



Fundação Universidade Federal do Rio Grande  
Departamento de Geociências  
Laboratório de Oceanografia Geológica – Setor de Geoquímica  
Curso de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica



## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

### BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR PETRÓLEO POR DIFERENTES TÉCNICAS DE BIOESTIMULAÇÃO

**MAICON GONÇALVES SILVA**

Dissertação apresentada à Fundação Universidade Federal do Rio Grande, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Martins Baisch e co-orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Machado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Oceanografia Física, Química e Geológica.



Rio Grande, 28 de maio de 2007.

*Dedico este trabalho a minha família, pela compreensão aos momentos em que estive ausente, e também à pessoa mais importante da minha vida, Mariana, por todo amor e apoio nas horas que mais precisei.*

## *Agradecimentos*

*Embora existam muitos agradecimentos a serem feitos, espero contemplar a todos que de alguma forma contribuíram para que eu conseguísse chegar até aqui.*

*Agradeço ao professor Dr. Paulo Roberto Martins Baísch, pela oportunidade a mim oferecida por meio de sua orientação.*

*À professora. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Machado que foi muito mais do que uma co-orientadora, estando sempre presente nas horas difíceis, pelo conhecimento transmitido, paciência e tempo dedicado para a realização deste trabalho.*

*Agradeço ao professor Gilberto Griep pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.*

*A todos os colegas de Laboratório de Oceanografia Geológica (LOG), Daniela (Nela), Francine, Lize, Lutiane, Nadja, Nicolas, Tainá, Vinícius, e todos outros que ajudaram a realizar este sonho. E também um agradecimento especial ao amigo Everton por toda ajuda durante todas as etapas de realização deste trabalho.*

*As meninas do CONECO (Bianca e Melissa) pela colaboração no desenvolvimento das análises.*

*Ao Clabísnei e Manoel (mesmo com a falha de não torcer pelo melhor clube do RS - Sport Club Internacional -), me ajudaram nos momentos de descontração.*

*Ao PRH-27/MCT/ANP - FURG pela bolsa de estudos e também pelos cursos oferecidos que auxiliaram muito na minha formação.*

## Resumo

Áreas contaminadas com hidrocarbonetos tem sido um problema cada vez mais constante, uma vez que existe um grande crescimento na produção, distribuição e consumo de petróleo, principalmente nos últimos anos. Desta forma, é cada vez mais importante o conhecimento de técnicas que sejam eficientes na limpeza destas áreas. Com isso, o presente trabalho através da técnica de biorremediação buscou estabelecer qual o melhor tratamento para a remoção de contaminantes de um petróleo leve em solo arenoso. Para tanto, foram realizados dois experimentos (I e II), em que no primeiro se estudou a eficiência de remoção dos contaminantes pela utilização de três tratamentos distintos de bioestimulação (adição de nutrientes (C), adição de biossurfactante (D), adição de nutriente mais biossurfactante (E)), os quais foram comparados a dois controles, um de solo (A) e outro de atenuação natural de petróleo (B). O outro experimento serviu para verificar a eficiência da esterilização no biossurfactante utilizado, sendo utilizados um controle de solo (F), um controle de atenuação natural de petróleo (G), um tratamento com biossurfactante/nutrientes (H) e outro com biossurfactante estéril/nutrientes (I). Ao final de seis meses de estudo verificou-se que os tratamentos C e E apresentaram as melhores taxas de remoção de óleos e graxas (OG), respectivamente, 90,4 e 78%, e os melhores índices de remoção de hidrocarbonetos alifáticos: 96,82 e 98,35% e de HPAs: 83,58 e 72,3% respectivamente. Já em relação ao experimento II, concluiu-se que não houve diferenças quanto ao uso do biossurfactante estéril ou não estéril, recomendando-se no entanto, a utilização do biossurfactante estéril uma vez que desta forma não há a introdução de microorganismos estranhos ao ambiente.

Palavras chave: hidrocarbonetos, biorremediação, nutrientes.

## Abstract

Sites contaminated with hydrocarbons have been a problem more and more constant, a time that exist a great growth in the production, distribution and consumption of oil, mainly in the last years. Of this way the knowledge of techniques efficient in the cleanness of these sites is more and more important. With this, the present work through the bioremediation technique searched to establish which the best treatment for the removal of contaminantes of light oil in sandy ground. For in such a way, two experiments had been carried through (I and II), where in the first one if it studied the efficiency of removal of the contaminantes for the use of three distinct treatments of biostimulation (addition of nutrients (C), biosurfactant addition (D), addition of biosurfactant and nutrient (E)), which the two controls had been compared, one of soil (a) and another one of natural attenuation of oil (B). The other experiment served to verify the efficiency of the used biosurfactant, being used a control of soil (F), a control of natural attenuation of oil (G), a treatment with biosurfactant/nutrients (H) and another with biosurfactant sterile/nutrients (I). To the end of six months of study it can be verified that treatments C and E had presented the best ones resulted for OG, with rates of removal of 90,4 and 78% respectively. How much the Aliphatics and HPAs these had also been the best treatments with rates of removal of 96,82 and 98,35% for aliphatics and 83,58 and 72.3% for HPAs respectively. Already in relation to experiment II, it can be concluded that it doesn't have differences how much to the use of the sterile or not sterile biosurfactant, however sends regards use to it of the biosurfactant sterile a time that of this form doesn't have the introduction of strange microorganisms to the environment.

