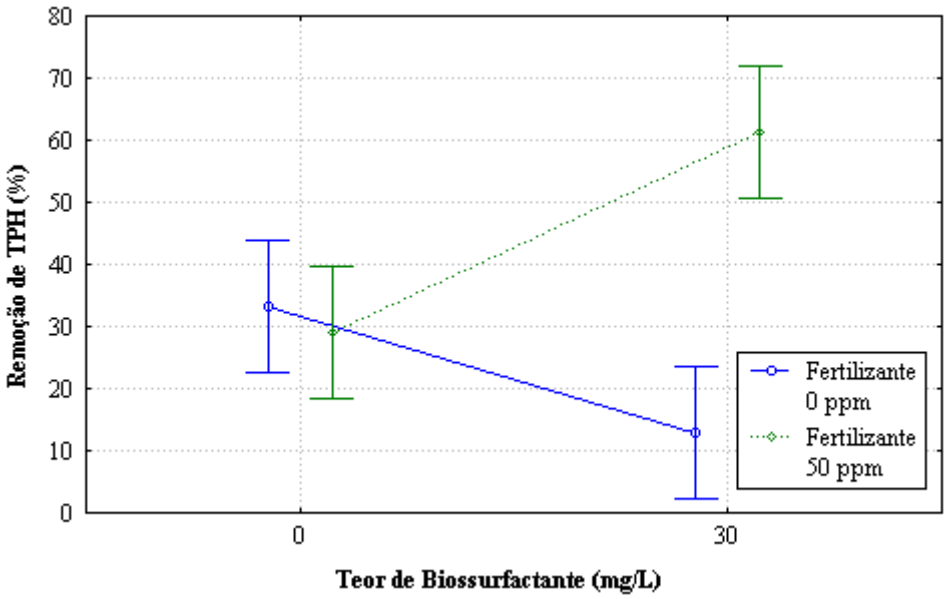


Figura 34: Gráfico das Médias Marginais do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH.

Da Figura 34, verifica-se a existência de uma interação significativa no planejamento experimental fatorial entre as variáveis, teor de fertilizante e teor de biossurfactante, cujas linhas do teor de fertilizante dos níveis –1 e +1 se cruzam, indicando a existência de uma interação entre elas, no menor nível avaliado do teor do biossurfactante (0 mg/L). Ademais, nota-se que ao se empregar a maior concentração de fertilizante, pode-se obter um aumento na remoção de TPH à medida que se aumenta a concentração do biossurfactante no solo. Contudo, quando não é feita a correção de nutrientes, não é recomendada a adição do biossurfactante, posto que a remoção de TPH é menor.

Na Figura 35 é apresentado o gráfico de superfície de resposta do planejamento experimental para o solo arenoso cuja variável de resposta foi a remoção de TPH.

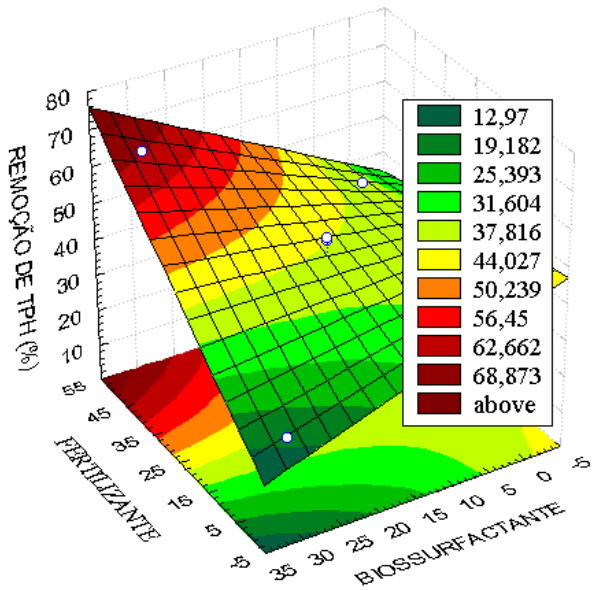


Figura 35: Gráfico de Superfície de Resposta do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH.

Da Figura 35, pode-se observar que o aumento da concentração do biossurfactante e fertilizante no solo, a remoção de TPH tende a aumentar, de acordo com o modelo obtido a partir do planejamento experimental fatorial 2^2, observação similar àquela feita a partir da Figura 34.

A Figura 36 apresenta a quantificação da população de bactérias heterotróficas totais aeróbias (BHT) no início e no final dos ensaios nas diferentes condições experimentais avaliadas no solo arenoso. Observou-se que a adição do inóculo no solo a população de bactérias aeróbias aumentou de 10^4 UFC/g solo para 10^5 UFC/g solo. Essa população variou de 10^5 a 10^6 UFC/g solo no final dos experimentos. Na ausência de fertilizante e biossurfactante (condição 0/0), observou-se uma queda na população de BHT, assim como no biorreator de controle biótico (condição BIO).

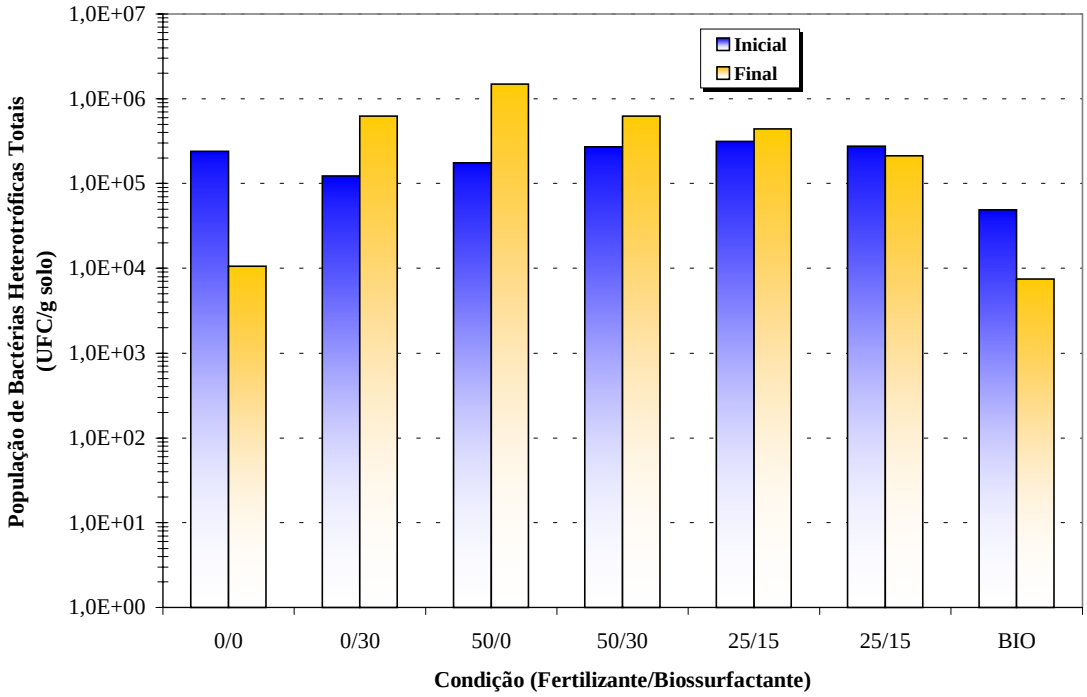


Figura 36: População de Bactérias Heterotróficas Totais Aeróbias (BHT) Quantificada Durante o Planejamento Experimental nas Diferentes Condições Avaliadas no Solo Arenoso.

A Figura 37 apresenta a quantificação da população de bactérias hidrocarbonoclásticas aeróbias (BHc) no início e no final dos ensaios nas diferentes condições experimentais avaliadas no solo arenoso. Observou-se que a adição do inóculo possibilitou um aumento de duas ordens de grandeza desta população. É importante ressaltar que durante a caracterização do solo não foi detectada a presença de bactérias hidrocarbonoclásticas (Tabela 31).

Da Figura 37, observou-se ainda que a população de BHc aumentou ao final dos experimentos. Em geral, as condições experimentais foram mais favoráveis à população de BHc em comparação a de BHT. A adição de fertilizante foi mais favorável e, para uma mesma concentração de fertilizante, o aumento da população foi diretamente proporcional ao aumento da quantidade de biossurfactante adicionado. Esses resultados estão em consonância com a remoção de TPH.

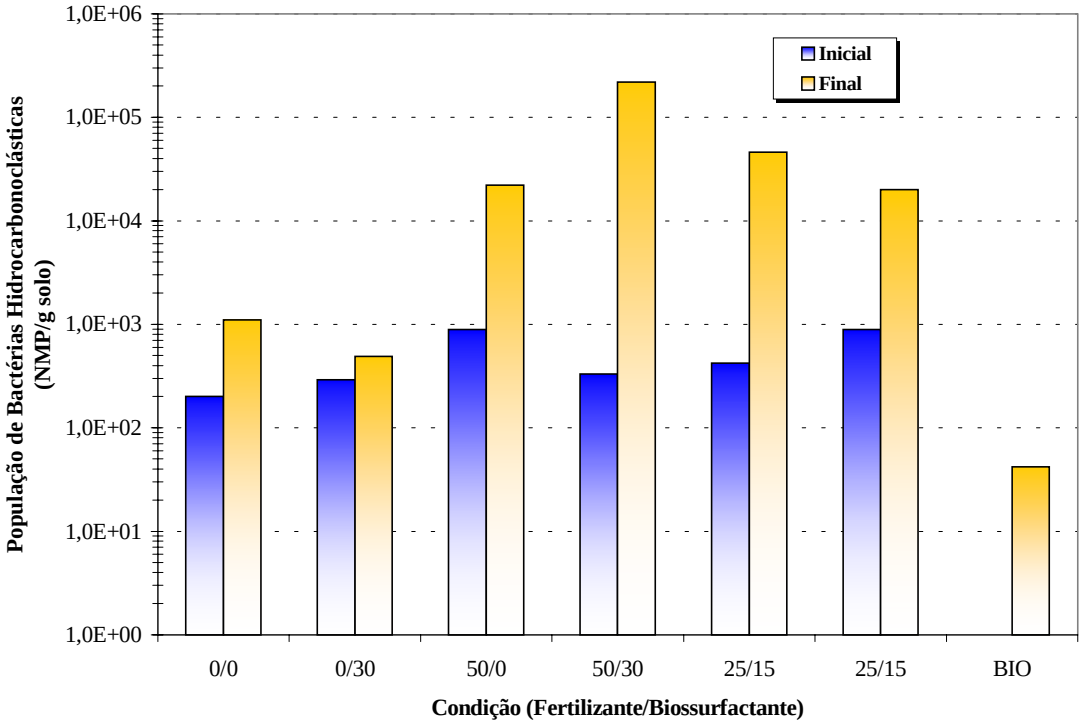


Figura 37: População de Bactérias Hidrocarbonoclásticas Aeróbias (BHc) Quantificada Durante o Planejamento Experimental nas Diferentes Condições Avaliadas no Solo Arenoso.

Na Figura 38 é apresentado o monitoramento do pH inicial e pH final nas diferentes condições experimentais avaliadas no solo arenoso. Assim como observado nos experimentos anteriores (Seção 4.4.2.1), houve uma pequena variação do pH nos biorreatores, nada comprometendo a atividade bacteriana, e conseqüentemente, o processo de biorremediação.