Key words: hydrocarbons, bioremediation, nutrients.

## LISTA DE ABREVIATURAS

C:N:P – Relação Carbono, Nitrogênio e Fósforo

COT – Carbono Orgânico Total

F1 - Fração da extração dos hidrocarbonetos alifáticos

F2 - Fração da extração dos HPAs

GC-FID Gas Chromatography / Flame Ionization Detector

GC-MS Gas Chromatography / Mass Detector

HPAs – Hidrocarbontes Policíclicos Aromáticos

Koc Coeficiente de partição carbono orgânico-água

Kow Coeficiente de partição octanol água

N – Nitrogênio

OG - Óleos e Graxas

P – Fósforo

pH – Potencial Hidrogeniônico

ppm Partes por milhão

UFC – Unidade Formadora de Colônias

$\Sigma$  - Somatório

## ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS _____	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	11
2.1. Petróleo _____	11
2.1.1. Vazamentos de Petróleo _____	15
2.2. Biodegradação _____	19
2.2.1. Fatores que atuam na biodegradação do óleo _____	22
2.3. Remediação de ambientes impactados _____	23
2.3.1. Biorremediação _____	24
2.3.2. Biorremediação no mundo _____	26
2.3.3. Biorremediação no Brasil _____	27
2.4. Surfactantes _____	28
2.4.1. Biossurfactantes _____	30
2.4.2. Aplicações Industriais _____	33
2.4.3. Aplicações na Biorremediação _____	33
2.5. Características da Área de Estudo e Justificativa _____	34
3. MATERIAL E MÉTODOS _____	36
3.1. Tipo de petróleo usado no experimento _____	38
3.2. Produção do biossurfactante _____	38
3.3. Limpeza do Material _____	39
3.4. Métodos de análise _____	39
3.4.1. Amostragem de solo _____	39
3.4.2. Medição do pH _____	39
3.4.3. Determinação da Umidade _____	39
3.4.4. Contagem de bactérias e fungos _____	40
3.4.5. Análise de Nutrientes _____	40
3.4.5.1. Carbono orgânico total (COT) _____	40
3.4.5.2. Nitrogênio total _____	41
3.4.5.3. Fósforo total _____	41
3.4.6. Análise de Óleos e Graxas. _____	41
3.4.7. Extração e Análise dos Hidrocarbonetos _____	41
3.4.7.1. Extração de hidrocarbonetos nos sedimentos _____	42
3.4.7.2. Cromatografia de adsorção em coluna de vidro (clean up) _____	42
3.4.7.3. Análise dos Hidrocarbonetos _____	43
3.4.8. Tratamento Estatístico _____	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES _____	45
4.1. Caracterização do solo. _____	45
4.2. Caracterização do Biossurfactante _____	46
4.3. EXPERIMENTO I _____	47
4.3.1. Controle de Umidade, Temperatura e Potencial Hidrogeniônico (pH) _____	47
4.3.2. Análise dos Nutrientes - Carbono Orgânico Total, Nitrogênio e Fósforo. _____	50
4.3.3. Óleos e Graxas _____	54
4.3.4. Contagem de Bactérias e fungos _____	55
4.3.5. Hidrocarbonetos Alifáticos e Poliaromáticos _____	57
4.3.6. Caracterização geral do experimento _____	65
4.4. EXPERIMENTO II _____	68
4.4.1. Análise Geral _____	69
5. CONCLUSÃO _____	79

6.	<i>RECOMENDAÇÕES FUTURAS</i>	80
7.	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	81
8.	<i>Anexos</i>	92
8.1.	Certificado de análise do Petróleo.	92
8.2.	Teor de hidrocarbonetos alifáticos nos solos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para as cinco caixas (Experimento I).	93
8.3.	Teor de HPAs nos solos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para as cinco caixas (Experimento I).	94
8.4.	Teor de hidrocarbonetos alifáticos nos solos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para as cinco caixas (Experimento II).	95
8.5.	Teor de HPAs nos solos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para as cinco caixas (Experimento II).	96
8.6.	Cromatogramas Experimento I	97
8.6.1.	Hidrocarbonetos Alifáticos	97
8.6.2.	Hidrocarbonetos Poliaromáticos (HPAs)	102
8.7.	Cromatogramas Experimento II	107
8.7.1.	Hidrocarbonetos Alifáticos	107
8.7.2.	Hidrocarbonetos Poliaromáticos (HPAs)	111