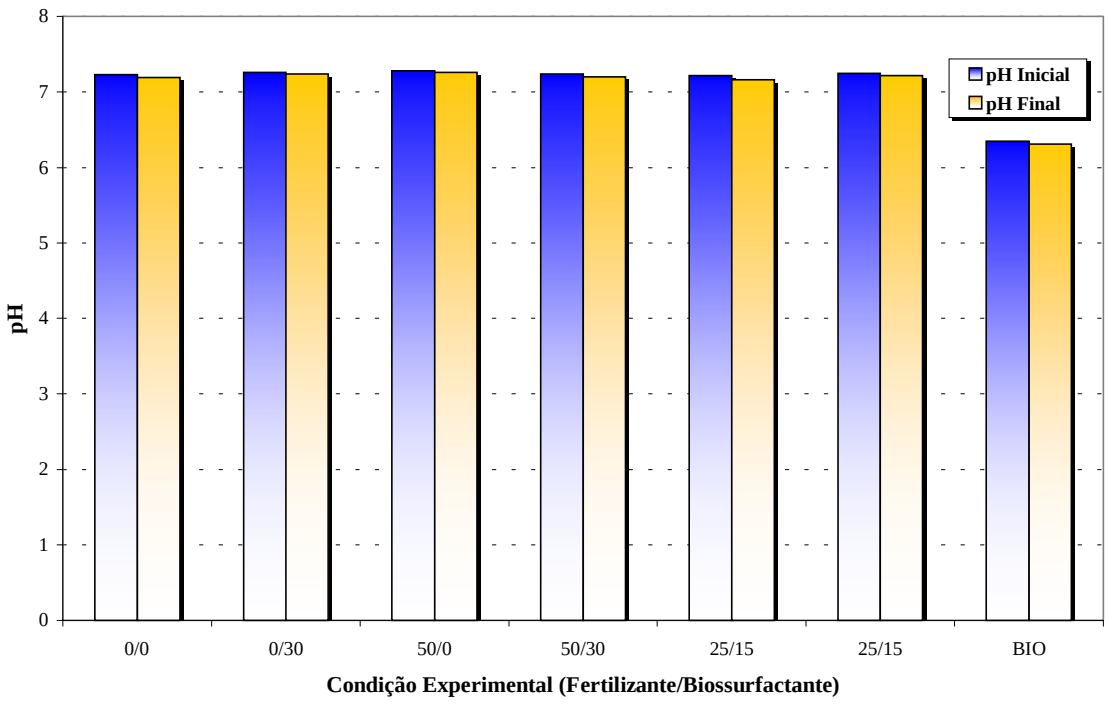


Figura 38: Monitoramento do pH Inicial e pH Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Arenoso.

4.5 BIORREMEDIAÇÃO ANAERÓBIA

4.5.1 PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM SOLO ARGILOSO SOB CONDIÇÃO ANAERÓBIA

A Tabela 39 apresenta os resultados do planejamento experimental para o solo argiloso sob condição anaeróbia nas diferentes condições avaliadas.

Tabela 39: Resultados do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso sob Condição Anaeróbia

Condição	Variáveis Independentes			Remoção de TPH (%)
	Teor de Fertilizante (mg P/kg)	Teor de Biossurfactante (mg/L)	Tempo (dias)	
1	0	0	30	29,8±0,1
2	50	0	30	63,2±1,1
3	0	60	30	52,6±0,7
4	50	60	30	65,8±0,8
5	0	0	60	33,4±0,7
6	50	0	60	68,3±0,7
7	0	60	60	67,4±0,2
8	50	60	60	72,7±0,8
9 (ponto Central)	25	30	45	49,3±0,4
10 (Ponto Central)	25	30	45	50,7±0,4

Da Tabela 39, observa-se que quando somente se empregou o biossurfactante para o tratamento do solo argiloso (condições 3 e 7), as eficiências de remoção de TPH em 30 e 60 dias foram, respectivamente, 52,6% e 67,4%. Além disso, a combinação do emprego de fertilizante e de biossurfactante (condições 4 e 8), os percentuais de remoção de TPH aumentaram para 65,8% e 72,7%, nesse mesmo período estudado. No entanto, quando se fez apenas a correção de nutrientes no solo (condições 2 e 6), o percentual de remoção de TPH foi 63,2%, em 30 dias, e em 60 dias este valor foi 68,3%, valores próximos daqueles obtidos quando se empregou o biossurfactante. Alguns autores citam que a correção dos teores de nitrogênio e fósforo no solo contaminado pode acelerar a biodegradação (LEAHY e COLWELL, 1990) e estimular o crescimento da população microbiana (KOSARIC, 1996).

Comparando-se os resultados, pode-se observar que quando se empregou apenas o biossurfactante foram necessários 60 dias para que a remoção de TPH ficasse acima de 60%. Entretanto, em relação à correção de nutrientes, percentual semelhante foi obtido em apenas 30 dias, e alcançando 70%, em 60 dias. Mediante isso, a combinação dos efeitos das duas variáveis estudadas não resultou em um aumento significativo que justificasse o emprego futuro de ambas no tratamento.

A partir dos experimentos, observou-se ainda que o emprego do inóculo anaeróbio no solo auxiliou na remoção de TPH quando comparado com os ensaios bióticos. Nos solos onde não foi feita qualquer correção, controle biótico, a remoção de TPH variou entre 5,3% a 6,2%, nos diferentes tempos avaliados (30, 45 e 60 dias). Em contrapartida, com a adição do inóculo esta foi 29,8% (condição 1), em 30 dias, e 33,4% (condição 5), em 60 dias. Nota-se que a adição de uma população microbiana adaptada a um ambiente contaminado com óleo diesel potencializou a biodegradação do contaminante presente no solo. Esses resultados corroboram as observações feitas por LI *et al.* (2000), cuja adição de microrganismos degradadores de óleo foi mais eficiente na remoção de hidrocarbonetos de petróleo do que a biodegradação intrínseca. Os autores observaram eficiência de remoção de apenas 1,7% da massa de hidrocarbonetos de petróleo em 32 dias, na biodegradação intrínseca, enquanto que utilizando o inóculo a eficiência de remoção foi de 42%, neste mesmo período.

A Figura 39 apresenta o diagrama de Pareto do planejamento experimental para o solo argiloso cuja variável de resposta foi a remoção de TPH. No planejamento experimental realizado com o solo argiloso sob condição anaeróbia, os valores obtidos de remoção de TPH foram significativos considerando-se um intervalo de confiança de 95% ($P \leq 0{,}05$), ou seja, os dados são significativos estatisticamente. A partir do diagrama, observa-se que dentre as variáveis avaliadas, somente o emprego do biossurfactante e do fertilizante foi significativo nos níveis estudados. A variável tempo, que também foi avaliada, não foi significativa a partir dos resultados obtidos dos experimentos nos níveis estudados.

Na Figura 40 é apresentado o gráfico das médias marginais que relaciona as variáveis avaliadas, considerando-se um limite de confiança de 95%. A partir dessa Figura, verifica-se a existência de interação significativa no planejamento experimental

fatorial entre as variáveis teor de fertilizante e teor de biossurfactante, já que as linhas teor de fertilizante dos níveis –1 e +1 tendem a se cruzar, indicando a existência de uma interação entre elas, no maior nível avaliado de biossurfactante (60 mg/L).

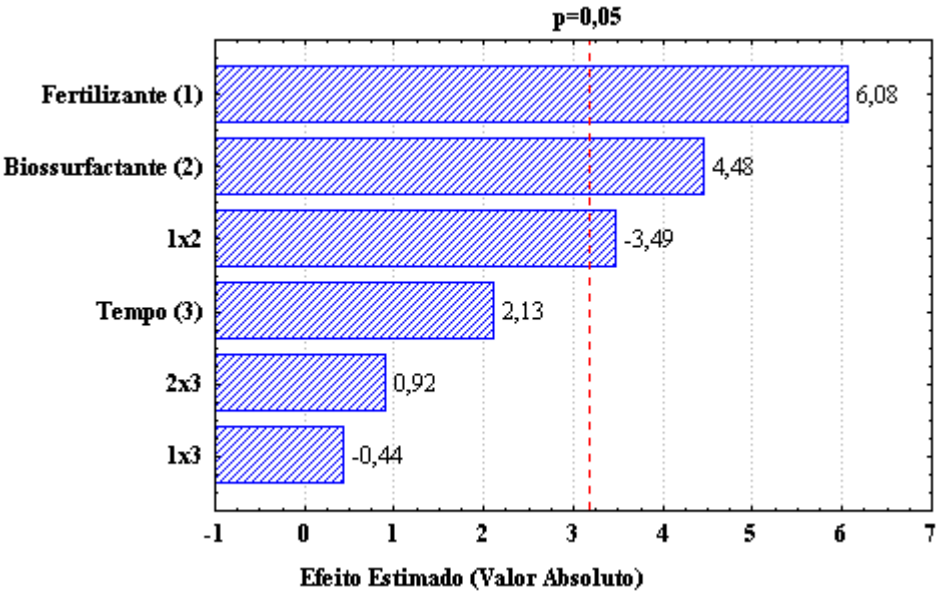


Figura 39: Diagrama de Pareto do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso sob Condição Anaeróbia cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH.

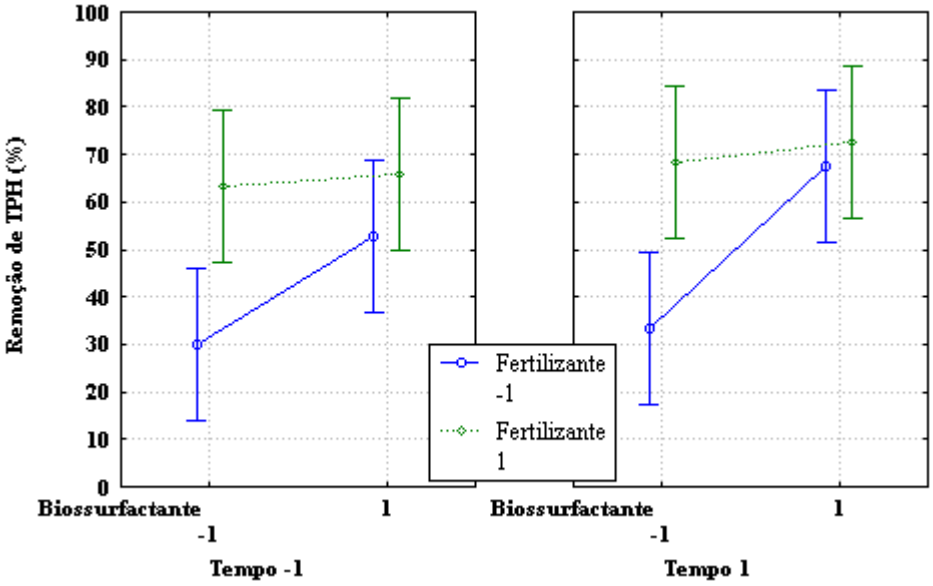


Figura 40: Gráfico das Médias Marginais do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH.

Da Figura 40, observa-se ainda que na ausência de fertilizante (nível –1), a remoção de TPH tende aumentar com o aumento da concentração do biossurfactante, independente dos níveis avaliados para o tempo. No entanto, quando se emprega o maior nível de fertilizante, a eficiência de remoção de TPH praticamente é independe tanto da concentração empregada do biossurfactante quanto do tempo avaliado. Tais efeitos também foram observados no planejamento fatorial 2^3 nos experimentos realizados com solo argiloso sob condição aeróbia (Seção 4.4.1).

A Figura 41 é um gráfico de superfície de resposta do planejamento experimental para o tratamento anaeróbio do solo argiloso que é útil para se determinar as condições operacionais do processo, relacionando as principais variáveis de interesse: biossurfactante, fertilizante e eficiência de remoção de TPH.