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Estruturas químicas e efeitos tóxicos dos 16 HPAs considerados poluentes prioritários pela USEPA (SIMS et al., 1988).	13
Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos 16 HPAs estudados.	14
Tabela 4. Vazamentos de oleodutos no Brasil.	17
Tabela 5. Diferentes espécies de bactérias hidrocarbonoclasticas.	20
Tabela 5. Continuação	21
Tabela 6. Taxas de biodegradação de algumas espécies de HPAs (USEPA, 2000)	22
Tabela 7. Mercado mundial de biorremediação (1994-2005) em milhões de dólares.	26
Tabela 8. Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.	31
Tabela 9. Diversidade de Biosurfactantes (MULLIGAN et al., 2001)	31
Tabela 10. Caracterização do solo utilizado.	45
Tabela 12. Variação da temperatura ambiente do laboratório ao longo do período de 180 dias do experimento.	48
Tabela 11. Médias dos valores das triplicatas de nitrogênio (N), fósforo (P) e carbono orgânico (COT), ao longo de 180 dias de experimento, com grau de significância de 5%, sendo A (controle de solo), B (controle de petróleo), C (adição de nutrientes), D (adição de biosurfactantes) e E (adição de biosurfactantes + nutrientes).	51
Tabela 13. Remoção de Hidrocarbonetos Alifáticos para as caixas em que houve tratamento de bioestimulação.	64
Tabela 14. Remoção de HPAs para as caixas em que houve tratamento.	65
Tabela 15. Médias dos valores das triplicatas de nitrogênio (N), fósforo (P) e carbono orgânico (COT), ao longo de 180 dias de experimento com grau de significância de 5%, sendo F (controle de solo), G (controle de petróleo), H (adição de biosurfactante/nutrientes) e I (biosurfactante estéril/nutrientes).	69
Tabela 16. Variação da temperatura ambiente do laboratório ao longo do tempo.	70
Tabela 17. Remoção de HPAs para a caixa controle de petróleo (G), caixa biosurfactante/nutrientes (H) e biosurfactante estéril/nutrientes (I).	76



## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Exemplos de compostos orgânicos presentes na composição do petróleo bruto (adaptados de BRITO, 2004). _____	12
Figura 2. Exemplos de HPAs com estrutura linear (a) e angular (b). _____	15
Figura 3. Intemperismo sofrido pelo óleo em um sistema aquático. _____	18
Figura 4. Representação da ação do surfactante sobre uma mancha de óleo (IPIECA, 1993). _____	29
Figura 5. Foto das caixas contendo o solo contaminado com petróleo. _____	36
Figura 6. Esquema de composição das caixas. _____	36
Figura 7. Local da coleta do solo. _____	37
Figura 8. Fluxograma do método de análise de hidrocarbonetos. _____	42
Figura 9. Valores de pH no decorrer do tempo de experimento para as caixas A (controle de solo), B (controle de petróleo), C (adição de nutrientes), D (adição de biossurfactantes) e E (adição de biossurfactantes + nutrientes). _____	49
Figura 10. Teores de nutrientes no período de 6 meses de experimento, onde (a) carbono orgânico total, (b) nitrogênio total e (c) fósforo total para as caixas A (controle de solo), B (controle de petróleo), C (adição de nutrientes), D (adição de biossurfactantes) e E (adição de biossurfactantes + nutrientes). _____	53
Figura 11. Remoção de OG no período de 6 meses de experimento para as caixas A (controle de solo), B (controle de petróleo), C (adição de nutrientes), D (adição de biossurfactantes) e E (adição de biossurfactantes + nutrientes). _____	55
Figura 12. (a) Variação do número de bactérias mesófilas e (b) Variação do número de fungos ao longo de 180 dias de experimento para as caixas A (controle de solo), B (controle de petróleo), C (adição de nutrientes), D (adição de biossurfactantes) e E (adição de biossurfactantes + nutrientes) _____	56
Figura 13. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa controle de solo (A) no período de 180 dias. _____	59
Figura 14. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa controle de petróleo (B) no período de 180 dias. _____	60
Figura 15. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa adição de nutrientes (C) no período de 180 dias. _____	62
Figura 16. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa adição de biossurfactante (D) no período de 180 dias. _____	63
Figura 17. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa adição de nutrientes + biossurfactante (E) no período de 180 dias. _____	64
Figura 18. Diagrama indicando as principais etapas de uma Análise de Componentes Principais (PCA). _____	66
Figura 19. Caracterização geral do experimento por uma Análise de Componentes Principais (PCA). _____	68
Figura 20. Teores de nutrientes no período de 6 meses de experimento, onde (a) carbono orgânico total, (b) nitrogênio total e (c) fósforo total para as caixas F (controle de solo), G (controle de petróleo), H (adição de biossurfactante/nutrientes) e I (biossurfactante estéril/nutrientes). _____	71
Figura 21. Valores de pH no decorrer do tempo de experimento para as caixas F (controle de solo), G (controle de petróleo), H (adição de biossurfactante/nutrientes) e I (biossurfactante estéril/nutrientes). _____	72

- Figura 22. Remoção de OG no período de 6 meses de experimento para as caixas F (controle de solo), G (controle de petróleo), H (adição de biossurfactante/nutrientes) e I (biossurfactante estéril/nutrientes). \_\_\_\_\_ 72
- Figura 23. (a) Variação do número de bactérias mesófilas e (b) Variação do número de fungos ao longo de 180 dias de experimento. para as caixas F (controle de solo), G (controle de petróleo), H (adição de biossurfactante/nutrientes) e I (biossurfactante estéril/nutrientes). \_\_\_\_ 73
- Figura 24. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa controle de solo (F) no período de 180 dias. \_\_\_\_\_ 74
- Figura 25. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa controle petróleo (G), no período de 180 dias. \_\_\_\_\_ 75
- Figura 26. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa biossurfactante/nutrientes (H) no período de 180 dias. \_\_\_\_\_ 76
- Figura 27. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa biossurfactante estéril/nutrientes (I) no período de 180 dias. \_\_\_\_\_ 77

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Acidentes com derrames de petróleo constituem uma grande preocupação em todos os países do mundo, pois quando ocorrem, representam tanto uma grande perda de óleo quanto um grande impacto negativo na flora, na fauna e na saúde humana. (RIBEIRO e RUBIO, 2000).