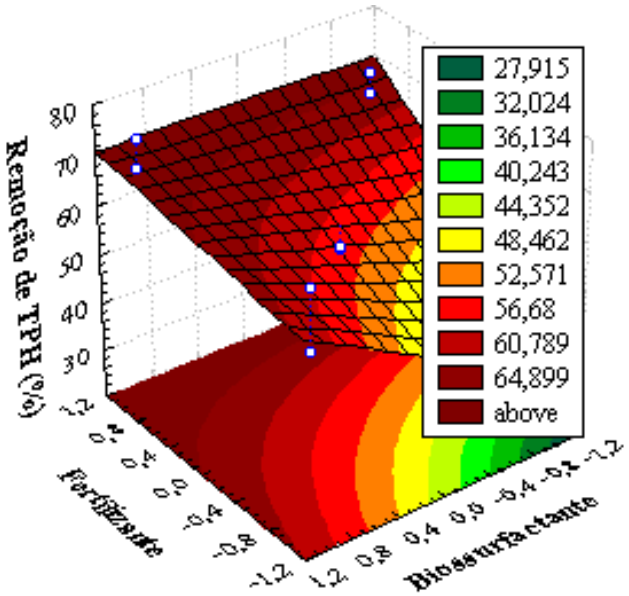
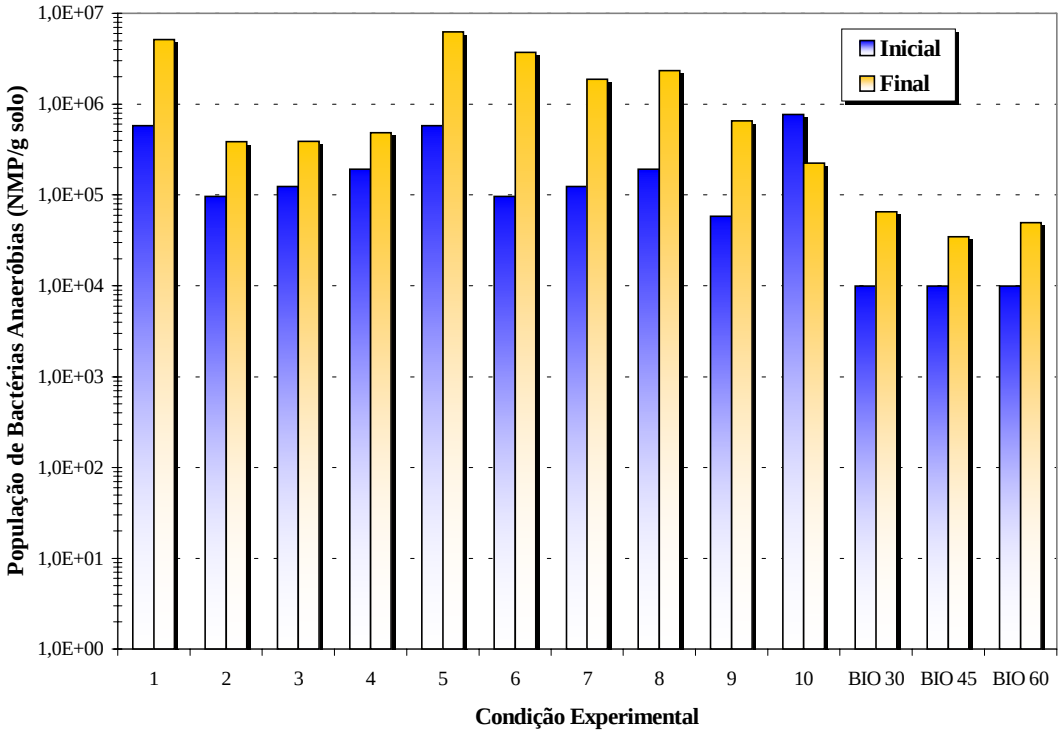


Figura 41: Gráfico de Superfície de Resposta do Planejamento Experimental para o Solo Argiloso sob Condição Anaeróbia cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH.

Da Figura 41 é possível observar que o aumento da concentração do biossurfactante e do fertilizante no solo, a eficiência de remoção de TPH tende a aumentar. De acordo com alguns autores, solos contaminados que apresentam baixo teor de nutrientes necessitam de correção para permitir um aumento na degradação de hidrocarbonetos (LEAHY e COLWELL, 1990; FERGUSON *et al*., 2003). Além disso, o emprego de biossurfactante pode favorecer a biodegradação em função do aumento de sua disponibilidade aos microrganismos (KIRSHNER *et al.*, 1980; RON e ROSENBERG, 2001). No entanto, de acordo com a literatura, o emprego excessivo de nutrientes no solo pode ter um efeito inibitório na atividade da população microbiana nele presente (ZHOU e CRAWFORD, 1995; LIEBEG e CUTRIGHT, 1999). O mesmo pode ser observado quando se empregam elevadas concentrações de surfactante, visto que o aumento da biodisponibilidade de um contaminante pode aumentar o seu efeito tóxico aos microrganismos degradadores (WELP e BRÜMMER, 1998 *apud* CHRISTOFI e IVSHINA, 2002), apesar de não ter sido avaliada a toxicidade nos solos ao final dos experimentos.

A Figura 42 apresenta a quantificação da população de bactérias heterotróficas totais anaeróbias (BAN) no início e no final dos ensaios, nas diferentes condições experimentais avaliadas no solo argiloso. Observa-se que no início dos experimentos, nos biorreatores biaumentados a população de bactérias anaeróbias aumentou de uma ordem de grandeza, atingindo o valor 10^5 NMP células/g solo, em média. Nos biorreatores de controle biótico a população de bactérias manteve-se na ordem de 10^4 NMP/g solo em 30, 45 e 60 dias de experimentos (BIO30, BIO45 e BIO60).

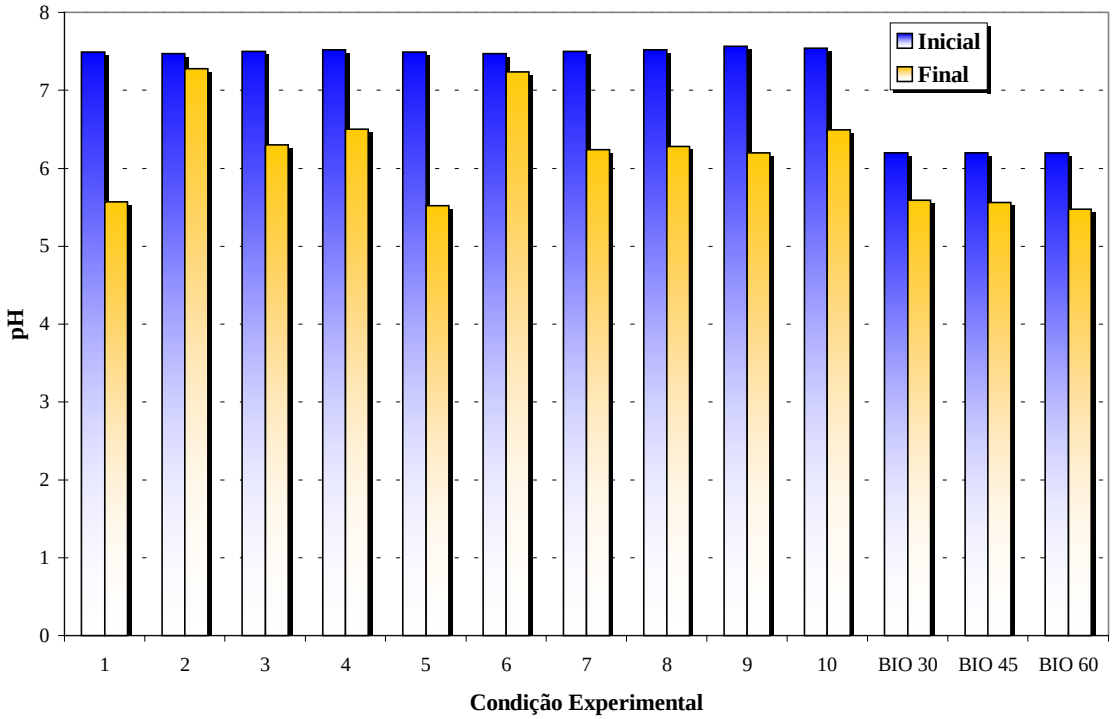
No entanto, em algumas das condições experimentais, houve aumentos máximos de uma ordem de grandeza. Estes casos foram observados para o maior tempo de processo. A velocidade específica de crescimento dos microrganismos anaeróbios é menor do que os aeróbios uma vez que a quantidade de energia gerada em condição de anaerobiose é bem menor.



(BIO30: controle biótico em 30 dias; BIO45: controle biótico em 45 dias; BIO60: controle biótico em 60 dias)

Figura 42: População de Bactérias Heterotróficas Totais Anaeróbias (BAN) Quantificada no Início e no Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Argiloso.

Na Figura 43 é apresentado o monitoramento dos valores iniciais e finais de pH nas diferentes condições experimentais em anaerobiose avaliadas no solo argiloso. Similarmente à degradação aeróbia, observou-se queda dos valores de pH nos biorreatores, embora mais expressivas. Exceto nas condições 1 e 5 e para os controles bióticos (BIO30, BIO45 e BIO60), os valores de pH se mantiveram dentro da faixa considerada ideal (6,5-8,0) para a biodegradação do óleo no solo (DRAGUN, 1998). Note-se que as condições 1 e 5 são semelhantes as dos controles bióticos quanto à ausência de fertilizante e biossurfactante. A distinção entre esses ensaios e os controles bióticos está na adição ou não de inóculo. Apesar dos mais baixos valores de pH, em torno de 5,5, as remoções de TPH obtidas nas condições 1 e 5 foram de 30%, em média, um valor superior àqueles obtidos no controle biótico.



(BIO30: controle biótico em 30 dias; BIO45: controle biótico em 45 dias; BIO60: controle biótico em 60 dias)

Figura 43: Monitoramento do pH Inicial e pH Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Argiloso.

4.5.2 PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM SOLO ARENOSO SOB CONDIÇÃO ANAERÓBIA

A Tabela 40 apresenta os resultados do planejamento experimental para o solo arenoso sob condição anaeróbia nas diferentes condições avaliadas.

Tabela 40: Resultados do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso sob Condição Anaeróbia

Condição	Variáveis Independentes			Remoção de TPH (%)
	Teor de Fertilizante (mg P/kg)	Teor de Biossurfactante (mg/L)	Tempo (dias)	
1	0	0	30	12,2±0,5
2	50	0	30	24,2±0,2
3	0	30	30	14,6±0,3
4	50	30	30	33,3±0,1
5	0	0	60	13,9±0,5
6	50	0	60	30,1±0,3
7	0	30	60	19,5±0,1
8	50	30	60	53,4±0,5
9 (ponto Central)	25	15	45	38,2±0,3
10 (Ponto Central)	25	15	45	34,2±0,7

Nos experimentos realizados com o solo arenoso, observam-se as remoções de TPH inferiores às obtidas no solo argiloso (Seção 4.5.1) em condição de anaerobiose. Da Tabela 40, observa-se que nas condições 1 e 5, onde não se adicionou fertilizante e biossurfactante, as remoções foram de apenas 12,2% e 13,9%, respectivamente, em 30 e 60 dias. Mesmo assim, esses valores foram duas vezes maiores que aqueles obtidos no controle biótico cujo percentual variou de 6,6 a 7,8% no mesmo período avaliado.