Após o derrame, o petróleo fica sujeito a alguns processos como espalhamento, evaporação, dissolução, fotodegradação, biodegradação entre outros. Todos estes processos influenciam na escolha da medida defensiva para a recuperação destes ambientes impactados.

A recuperação destes ambientes mostra-se cada vez mais difícil, uma vez que os contaminantes podem persistir por um longo período e experimentos com remediação apontam que a recuperação total destas áreas, muitas vezes sofre limitações técnicas, por demandar muito tempo ou por necessitar de altos recursos financeiros.

Entre as técnicas utilizadas para a recuperação destes ambientes, a biorremediação surge como importante alternativa, uma vez que pode ser aplicada *in situ* e também por demandar baixos recursos financeiros. Esta técnica pode ser usada para tratamento de resíduos sólidos urbanos e remediação de solos contaminados com compostos orgânicos.

Este trabalho tem como finalidade a recuperação de um solo impactado com petróleo, estabelecendo entre três técnicas distintas de biorremediação (adição de nutrientes, adição de biossurfactante, e adição de nutrientes mais biossurfactante) qual a mais eficiente na remoção dos contaminantes de petróleo após um período de 180 dias de tratamento.

Como objetivos específicos o trabalho busca avaliar a eficácia do biossurfactante utilizado; caracterizar a degradação das frações alifática e aromática dos hidrocarbonetos de petróleo no solo nos diferentes tratamentos considerados; acompanhar o consumo de nutrientes pela microbiota local ao longo do experimento; construir a curva de crescimento das bactérias e fungos e avaliar o efeito da esterilização de um biossurfactante na biorremediação de um solo contaminado.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Petróleo

Chamado por muitos de “ouro negro”, o petróleo é consumido em todo o mundo, principalmente pelos países mais desenvolvidos. É a fonte mais barata de energia e por conta de um elevado consumo mundial tem garantido avanços tecnológicos na área de exploração e produção em áreas marinhas cada vez mais profundas. Apesar de suas indiscutíveis qualidades associadas ao desenvolvimento econômico dos países, que remete a qualidade de vida de suas populações, este valioso produto está relacionado a grandes fontes de poluição do meio ambiente (FERRÃO, 2005).

Pesquisas arqueológicas indicam que na Mesopotâmia e Pérsia três mil anos a.C. o betume era usado como material de ligadura em lugar de argamassa. No início do século XX, o petróleo passou a ser utilizado como uma das principais fontes de energia, tornando-se indispensável para a sociedade moderna.

O petróleo é formado a partir da matéria orgânica proveniente de restos de plantas e animais que depois de sedimentarem são submetidas a transformações aeróbias e especialmente anaeróbias realizadas por bactérias. A matéria orgânica sofre a ação da pressão e de temperatura, o que vai determinar a maturação térmica dos compostos e a formação dos hidrocarbonetos.

Por apresentar características físico-químicas diferentes, principalmente relacionadas com as condições de formação, torna-se impossível estabelecer uma definição precisa da composição do petróleo. O petróleo é constituído por uma mistura complexa e ampla de muitos compostos químicos, mas com grande predominância de hidrocarbonetos (85-98%) (CLARK et al., 1977), podendo conter outros elementos em menores quantidades como oxigênio, enxofre, nitrogênio e alguns metais como níquel, cobalto, vanádio, ferro e cobre (NRC, 1985). Alguns exemplos de hidrocarbonetos encontrados no petróleo são mostrados na Figura 1.

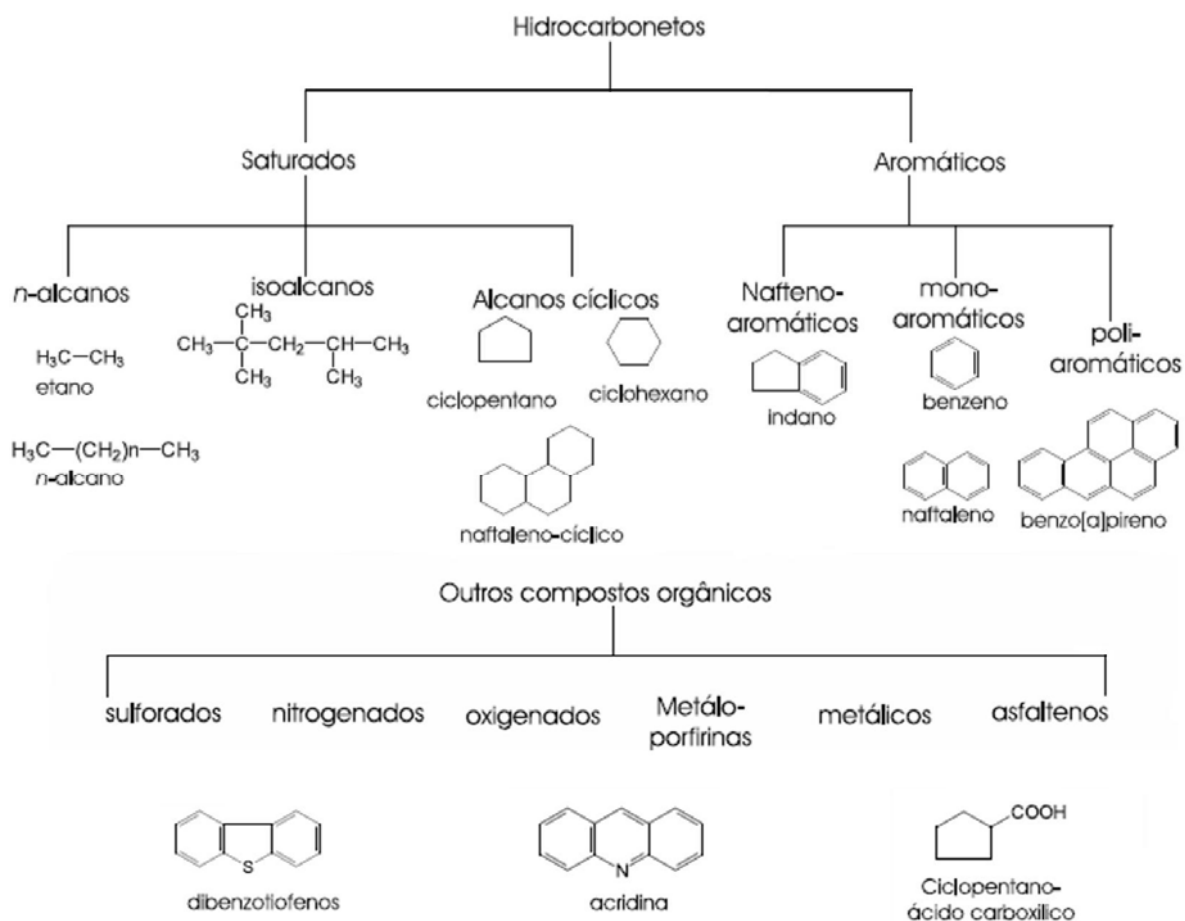





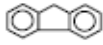





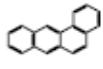

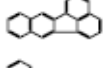

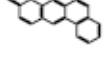

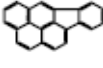
Figura1. Exemplos de compostos orgânicos presentes na composição do petróleo bruto (adaptados de BRITO, 2004).

Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos formados por carbono e hidrogênio, apresentam características apolares (hidrófobos), ou seja, não possuem afinidade pela água apresentando uma maior tendência de associação às fases sólidas, tais como as partículas em suspensão, os tecidos biológicos e os sedimentos (BENTO, 2005).

O petróleo contém hidrocarbonetos que variam de uma simples molécula como o metano ( $\text{CH}_4$ ), a moléculas com alto peso molecular como o benzo(g,h,i)perileno ( $\text{C}_{22}\text{H}_{12}$ ). Os diferentes componentes do petróleo são usualmente agrupados em frações, dependendo de suas propriedades físico-químicas como mostrado na Figura 1. A fração saturada compreende os n-alcanos, os alcanos ramificados e os cicloalcanos, enquanto que a fração aromática é constituída por uma classe de compostos orgânicos contendo um ou mais anéis benzênicos, arranjados de forma linear, angular ou em grupos.

Estes compostos quando apresentam 2 a 6 anéis benzênicos condensados, podem ser classificados como Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). Eles têm ampla distribuição e são encontrados como constituintes de misturas complexas em todos os compartimentos ambientais. Na Tabela 1 são apresentadas as estruturas e efeitos dos 16 HPAs presentes na lista de compostos considerados como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).

Tabela 1. Estruturas químicas e efeitos tóxicos dos 16 HPAs considerados poluentes prioritários pela USEPA (SIMS et al., 1988).

Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Efeito	Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Efeito
Naftaleno		tóxico	Acenaftileno		mutagênico
Acenafteno		mutagênico	Fluoreno		mutagênico
Antraceno		mutagênico	Fenantreno		tóxico e mutagênico
Fluoranteno		carcinogênico e mutagênico	Pireno		carcinogênico e mutagênico
Criseno		carcinogênico e mutagênico	Benzo (a) antraceno		carcinogênico e mutagênico
Benzo (b) fluoranteno		carcinogênico e mutagênico	Benzo (k) fluoranteno		carcinogênico e mutagênico
Benzo (a) pireno		carcinogênico e mutagênico	Dibenzo (a,h) antraceno		carcinogênico e mutagênico
Benzo (g,h,i) perileno		carcinogênico	Indeno (1,2,3-cd) pireno		carcinogênico

Os HPAs são compostos hidrofóbicos que apresentam elevado ponto de fusão nas condições normais de temperatura e pressão. Quanto maior o peso molecular dos HPAs, menor é sua solubilidade (entre  $10^{-7}$  e  $10^{-10}$  mol  $m^{-3}$ ) e pressão de vapor, o que corresponde a um elevado coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), como pode ser observado na Tabela 2.

O coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) é um importante coeficiente para a mobilidade dos compostos orgânicos. Ele é definido como a relação da concentração em equilíbrio de um contaminante orgânico na fase octanol em relação à concentração do contaminante na fase aquosa.