Em relação ao emprego do fertilizante no solo (condições 2 e 6), observa-se que a remoção de TPH atingiu um percentual de 30% em 60 dias, diferentemente do que foi obtido quando somente se empregou o biossurfactante (condições 3 e 7) cujo valor foi 19,7%. A adição simultânea de fertilizante e biossurfactante (condições 4 e 8), a remoção somente atingiu um valor acima de 50% em 60 dias de experimentos.

A partir dos resultados, foi possível avaliar que o emprego de biossurfactante no tratamento do solo arenoso não foi significativo para remoção de TPH em condição de anaerobiose da mesma forma que em aerobiose. No entanto, tal afirmativa somente foi possível ser validada a partir da Figura 44 que apresenta o diagrama de Pareto do planejamento experimental para o solo arenoso cuja variável de resposta foi a remoção de TPH.

No planejamento experimental realizado com o solo arenoso sob condição de anaerobiose, os valores obtidos de remoção de TPH foram significativos considerando-se um intervalo de confiança de 95% (P≤0,05), ou seja, os dados são significativos estatisticamente.

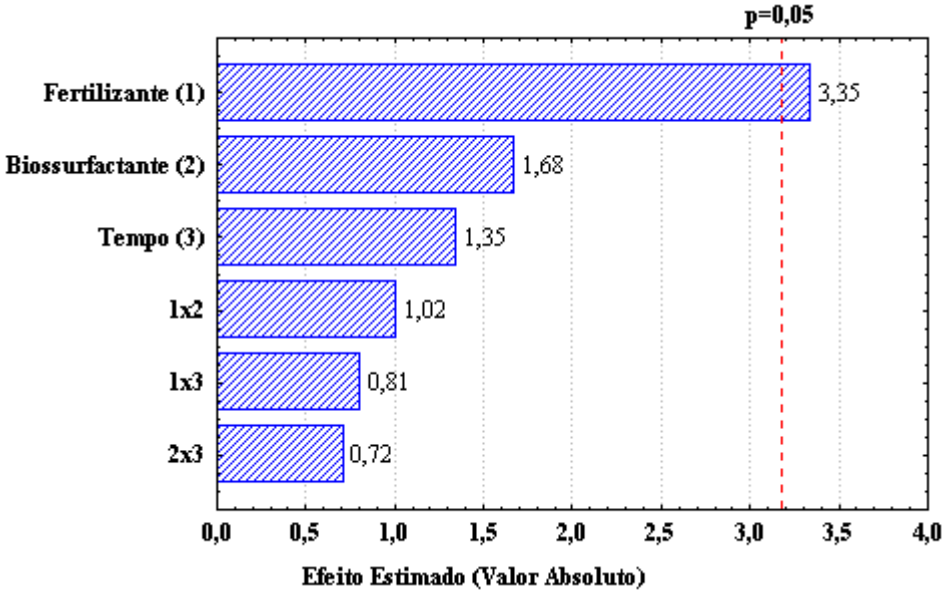


Figura 44: Diagrama de Pareto do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso sob Condição Anaeróbia cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH.

Do diagrama de Pareto, observa-se que dentre as variáveis avaliadas, o emprego do fertilizante foi significativo nos níveis estudados, tendo um efeito positivo, ou seja, o aumento da concentração tenderá a um aumento da remoção de TPH. Em relação às variáveis concentração de biossurfactante e tempo, as mesmas não foram significativas a partir dos resultados obtidos dos experimentos nos níveis estudados.

Na Figura 45 é apresentado o gráfico das médias marginais que relaciona as variáveis avaliadas, considerando-se um limite de confiança de 95%.

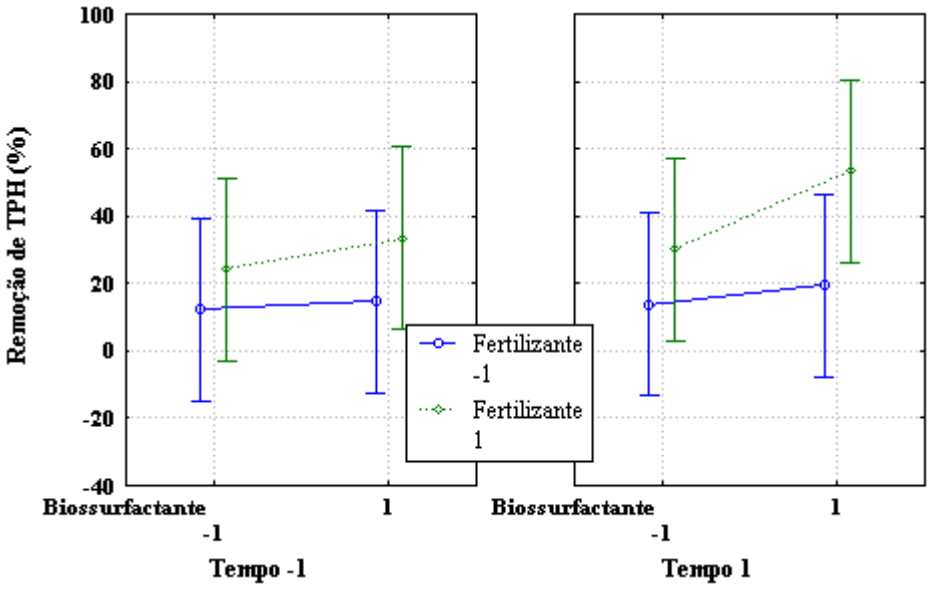


Figura 45: Gráfico das Médias Marginais do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH.

Da Figura 45, nota-se que ao se empregar a maior concentração de fertilizante no solo, pode-se obter um aumento na remoção de TPH à medida que se aumenta a concentração do biossurfactante no solo. Contudo, quando não é feita a correção de nutrientes no solo, não é recomendada a adição do biossurfactante, posto que se pode obter uma menor remoção de TPH. Possivelmente isso ocorreu, pois os microrganismos degradaram mais facilmente o biossurfactante (TIEHM, 1994 *apud* CHRISTOFI e IVSHINA, 2002), em função da sua elevada biodegradabilidade e baixa toxicidade (KOSARIC, 1996), em detrimento do óleo diesel presente no solo, reduzindo assim os percentuais de remoção.

Na Figura 46 é apresentado um gráfico de superfície de resposta do planejamento experimental para o solo arenoso, sob condição anaeróbia, que relaciona as principais variáveis de interesse: biossurfactante, fertilizante e eficiência de remoção de TPH. A partir da Figura 46 é possível observar a tendência no aumento da eficiência de remoção de TPH quando as concentrações do biossurfactante e do fertilizante empregadas no solo forem maiores que aquelas avaliadas nos experimentos.

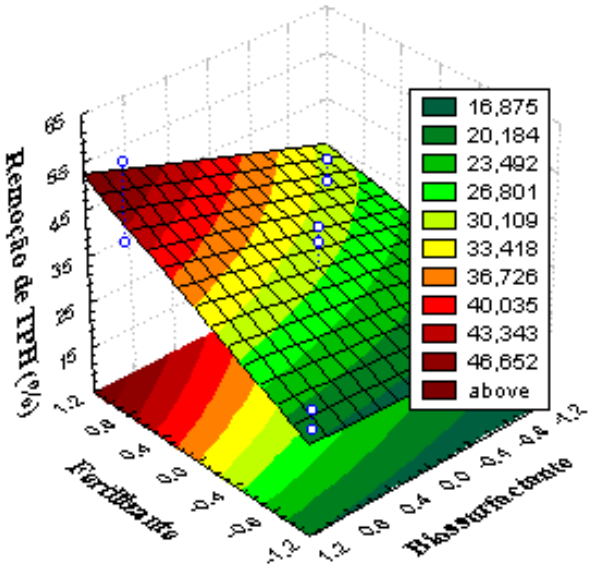


Figura 46: Gráfico de Superfície de Resposta do Planejamento Experimental para o Solo Arenoso sob Condição Anaeróbia cuja Variável de Resposta foi a Remoção de TPH.

A Figura 47 apresenta a quantificação da população de bactérias heterotróficas totais anaeróbias (BAN) no início e no final dos ensaios nas diferentes condições experimentais avaliadas no solo arenoso. Observa-se que pela adição de inóculo, a população de bactérias anaeróbias nos biorreatores, onde foi realizado o bioaumento (condições 1 a 10), aumentou de três ordens de grandeza, atingindo o valor 10^6 NMP/g solo, em média. Durante os experimentos, nos biorreatores de controle biótico (BIO30, BIO45 e BIO60), a população de BAN teve um aumento de quase duas ordens de grandeza. Talvez, tais resultados tenham sido favorecidos em função da facilidade da extração de microrganismos do solo, visto que nos solos arenosos não há formação de grumos durante a extração como ocorre nos solos argilosos.

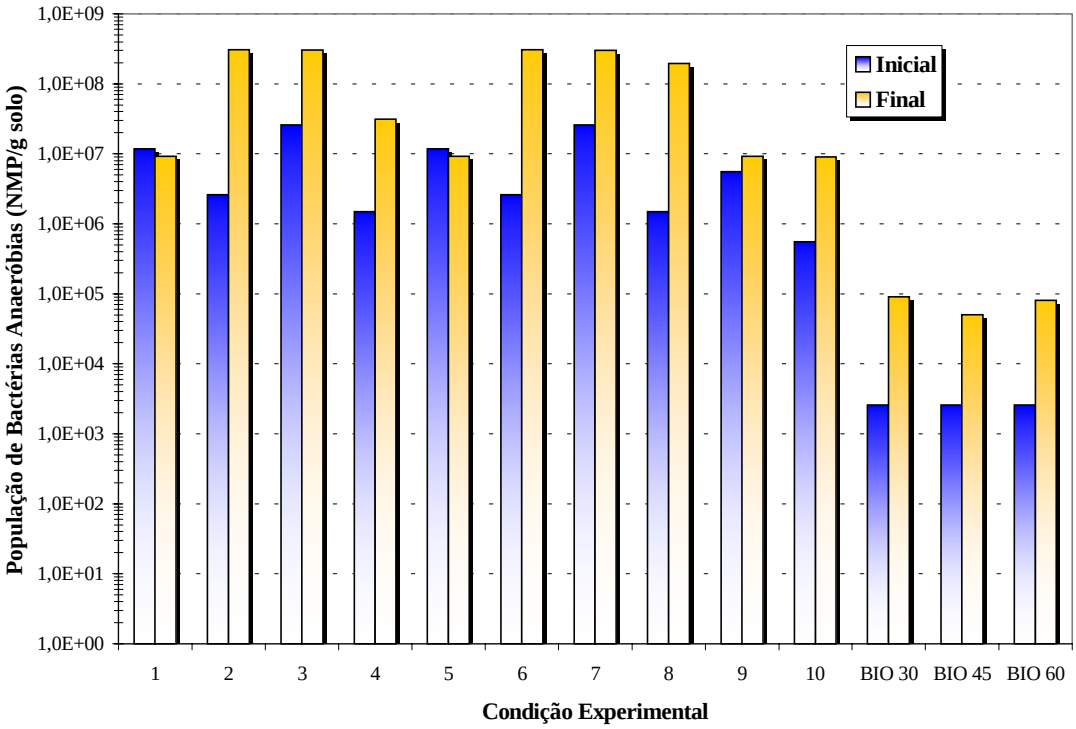


Figura 47: População de Bactérias Heterotróficas Totais Anaeróbias (BAN) Quantificada no Início e no Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Arenoso.

Na Figura 48 é apresentado o monitoramento do pH inicial e pH final nas diferentes condições experimentais avaliadas no solo argiloso. Observa-se que não houve uma queda do pH nesses biorreatores tão destacada como nos experimentos em solo argiloso. É importante ressaltar que nesses experimentos, diferentemente do que ocorreu com os demais sob condição aeróbia, o pH inicial estava um pouco acima da faixa considerada ideal para os microrganismos. Possivelmente, esses valores de pH tenham influenciado na eficiência de remoção de TPH sob condição anaeróbia. Segundo LEAHY e COLWELL (1990), as taxas de biodegradação podem reduzir significativamente quando o valor de pH se encontra acima de 8,5. Contudo, comparando-se esses resultados com aqueles obtidos nos planejamentos experimentais aeróbios apresentados nas Seções 4.4.2.1 e 4.4.2.2, não foram percebidas diferenças nos percentuais de remoção de TPH.

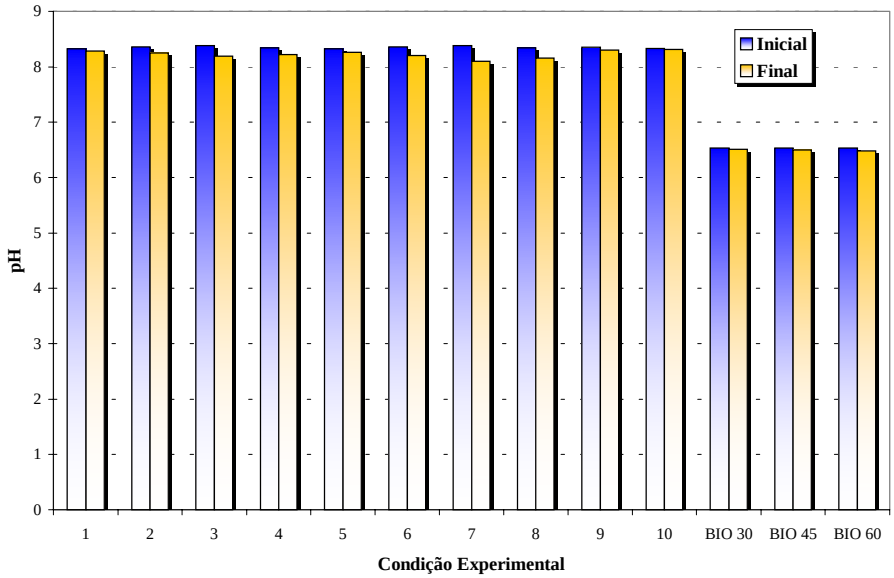


Figura 48: Monitoramento do pH Inicial e pH Final nas Diferentes Condições Experimentais Avaliadas no Solo Arenoso.

4.6 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DO PROCESSO EM CONDIÇÃO AERÓBIA E ANAERÓBIA

Nesta Seção, buscou-se avaliar o desempenho do biossurfactante não se considerando a variável tempo, posto que a partir dos planejamentos experimentais realizados, tanto em condição aeróbia quanto anaeróbia, esta não foi significativa estatisticamente a um nível de confiança de 95%. As comparações foram realizadas entre as diferentes condições experimentais e entre os solos empregados para se avaliar a influência de cada variável (teor de fertilizante e teor de biossurfactante) no percentual de remoção de TPH. As Figuras que serão apresentadas foram construídas a partir das médias das eficiências de remoção de TPH entre 30 e 50 dias, em condição aeróbia, e 30 e 60 dias, em condição anaeróbia.

4.6.1 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DO BIOSSURFACTANTE EM SOLO ARGILOSO

Nesta Seção, avaliou-se o emprego do biossurfactante no tratamento do solo argiloso em condição aeróbia e anaeróbia, a partir dos resultados obtidos. Na Figura 43 é apresentada uma comparação entre os empregos do fertilizante (condição F), do biossurfactante (condição B) e da combinação entre estes (condição F/B), em condição aeróbia e anaeróbia. Além disso, na Figura são apresentados os resultados obtidos nos biorreatores onde somente foi feita a adição de inóculo nos solos (BIO).

Da Figura 49, pode-se observar que nos biorreatores onde somente foi feito o bioaumento (BIO), os maiores percentuais de remoção foram alcançados na condição anaeróbia em torno de 32%, quase o dobro do que foi obtido sob condição aeróbia. No entanto, quando a comparação do desempenho do biossurfactante no tratamento do solo argiloso (condição BIO/B) é feita, os valores obtidos oscilaram dentro de uma mesma faixa de variação tanto em condição aeróbia quanto anaeróbia. A princípio, a presença ou a ausência de oxigênio não influenciou significativamente na eficiência de remoção de TPH, mas quando são avaliadas as médias, o emprego de biossurfactante favoreceu uma remoção um pouco maior sob condição aeróbia.

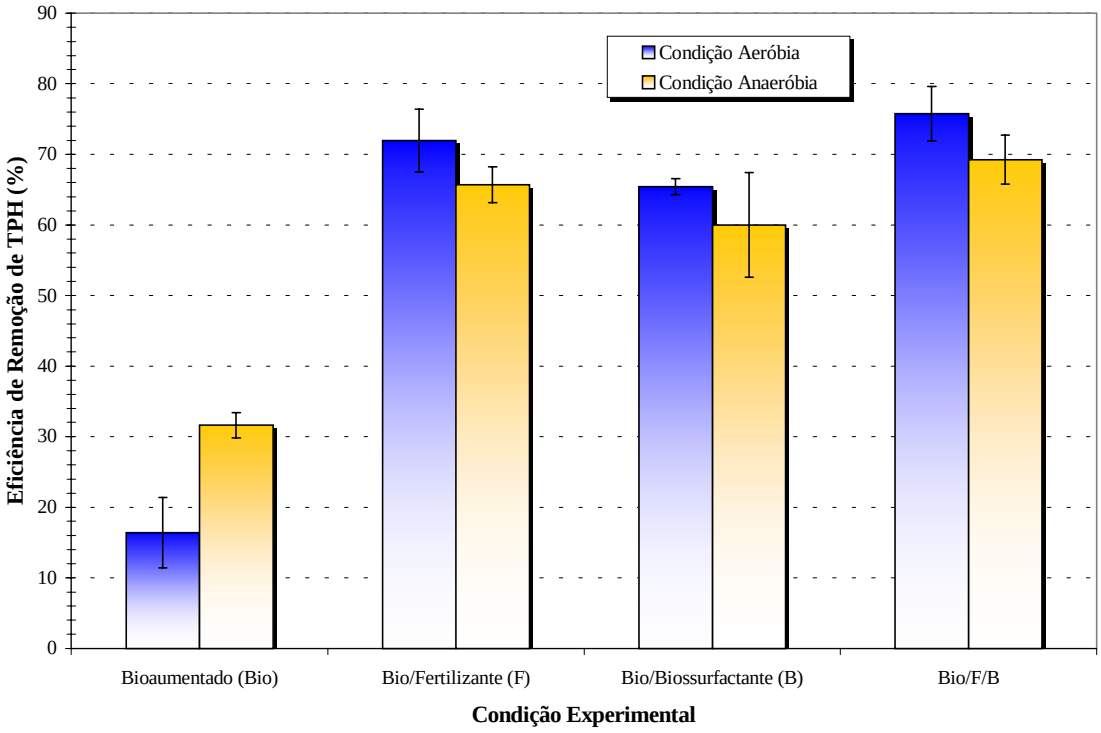


Figura 49: Comparação do Desempenho do Emprego do Fertilizante (BIO/F) e/ou Biossurfactante (BIO/B) no Solo Argiloso sob Condição Aeróbia e Anaeróbia.

Quanto ao emprego do fertilizante no solo (condição BIO/F), observa-se que as melhores eficiências alcançadas foram sob condição aeróbia, em média, 72%. Quanto à combinação dos efeitos promovidos pela adição de fertilizante e biossurfactante (condição BIO/F/B), observa-se que os valores obtidos não foram expressivamente maiores do que aqueles alcançados quando se empregou o fertilizante ou o biossurfactante. Contudo, os melhores resultados foram obtidos sob condição aeróbia nos biorreatores em que se fez a adição de ambos no solo argiloso.

A partir dos resultados, pode-se ainda considerar que em solos contaminados cujo emprego de fertilizante não é necessário, os percentuais de remoção de TPH podem ser aumentados com a adição de biossurfactantes em ambas as condições experimentais.

4.6.2 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DO BIOSSURFACTANTE EM SOLO ARENOSO

Nesta Seção, avalia-se o emprego do biossurfactante no tratamento do solo arenoso em condição aeróbia e anaeróbia, a partir dos resultados obtidos nos planejamentos experimentais. A Figura 50 apresenta uma comparação entre os empregos do fertilizante (condição F), do biossurfactante (condição B) e da combinação entre estes (condição F/B), em condição aeróbia (1 e 2) e anaeróbia. Os resultados da condição aeróbia 1 foram obtidos do planejamento experimental 2^3, apresentados na Seção 4.4.2.1, enquanto os da condição 2, foram provenientes do planejamento experimental 2^2, apresentados na Seção 4.4.2.2. No gráfico de colunas também são apresentados os resultados obtidos nos biorreatores onde somente foi feita a adição de inóculo anaeróbio nos solos (BIO).

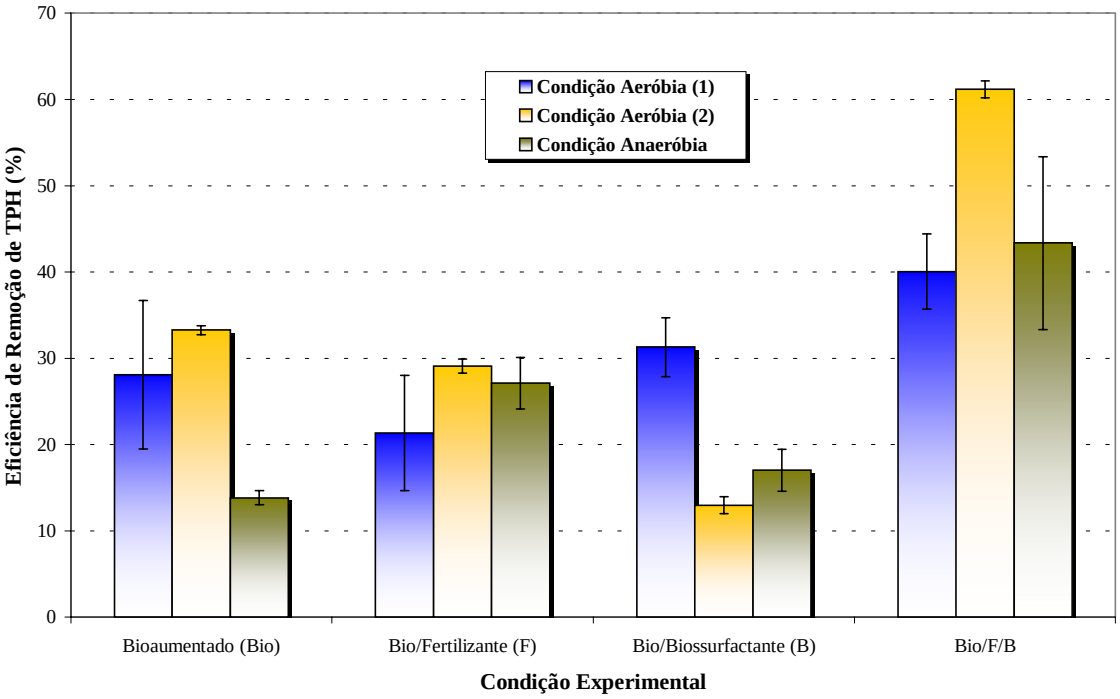


Figura 50: Comparação do Desempenho do Emprego do Fertilizante (BIO/F) e/ou Biossurfactante (BIO/B) no Solo Arenoso sob Condição Aeróbia e Anaeróbia.