O valor de Kow pode ser usado para estimar o comportamento de compostos orgânicos hidrofóbicos que não interagem eletricamente com a superfície do solo. É uma medida que define a hidrofobicidade de um composto orgânico e é um parâmetro comumente utilizado na área ambiental (D'AGOSTINHO et al., 2006).

Outro parâmetro comumente utilizado é o Koc (coeficiente de partição entre carbono orgânico-água), que corresponde à razão entre as concentrações das substâncias que se encontram solubilizadas na matéria orgânica do solo e na parte aquosa. É utilizado para avaliar a tendência dos compostos orgânicos de serem sorvidos pela matéria orgânica do solo. Quanto maior este parâmetro, maior será a preferência de acumulação dos poluentes nos sedimentos (VEIGA, 2003).

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos 16 HPAs estudados.

Composto	Peso Molecular (g/mol)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Solubilidade (mg/L)	log K <sub>ow</sub>	log K <sub>oc</sub>
Naftaleno	128,17	80	218	30	3,4	3,11
Acenaftileno	152,20	92	265	3,93	4,07	1,4
Acenafteno	154,21	96	279	3,47	3,92	3,66
Fluoreno	166,22	116	293	1,98	4,18	3,86
Antraceno	178,12	216	340	7x10 <sup>-2</sup>	4,6	4,15
Fenantreno	178,23	101	340	1,29	4,5	4,15
Pireno	202,26	149	360	1,4x10 <sup>-1</sup>	5,18	4,58
Fluoranteno	202,26	111	-	2,6x10 <sup>-1</sup>	5,22	4,58
Benzo(a)antraceno	228,29	158	400	1,4x10 <sup>-2</sup>	5,61	5,3
Criseno	228,29	255	-	2x10 <sup>-3</sup>	5,91	5,3
Benzo(a)pireno	252,31	179	496	3,8x10 <sup>-3</sup>	6,5	6,74
Benzo(b)fluoranteno	252,32	167	-	1,2x10 <sup>-3</sup>	6,12	5,74
Benzo(k)fluoranteno	252,32	217	480	5,5x10 <sup>-4</sup>	6,84	5,74
Benzo(ghi)perileno	276,23	222	-	2,6x10 <sup>-4</sup>	7,1	6,2
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276,23	163	-	6,2x10 <sup>-2</sup>	6,58	6,2
Dibenzo(a,h)antraceno	278,35	262	-	5,0x10 <sup>-3</sup>	6,5	6,52

Nota: log Kow = coeficiente de partição octanol-água; log Koc = coeficiente de partição carbono orgânico-água. Fonte: Petrobrás, 2001.

As espécies de HPAs com um arranjo linear dos anéis aromáticos fusionados (Fig. 2a) são normalmente menos solúveis que os compostos que possuem estruturas angulares (Fig. 2b), exemplificado pela baixa solubilidade

do antraceno quando comparada à do fenantreno. As espécies com anéis aromáticos com substituições alquiladas possuem menor solubilidade em água, sendo que a solubilidade é inversamente proporcional ao grau de alquilação (WITT, 1995).

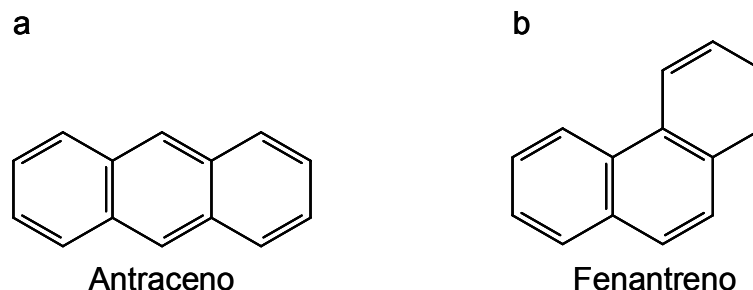


Figura 2. Exemplos de HPAs com estrutura linear (a) e angular (b).

### 2.1.1. Vazamentos de Petróleo

Nas últimas décadas, o petróleo passou a ser a principal fonte de energia do planeta. Entretanto, sua produção não está uniformemente distribuída entre os países consumidores, o que levou à formação de uma complexa rede internacional de distribuição.

O transporte do petróleo é realizado através de oleodutos terrestres, marinhos e navios tanque, podendo resultar em acidentes com vazamentos de óleo, aumentando os níveis de contaminação nos ambientes marinhos costeiros e somando a isto, a poluição crônica junto aos grandes centros urbanos e industriais (SOUZA, 2003).

Atualmente existem mais de 3.500 petroleiros em operação, incluindo os maiores navios do mundo, que podem transportar mais de meio milhão de toneladas de óleo cru. A maioria dos acidentes ocorridos com navios petroleiros (84%), estão na categoria “menor que 7 ton”. Os vazamentos de petróleo são classificados pela quantidade em 3 categorias: < 7 ton, entre 7 e 700 ton e > 700 ton. Na Tabela 3 são apresentados os 20 maiores vazamentos de óleo desde 1967. Uma parte desses acidentes, apesar das grandes proporções, causou pequeno ou nenhum dano ao meio ambiente uma vez que o óleo não atingiu a linha da costa. O derrame do navio Exxon Valdez está incluído na lista por ser bastante conhecido, contudo não está incluído entre os 20 maiores desastres nos últimos anos.