Pode-se observar da Figura 50 que nos biorreatores onde somente foi feito o aumento da população microbiana, os melhores resultados foram alcançados sob condição aeróbia, cujos percentuais atingiram um valor em torno de 30%; enquanto que em condição anaeróbia esse percentual foi de 14%, em média.

Em relação à adição do biossurfactante no solo arenoso, pode-se observar que a maior eficiência obtida foi sob condição aeróbia 1 cujo percentual foi 31%, enquanto sob condição anaeróbia este foi 17%. Quanto ao emprego do fertilizante no solo (condição BIO/F), os percentuais de remoção de TPH oscilaram dentro de uma mesma faixa de variação em ambas as condições. Por conseguinte, o efeito da adição do fertilizante no solo arenoso teve o mesmo comportamento nas condições aeróbia e anaeróbia. Ademais, observa-se que o emprego do fertilizante foi responsável pelas melhores remoções quando comparado com os biorreatores onde se empregou o biossurfactante (condição BIO/B).

Dentre todos os resultados, os melhores foram aqueles obtidos nos biorreatores onde se adicionou o fertilizante e o biossurfactante no solo (condição BIO/F/B) cujos percentuais foram 43% e 60%, respectivamente, sob condição anaeróbia e condição aeróbia 2. Segundo LEAHY e COLWELL (1990), essas taxas de degradação de hidrocarbonetos sob condição anaeróbia tendem a ser menores que aquelas obtidas em condição aeróbia. Apesar desse resultado observado em condição anaeróbia, a interação entre as variáveis fertilizante e biossurfactante não foi considerada significativa estatisticamente. Contudo, sob condição aeróbia 2, essa interação entre as variáveis foi significativa estatisticamente.

4.6.3 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DO BIOSSURFACTANTE EM SOLOS ARGILOSO E ARENOSO EM CONDIÇÃO AERÓBIA

Nesta Seção, avalia-se o emprego do biossurfactante no tratamento dos solos argiloso e arenoso em condição aeróbia, a partir dos resultados obtidos nos planejamentos experimentais. A Figura 51 apresenta uma comparação do desempenho do emprego do fertilizante (condição BIO/F) e/ou do biossurfactante (condição BIO/B) entre os solos argiloso e arenoso sob condição aeróbia. Como dito na Seção 4.6.2, em solo arenoso, os resultados da condição aeróbia 1 foram obtidos do planejamento experimental 2^3, apresentados na Seção 4.4.2.1, enquanto os da condição 2, foram provenientes do planejamento experimental 2^2, apresentados na Seção 4.4.2.2. Além disso, na Figura 45 são apresentados também os resultados obtidos nos biorreatores onde somente foi feita a adição de inóculo anaeróbio nos solos (condição BIO).

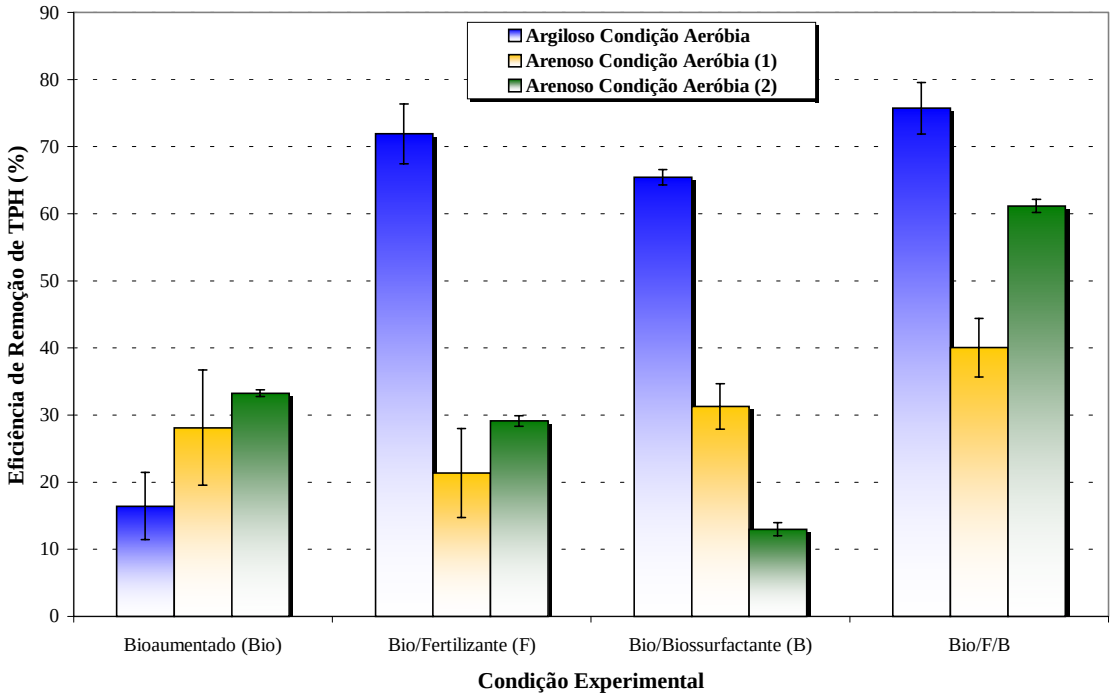


Figura 51: Comparação do Desempenho do Emprego do Fertilizante (BIO/F) e/ou do Biossurfactante (BIO/B) entre os Solos Argiloso e Arenoso sob Condição Aeróbia.

Em condição aeróbia, observa-se que nos solos onde somente foi feito o bioaumento, as melhores remoções de TPH foram obtidas em solo arenoso, com percentuais em torno de 30%. No entanto, quando foi feita a correção de nutrientes no solo (condição BIO/F) e/ou adição de biossurfactante (condição BIO/B), os melhores resultados foram obtidos no solo argiloso.

Em relação ao emprego do biossurfactante, os percentuais de biodegradação do óleo em solo arenoso podem ter sido influenciados pela necessidade do contato entre as bactérias e a superfície hidrofóbica (óleo) (ROSENBERG e ROSENBERG, 1981; NOORDMAN *et al*., 2002). No solo arenoso, o biossurfactante pode ter reduzido esse contato entre a célula microbiana e o óleo (NEU, 1996), visto que este solo apresenta uma maior permeabilidade em relação ao solo argiloso. Contudo, o solo argiloso, devido à sua capacidade de sorção (FINE *et al*., 1997), provavelmente possibilitou uma melhor interação microbiana com o óleo resultando em maiores remoções de TPH.

4.6.4 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DO BIOSSURFACTANTE EM SOLOS ARGILOSO E ARENOSO EM CONDIÇÃO ANAERÓBIA

Nesta Seção, avalia-se o emprego do biossurfactante no tratamento dos solos argiloso e arenoso em condição anaeróbia, a partir dos resultados obtidos nos planejamentos experimentais. A Figura 52 apresenta uma comparação do desempenho do emprego do fertilizante (condição BIO/F) e/ou do biossurfactante (condição BIO/B) entre os solos argiloso e arenoso sob condição anaeróbia. No gráfico de colunas também são apresentados os resultados obtidos nos biorreatores onde somente foi feita a adição de inóculo anaeróbio nos solos (condição BIO).

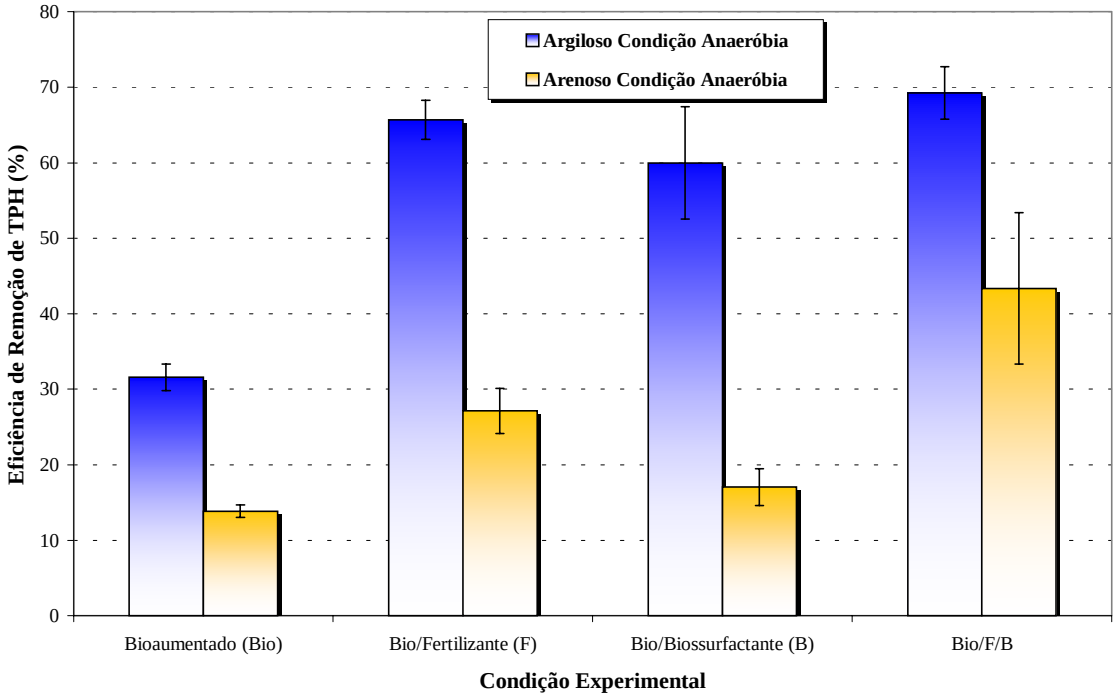


Figura 52: Comparação do Desempenho do Emprego do Fertilizante (BIO/F) e/ou do Biossurfactante (BIO/B) entre os Solos Argiloso e Arenoso sob Condição Anaeróbia.

Em condição anaeróbia, observa-se que as melhores remoções de TPH foram alcançadas em solo argiloso cujo menor percentual obtido foi em torno de 32% na condição BIO. Em relação ao solo argiloso, observa-se ainda que o uso de fertilizante e/ou de biossurfactante, não promoveram variações significativas na remoção de TPH.

Em relação ao solo arenoso, a melhor eficiência de remoção de TPH em condição anaeróbia foi favorecida pela combinação da adição de fertilizante e biossurfactante (condição BIO/F/B), sendo a única condição que justificaria o emprego do biossurfactante combinado com a correção de nutrientes no solo. Mesmo assim, a remoção é bem inferior à determinada sob condição aeróbia.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

- A adição de inóculo preparado em fase sólida, previamente adaptado, favoreceu a remoção de TPH tanto em solo argiloso quanto arenoso, sob condição aeróbia e anaeróbia, quando comparado com os controles bióticos que apresentaram remoções abaixo de 8%.
- As maiores eficiências de remoção de TPH foram obtidas nos experimentos realizados com solo argiloso tanto em condição aeróbia quanto anaeróbia.
- A variável tempo na faixa avaliada não foi significativa estatisticamente em todos os experimentos realizados em ambos os solos.
- Em condição aeróbia, o emprego de fertilizante e/ou biossurfactante em solo argiloso promoveu um aumento na eficiência de remoção de TPH, acima de 50%, enquanto nos reatores onde não se fez adição dos mesmos esta eficiência foi aproximadamente de 21%, em 50 dias.
- Em condição aeróbia, a maior eficiência de remoção de TPH obtida nos experimentos realizados com solo argiloso foi 79,6%, em 30 dias, quando se empregou uma maior concentração de fertilizante e biossurfactante.
- Em condição aeróbia, a adição conjunta de biossurfactante e fertilizante no solo arenoso resultou em uma eficiência de remoção de TPH em torno de 30% e 60%, respectivamente, nos experimentos realizados com os planejamentos fatorial 2^3 e 2^2.
- Em condição anaeróbia, as eficiências de remoção de TPH variaram entre 52,6% e 67,4% quando se empregou somente o biossurfactante em solo argiloso.
- Em condição anaeróbia, o emprego de biossurfactante com a adição de fertilizante no solo argiloso, os percentuais de remoção de TPH foram 65,8% e 72,7%, respectivamente, 30 e 60 dias.
- Em condição anaeróbia, a correção de nutrientes no solo argiloso, o percentual de remoção de TPH foi 63,2%, em 30 dias, e em 60 dias este valor foi 68,3%, valores próximos daqueles obtidos quando se empregou o biossurfactante.
- Em condição anaeróbia, em relação ao emprego do fertilizante no solo arenoso, a remoção de TPH atingiu um percentual de 30% em 60 dias, diferentemente do que foi obtido quando somente se empregou o biossurfactante cujo valor foi 19,7%.

- Em condição anaeróbia, a combinação do emprego de fertilizante e biossurfactante no solo arenoso, a remoção somente atingiu um valor acima de 50% em 60 dias de experimentos.
- Diante dos resultados, a biorremediação de solos argilosos contaminados com óleo diesel mostrou-se promissor, uma vez que as melhores remoções de TPH foram alcançadas quando feita a correção dos principais fatores que influenciam a biodegradação do contaminante.

CAPÍTULO 6: SUGESTÕES

- Empregar a cromatografia gasosa para melhor monitorar a biodegradação do óleo diesel ao longo do tempo, seja por meio da medição do CO_2 e CH_4 produzido, seja pela quantificação residual dos compostos presentes no contaminante no solo.
- Realizar ensaios de ecotoxicidade dos solos no início e após o tratamento, empregando o teste de atividade desidrogenásica, teste de mortalidade de minhocas e teste de germinação de sementes.
- Avaliar a interação do biossurfactante com as partículas do solo nas eficiências de biodegradação do contaminante.
- Avaliar o efeito do biossurfactante quanto ao aumento da biodisponibilidade do óleo diesel no solo e as suas possíveis conseqüências.
- Avaliar o efeito do biossurfactante quanto ao aumento da biodisponibilidade dos nutrientes no solo e as suas possíveis conseqüências.
- Avaliar o emprego de surfactantes sintéticos na biorremediação do solo contaminado por óleo diesel.
- Monitorar e identificar as espécies microbianas presentes no solo durante os experimentos.
- Quantificar a população de bactérias hidrocarbonoclásticas em condição de anaerobiose.
- Avaliar e estabelecer uma condição abiótica que permita monitorar a perda de hidrocarbonetos de petróleo por volatilização.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABED, R.M.M., KÖSTER, J. The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2005, v. 55, p. 29-37.

ALEF, K., NANNIPIERE, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. 576p.

ALEXANDER, M., 1995. Surfactant enhancement of biodegradation of aromatic hydrocarbons. In: **In Situ Remediation Technology Status Report: Surfactant Enhancements**. Washington D.C. EPA 542-K94-003.

ANDRADE, H. **Solos: origem, componentes e organização**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 134p.

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

BAI, G.Y., BRUSSEAU, M.L., MILLER, R.M. Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. **Journal of Contam. Hydrol**., 1997, v. 25, p. 157-170.

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

BARATHI, S., VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hidrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environment International**, 2001, v.26, p.413-416.

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

BERTRAND, J.C., BONIN, P., GOUTX, M., GAUTHIER, M., MILLE, G. The potencial application of biosurfactants in combating hydrocarbon pollution in marine environments. **Res. Microbiol**., 1994, v. 145, p. 53-56.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 1999, v. 152, p. 41-52.

BREDHOLT, H., JOSEFSEN, K., VATLAND, A., BRUHELM, P. AND EIMHJELLEN, K. Emulsification of crude oil by an alkane-oxidizing *Rhodococcus* species isolated from seawater. **Canadian Journal of Microbiology**, 1998, v.44, p.330–340.

CAMPOS, A.C., LEONTSINIS, E. **Petróleo e derivados**. Rio de Janeiro: JR Ed. Técnica Ltda, 1989. 258p.

CARDOSO, L.C.S. **Logística do petróleo: transporte e armazenamento**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. 192p.

CETESB. Projeto CETESB – GTZ. **Lista Holandesa de valores de qualidade do solo e da água subterrânea – valores STI** (6530), 1999, p.1-16.

CHURCHILL, P.F., CHURCHILL, S.A. Surfactant-enhanced biodegradation of solid alkanes. **J. Environ. Sci. Health A**, 1997, v. 32, p. 293-306.

CLARK, J.B., MUNNECKE, D.M., JENNEMAN, J.I. In situ microbial enhancement of oil production. **Dev. Ind. Microbiol**., 1981, v. 22, p. 695-701.

COLORES, G.M., MACUR, R.E., WARD, D.M., INSKEEP, W.P. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, 2000, v. 66 (7), p. 2959-2964.

COUTINHO, H.L.C., 1999. **Avaliação da biodiversidade do solo através de exame de DNA**. Disponível em www.cnps.embrapa.br. Acesso em 08/06/2005.

CHRISTOFI, N., IVSHINA, I.B. A review - Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915–929, 2002.

CSERHATI, T., ILLES, M., NEMES, I. Effects of non-inonic tensides on the growth of some soil bacteria. **Applied Environ. Microbial**, 1991, v. 35, p. 115-118.

DAVIS, J.W., MADSEN, S. Factors affecting the biodegradation of toluene in soil. **Chemosphere**, 1996, v. 33 (1), p. 107-130.

DRAGUN, J. **The soil chemistry of hazardous materials**. Massachusetts: Amherst Scientific Publishers Ed., 1998. 830 p.

DESAI, A.J., BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 1997, v. 61 (1), p. 47-64.

EPA. **Texas Research Institute, Underground movement of gasoline on groundwater and enhanced recovery by surfactantes**. USEPA, Office of Research and Development, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1990. EPA/600/6-90/004,

EPA. **How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: - A guide for connective action plan reviewers**. Washington D.C., 1995a. EPA 510/B-95/007.

EPA. **In Situ Remediation Technology Status Report: Surfactant Enhancements.** Washington., 1995b. EPA 542-K94-003.

EPA. **A citizen's guide to bioremediation**. United States Environmental Protection Agency. April 1996. EPA 542-F-96-007.

EPA. **Innovative technology verification report**. Field measurement technologies for TPH in soil. Horiba instruments incorporated – OCMA-350 oil content analyzer. Washington D.C., 2001. EPA/600/R-01/089.

FERGUSON, S.H., FRANZMANN, P.D., REVILL, A.T., SNAPE, I., RAYNER, J.L. The effects of nitrogen and water on mineralisation of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils. **Cold Regions Science and Technology**, 2003, v. 37, p.197-212.

FERREIRA, M.M., DIAS JR., M.S. **Física do solo**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 117p.

FIECHTER, D. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, 1992, v. 10, p. 208-216.

FINE, P., GRABER, E.R., YARON, B. Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. **Soil Technology**, 1997, v.10, p.133-153.

FURTINI NETO, A.E, VALE, F.R., RESENDE, A.V., GUILHERME, L.R.G., GUEDES, G.A.A. Fertilidade do solo. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 252p.

GEORGIOU, G., LIN, S.C., SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. **Biotechnology Letters**, 1992, v. 6, p. 225-230.

GODSY, E.M. Microbiological and geochemical degradation processes. In: Symposium on natural attenuation of ground water. EPA/600/R-94/162. September, 1994.

GOGOI, B.K., DUTTA, N.N., GOSWAMI, P., MOHAN, T.R.K. A case study of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. **Advances in Environmental Research**, 2003, v. 7, p. 767-782.

GUERRA-SANTOS, L.H., KAPPELI, O., FLECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., 1984, v. 48, p. 301-305.

GUHA, S., JAFFE, P. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the mecellar phase of nonionic surfactants. **Environ. Sci. Technol**., 1996, v. 30, p. 605-611.

HARMS, H., BOSMA, T.N.P. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 1997, v.18, p.97-105.

HARRISON JR., A.P. Microbial sucession and mineral leaching in an artificial coal spoil. **Applied and Environmental Microbiology**, 1992, v.131, p. 68-76.

HILL, H. J., REISBERG, J., STEGEMEIER. Aqueous surfactants systems for oil recory. **J. Pet. Technol**., 1973, v. 25, 186p.

HORIBA, 1995. Instruction manual. Copyright Horiba, Ltd. Japão.

HUA, Z., CHEN, J., LUN, S., WANG, X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, 2003, v. 37, p. 4143-4150.

HUPE, K., KONING, M., LÜTH, J.C., HEERENKLAGE, J., STEGMANN, R. Optimization of microbial soil treatment. In: **Treatment of contaminated soil: fundamentals, analysis, applications**. Stegmann, R., Brunner, G., Calmano, W., Matz, G. (Eds). Berlin: Springer, 2001. 658p.

IBAMA. Apostila IBAMA – Teste de Biodegradabilidade Imediata, 1988.

JARAMILLO, I. R. **Fundamentos teóricos-practicos de temas selectos de la ciencia del suelo**. Universidade Autónoma Metropolitana, México, 1996.

KANTIN, R. **Poluição aquática por detergentes: aspectos gerais**. Rio de Janeiro: Engenharia Sanitária, 1980, v. 19 (1), p. 82-85.

KAPPLAN, N., ROSENBERG, E. Exopolysaccharide distribution of and bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. **Applied and Environmental**, 1982, v. 44 (6), p. 1335-1341.

KIM, H., LIM, K. A model on the temperature dependence of critical micelle concentration. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, 2004, v. 235, p. 121-128.

KIMBALL, S.L. Surfactant-enhanced soil flushing: an overview of an in situ remedial technology for soils contaminated with hydrophobic hydrocarbons. In: **Hydrocarbon Contaminated Soils**. Kostecki, P.T., Calabrese, E.J., Bonazountas, M. (Eds). Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. vol. II.

KIRSHNER, Z. I.; ROSENBERG, E.; GUTNICK, D. Incorporation of ^{32}P and growth of pseudomonad UP-2 on *n*-tetracosane. **Applied and Environmental Microbiology**, v.40, p. 1086-1093, 1980.

KITAMOTO, D., ISODA, H., NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants – from energy-saving materials to gene delivery carriers – review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2002, v. 94 (3), p. 187-201.

KITAMOTO, D., YANAGISHITA, H., SHINBO, T., NAKANE, T., KAMISAVA, C. , NAKAHARA, T. Surface-active properties and antimicrobial of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida Antarctica*. **J. Biotech**., 1993, v. 29, p. 91-96.

KOSARIC, N. Biosurfactants. In: **Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise**. REHMAND, H.-J., REED, G. (Eds.). 1996, v. 6, cap. 17, p.659-713.