Tabela 3. Vazamentos de navios petroleiros.

Posição	Navio	Ano	Local	Quantidade derramada (ton)
1	Atlantic Empress	1979	Off Tobago, West Indies	287.000
2	ABT Summer	1991	700 Nautical miles off Angola	260.000
3	Castillo de Bellver	1983	Off saldanha Bay, South áfrica	252.000
4	Amoco Cadiz	1978	Off Brittany, France	223.000
5	Haven	1991	Genoa, Italy	144.000
6	Odyssey	1988	700 Nautical miles of Nova Scotia, Canada	132.000
7	Torrey Canyon	1967	Scilly Isles, UK	119.000
8	Sea Star	1972	Gulf of Oman	115.000
9	Irenes Serenade	1980	Navarino Bay, Greece	100.000
10	Urquiola	1976	La Coruna, Espain	100.000
11	Hawaiian Patriot	1977	300 Nautical miles off Honolulu Angola	95.000
12	Independenta	1979	Bosphorus, Turkey	95.000
13	Jacob Maersk	1975	Oporto, Portugal	88.000
14	Braer	1993	Shetland Islands, UK	85.000
15	Khark 5	1989	120 Nautical miles off Atlantic coast of Morocco	80.000
16	Aegean Sea	1992	La Coruna, Spain	74.000
17	Sea Empress	1996	Milford Haven, UK	72.000
18	Katina P.	1992	Off Maputo, Mozambique	72.000
19	Prestige	2002	Off Spanish Coast	63.000
35	Exxon valdez	1989	Prince Willian Sound, Alaska, USA	37.000

Fonte: <http://ww.itopf.com> acessado em 20/11/2006.

Já os dutos, tubulações de aço que interligam píeres, terminais marítimos e fluviais, campos de produção de petróleo e gás e refinarias permitem que grandes quantidades de produtos sejam deslocadas diminuindo o tráfego de cargas perigosas por caminhões, trens ou navios, e consequentemente, minimizam os riscos de acidentes ambientais. Na maioria são subterrâneos, mas há também os aéreos e os submarinos situados nas imediações das plataformas de petróleo e dos terminais. Assim, estes dutos podem ser encontrados em áreas urbanas, rurais, passando sob ruas e rodovias, manguesais, rios, mares, entre outros ambientes.

Entretanto, mesmo construídos e operados dentro dos padrões máximos de segurança os dutos estão sujeitos à erosão, deslizamentos de terra, corrosão, queda de rochas, atos de vandalismo, ação de terceiros, os quais podem ocasionar vazamentos. Em função da alta pressão com que os produtos são bombeados e da periculosidade das substâncias transportadas, os danos ambientais e sócio-econômicos raramente são pequenos.

Os vazamentos em oleodutos são uma das causas comuns dos derrames de petróleo. Por exemplo, em 1997 os derramamentos provenientes de oleodutos foram duas vezes mais comuns do que derramamentos provenientes de petroleiros (ETKIN, 1999).

A grande maioria dos derrames de oleodutos é pequena (Tabela 4) se comparada a desastres ocasionados por navios-tanque, que podem lançar entre 40.000 e 4 milhões de litros de óleo, mas esses “pequenos” derramamentos podem atingir cerca de 60-80 milhões de litros derramados por ano (TSALIK et al., 2005). Como são freqüentes, esses derramamentos podem ser mais prejudiciais do que os acidentes com petroleiros, pois expõem cronicamente plantas e animais à poluição pelo petróleo.

Os impactos negativos ao ambiente causados por estes vazamentos compreendem, de maneira geral, não apenas a contaminação de solos, subsolos, corpos de água e os danos aos vegetais e animais presentes nas proximidades dos dutos, mas também abrangem a movimentação de terra, a supressão vegetal e o impacto a micro e macro fauna associada, durante os trabalhos de reparo na faixa dos dutos.

Tabela 4. Vazamentos de oleodutos no Brasil.

Ano	Ocorrência
Julho de 1992	Vazamento de 10 mil litros de óleo em área de manancial do Rio Cubatão.
Agosto de 1997	Vazamento de 2 mil litros de óleo atinge cinco praias na Ilha do Governador (RJ) - Petrobrás.
Agosto de 1999	Vazamento de óleo na Reman. Pelo menos mil litros de óleo contaminaram o Rio Negro (AM) - Petrobrás.
Janeiro de 2000	Rompe-se o duto que liga a refinaria Duque de Caxias ao posto de Ilha d' Ajuda espalhando 4000 toneladas de óleo na baía de Guanabara.
Julho de 2000	Rompe-se o duto da Refinaria Getúlio Vargas, em Araucária, PR, espalhando mais de 4 milhões de litros de óleo no rio Iguaçu. O acidente levou duas horas para ser detectado, tornando-se o maior desastre ambiental provocado pela Petrobras em 25 anos.
Mai de 2001	O rompimento de um duto da Petrobrás em Barueri em São Paulo, ocasionou o vazamento de 200 mil litros de óleo que se espalharam por três residências de luxo do Condomínio Tamboré 1 e atingiram as águas do Rio Tietê e do Córrego Cachoeirinha.
Fevereiro de 2004	Vazamento de óleo poluiu o rio Guaecá e a praia de mesmo nome em São Sebastião, litoral norte de São Paulo. O acidente aconteceu no oleoduto que liga o Tebar (Terminal Almirante Barroso), em São Sebastião, à refinaria Presidente Bernardes, em Cubatão. As causas do rompimento do oleoduto são desconhecidas. Ainda não se sabe a quantidade de óleo que vazou.