KRETSCHMER, A., BOCK, H., WAGNER, F. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkane. **Appl. Environ. Microbiol.**, 1982, v. 44, p. 864-870.

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

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 2002, v. 7, p. 12-20.

LANG, S., WAGNER, F. In: **Biosurfactants**. N. Kosaric (Ed.), New York: Marcel Dekker, 1993. p. 251-286.

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

LI, G.; HUANG, W.; LERNER, D. N.; ZHANG, X.. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. **Water Research**, 2000, v.15, p.3845-3853.

LIEBEG, E. W.; CUTRIGHT, T. J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. **Internacional Biodeterioration & Biodegradation**, 1999, v.44, p.55-64.

LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. **J. Chem. Technol. Biotechnology**, 1996, v. 66, p. 109-120.

MACHADO, P.L.O.A. **“Húmus da terra?” Afinal, o que é e para que serve?**, 1999. Disponível em:<http://www.cnps.embrapa.br>. Acesso em: 24 out. 2001.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, 2000. 991p.

MAHRO, B., MÜLLER, R., KASCHE, V. Bioavailability – the key factor of soil bioremediation. In: **Treatment of contaminated soil: fundamentals, analysis, applications**. Stegmann, R., Brunner, G., Calmano, W., Matz, G. (Eds). Berlin: Springer, 2001. 658p.

MANAHAN, S.E. **Environmental chemistry**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. 811p.

MCGILL, W.B., ROWELL, M.J., WESTLAKE, D.W.S. Biochemistry, ecology and microbiology of petroleum components in soil. In: **Soil Biochemistry**. Ed.: Paul, E.A., Ladd, J.N.. New York: Marcel Dekker, 1981.

MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 626p.

MULLIGAN, C.N., YONG, R.N., GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, 2001, v. 60, p. 371-380.

NEU, T.R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. **Microbiological Reviews**, 1996, v.60, p.151–166.

NFESC – Naval Facilities Engineering Command, 2002. Surfactant-enhanced aquifer remediation (SEAR) - Design Manual. NFESC – Technical Report TR-2206-ENV. Produced by Battelle & Duke Engineering and Services. Washington, D.C.

NOORDMAN, W.H, WACHTER, J.H.J., BOER, G.J., JANSSEN, D.B. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. **Journal of Biotechnology**, 2002, v. 94, p. 195-212.

OECD – Organization for Economic Coorperation and Development. Guideline for testing of chemicals nº207, 1984.

OHONO, A., ANO, T., SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation**. Biotechnology and Bioengineering**, 1995, v. 47, p. 209-214.

ORTEGA-CALVO, J.J., LAHLOU, M., SAIZ-JIMENEZ, C. Effect of organic matter and clays on the biodegradation of phenanthrene in soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 1997, v.40, p.101-106.

PALA, D.M. **Avaliação de aspectos relevantes para a biorremediação de solos impactados por petróleo**. 2003. Exame de Qualificação ao Doutorado. Programa de Engenharia Química/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro. 84p.

PALA, D.M., CARVALHO, D.D., SANT'ANNA JR., G.L. **Efeito do tipo e do teor de aditivos estruturantes na biodegradação de óleo diesel em diferentes solos**. Colóquio Anual de Engenharia Química/PEQ/COPPE/UFRJ. Artigo completo, em meio magnético. 2004.

POPE, G.A., BAVIERE, M. **Reduction of capillary forces by surfactants**. In: Basic Concepts in Enhanced Oil Recovery Processes. Critical Reports on Applied Chemistry. London: Elsevier, 1991, p. 89-122.

POREMBA, K. Influence of synthetic and biogenic surfactants on the toxicity of water-soluble fractions of hydrocarbons in sea water determined with the bioluminescence inhibition test. **Environmental Pollution**, 1993, v. 80, p. 25-29.

PORTER, M.R. **Handbook of surfactantes**. 2ª ed., New York. Chapman & Hall, 1994.

POSTGATE, J.R. **The sulphate reducing bacteria**. Cambrigde: Cambridge University, 1984.

POWALLA, M., LANG, S., WRAY, V. Penta- and disaccharide lipid formation by *Nocardia corynebacteroides* grown on n-alkanes. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., 1989, v. 31, p. 473-479.

PREVEDELLO, C. L. **Física do solo com problemas resolvidos**. Curitiba: Saeafs, 1996. 446 p.

REIS, F.A.S.L. **Estudo da síntese de biosurfactantes por Bacillus subtilis ATCC6633**. 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro.

RESENDE, M., CURI, N., REZENDE, S.B., CORRÊA, G.F. **Pedologia – base para distinção de ambientes**. Viçosa: NEPUT, 2002. 338p.

REVISTA PETROBRAS. **Diesel S500 – o ar está mais leve**. Nº 105, ano 11, maio/junho de 2005.

RISER-ROBERTS, E. **Remediation of Petroleum Contaminated Soils**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1998. 542p.

RIVIERA-ESPINOZA, Y., DENDOOVEN, L. Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize. **Chemosphere**, 2004, v. 54, p. 379-386.

ROCHA, C., SAN-BLAS, F., SAN-BLAS, G., VIERMA, L. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **World J. Microbiol. Biotech**., 1992, v. 8, p. 125-128.

RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.

RON, E.Z., ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, 2001, v. 3 (4), p. 229-236.

ROSEN, M.J. **Surfactants and interfacial phenomena**. 2ª ed., John Wiley & Sons, New York, 1988. 431p.

ROSENBERG, E. Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new markets. **Trends Biotechnol.**, 1993, v. 11, p. 419-424.

ROSENBERG, E., PERRY, A., GIBSON, D.T., GUTNICK, D.L. ( ). Appl. **Environ. Microbiol**., 1979, v. 37, p. 409-413.

ROSENBERG, M., ROSENBERG, E. Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. **J. Bacteriol.**, 1981, v.148, p.51-57.

SANTA ANNA, L.M.M. **Utilização de biosurfactantes na indústria do petróleo**. 2002. Monografia. Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro.

SARKER, A.K., GOURSAUD, J.C., SHARMA, M.M., GEORGIOU, G. A critical evaluation of MEOR processes. **In Situ**, 1989, v. 13, p. 207-238.

SCHIPPERS, C., GEβNER, K., MÜLLER, T., SCHEPER, T., 2000. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. **Journal of Biotechnology**, 2000, v. 83, p. 189-198.

SCHRAMM, L.L. **Surfactants: fundamentals and applications in the petroleum industry**. Cambridge University Press. United Kingdom, 2000.

SCOW, K.M., HICKS, K.A. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. **Current Opinion in Biotechnology**, 2005, v. 16, p.1-8.

SEABRA, P.N.C. **Uso de tensoativos na mobilização e biodegradação de óleo diesel em solos impactados**.1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.

SIGMA. Catálogo – Bioquímicos e reagentes para pesquisa nas ciências da vida. RJ. Brasil, 1997.

SIKKEMA, J., BONT, J.A.M., POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, 1995, v. 59, p. 201-222.

SINGH, A., HAMME, J.D.V., WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, 2007, v. 25, p.99-121.

STELMACK, P.L., GRAY, M.R., PICKARD, M.A. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999, v. 65, p. 163-168.

STREVETT, K., DAVIDOVA, I., SUFLITA, J.M. A comprehensive review of the screening methodology for anaerobic biodegradability of surfactants. **Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology**, 2002, v. 1, p. 143-162.

SUZUKI, T., TANAKA, H., ITOH, S. **Agric. Biol. Chem**., 1974, v. 38, p. 557-563.

TIEHM, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. **Applied and Environmental Microbiology**, 1994, v. 60, p.58–263.

TIEHM, A., STIEBER, M. Strategies to improve PAH bioavailability: addition of surfactants, ozonation and application of ultrasound. In: **Treatment of contaminated soil – Fundamentals, Analysis, Applications**. Stegmann, R., Brunner, G., Calmano, W., Matz, G. (Eds.). Berlin: Springer, 2001. 658p.

THOMAS, J.E., TRIGGIA, A.A., CORREIA, C.A., VEROTTI FILHO, C., XAVIER, J.A.D., MACHADO, J.C.V., SOUZA FILHO, J.E., PAULA, J.L., DE ROSSI, N.C.M., PITOMBO, N.E.S., GOUVEIA, P.C.V.M., CARVALHO, R.S., BARRAGAN, R.V. **Fundamentos de engenharia de petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência/PETROBRAS, 2001. 271p.

VOLKERING, F., BREURE, A.M., VAN ANDEL, J.G., RULKENS, W.H. Influence of nonionic surfactant on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, 1995, v. 61, p. 1699-1705.

VOLPON, A. G. T., VITAL, R. L., CASELLA, R. C., 1998. Método NMP em microescala para contagem de microrganismos consumidores de hidrocarbonetos. Comunicação Técnica SEBIO N.06/98.

WALKLEY, A., BLACK, A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and propose modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, 1934, v. 37, 29-38.

WATWOOD, M. E.; WHITE, C. S.; DAHN, C. N. Methodological modifications for accurate and efficient determination of contaminant biodegradation in insaturated calcareous soils. **Applied and Environmental Microbiology**, 1991, v. 57, p. 717-720.

WDNRBRR – Wisconsin Department of Natural Resources Bureau for Remediation and Redevelopment. Naturally Occurring Biodegradation as a Remedial Action Option for Soil Contamination – Interim Guidance (Revised). PUBL-SW-515-95. Madison: WI53707, 1994. Updated Disclaimers September, 2004.

WELP, G., BRÜMMER, G.W. Effects of organic pollutants on soil microbial activity: The influence of sorption, solubility and speciation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 1998, v.43, p.83–90.

WEISMAN, W.H. **Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media - Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series**. Massachusetts: Amherst Scientific Publishers, v. 1, 1998. Disponível em: www.aehs.com/publications/catalog/contents/volume1.pdf. Acessado em: 20/04/2007.

WESTALL, J., HATFIELD, J., CHEN, H. **The use of cationic surfactants to modify aquifer materials to reduce the mobility of hydrophobic organic compounds.** A study of equilibrium and kinetics. Subsurface Restoration Conference, Dallas, TX, June 21-24, 1992.

WEST, C.C., HARWELL, J.H. Surfactant and subsurface remediation. **Environ, Sci. Technol.**, 1992, v. 26, p. 2324-2330.

YERUSHALMI, L., ROCHELEAU, S., CIMPOIA, R., SARRAZIN, M., SUNAHARA, G., PEISAJOVICH, A., LECLAIR, G., GUIOT, S.R. Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. **Bioremediation Journal**, 2003, v. 7, p. 37-51.

YOUNG, L.Y., PHELPS, C.D. Metabolic biomarkers for monitoring in situ anaerobic hydrocarbon degradation. **Environmental Health Perspectives**, 2005, v. 113, p. 62-67.

ZAJIC, J.E., SEFFENS, W. Biosurfactants. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, 1984, v. 1, p. 87-107.

ZHOU, E.; CRAWFORD, R.L. Effects of oxygen, nitrogen and temperature on gasoline biodegradation in soil. **Biodegradation**, 1995, v.6, p.127-140.

ZUCKERBERG, A., DIVER, A., PEERI, Z., GUTNICK, D.L., ROSENBERG, E. Emulsifier of *arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. **Applied and Environmental Microbiology**, 1979, v. 37, p. 414-420.

SITE 1: Disponível em: http://www.ambientebrasil.com.br. Acessado em 04/04/2005.

SITE 2: Disponível em: http://qmc.ufsc.br/qmcweb/micela/. Acessado em: 16/04/2004.