Fonte: <http://www.ambientebrasil.com.br/> acessado em fevereiro de 2007.

No ambiente urbano destaca-se ainda como impacto negativo de vazamentos, o incômodo à população em função dos fortes odores das substâncias liberadas, causando desconforto respiratório e dores de cabeça,

bem como pela presença de máquinas, geração de ruídos entre outros efeitos indesejados.

Após um vazamento em um sistema aquático, o óleo sofre vários processos mecânicos, químicos e biológicos chamados conjuntamente de intemperismo (Fig. 3), que ocasionam o seu desaparecimento. A taxa destes processos é influenciada pelas condições ambientais, sendo que é mais efetiva nos primeiros períodos do derrame.

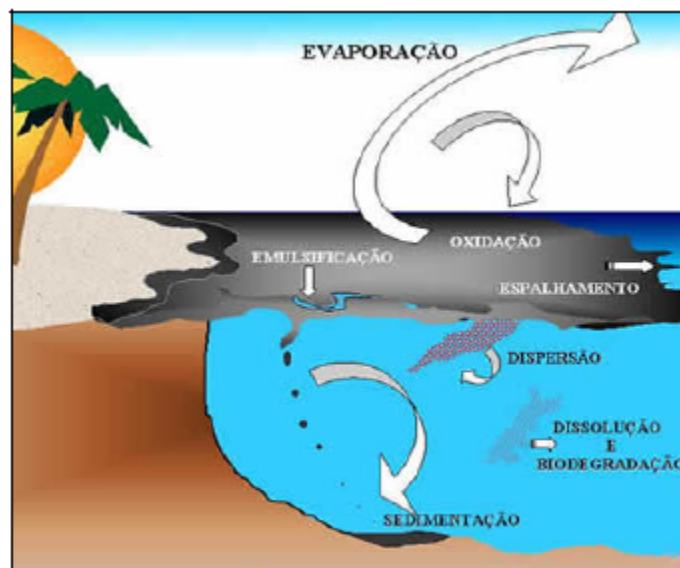


Figura 3. Intemperismo sofrido pelo óleo em um sistema aquático.

Quando os acidentes ocorrem no solo, os processos observados na figura 3 sofrem algumas alterações, havendo principalmente evaporação, oxidação e biodegradação. Entre estes, a evaporação é mais efetiva nas primeiras horas, a oxidação ocorre apenas onde há a presença de oxigênio enquanto a biodegradação, que é a ação dos microorganismos na degradação dos poluentes, pode ocorrer por um longo período e também em locais sem presença de oxigênio, pela ação de bactérias anaeróbicas.

A recuperação dessas áreas degradadas vem se configurando como um desafio, uma vez que experimentos com remediação têm mostrado que a recuperação total destas áreas, na maioria dos casos, não é possível de ser alcançada por limitações técnicas, por demandar muito tempo e por necessitar muitas vezes de recursos financeiros não disponíveis.

## 2.2. Biodegradação

A capacidade de certos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono foi apresentada pela primeira vez por Zobell em 1946. Ele também verificou que esses microrganismos eram amplamente distribuídos na natureza, e a utilização de hidrocarbonetos era altamente dependente da natureza química dos compostos existentes na mistura do petróleo e das condições ambientais.

Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos que ocorrem naturalmente no meio ambiente, possibilitando os microrganismos desenvolverem mecanismos para utilização desses compostos como fonte de carbono e energia. Quando ecossistemas naturais são contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, as comunidades microbiológicas presentes podem desenvolver estratégias que as possibilitem sobreviver e até mesmo utilizar tais contaminantes como fonte de carbono, inclusive a partir da colaboração entre espécies diferentes e consórcios de microrganismos.

A habilidade de microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como fonte de energia é amplamente disseminada entre diferentes populações microbiológicas. Na Tabela 5 são listados diversos gêneros e espécies de bactérias hidrocarbonoclásticas isoladas (bactérias que possuem a capacidade de quebrar cadeias de hidrocarbonetos), a maioria de ambientes aquáticos (BRITO, 2004).

Além das bactérias, a habilidade em degradar hidrocarbonetos também é observada em fungos, leveduras e algas. Entre os fungos hidrocarbonoclásticos mais citados estão: *Penicillium sp.*, *Verticillium spp.*, *Mortieriella spp.*, *Phoma spp.*, entre outros. Entre as algas e cianobactérias, por sua vez, são citadas: *Oscillatoria spp.*, *Microcoleus sp.*, *Anabaena spp.*, *Agmenellum sp.* (BRITO, 2004).

Entretanto, os microrganismos mais comumente utilizados em processos de biorremediação são as bactérias. Porém esta utilização deve ser realizada com cautela, pois as conseqüências podem ser mais danosas ao meio ambiente que o próprio petróleo. A ausência de competição e de predadores, ou de qualquer fator ambiental que possa controlar uma superpopulação, pode ter efeitos tão drásticos ao meio ambiente quanto um

acidente. Assim a aplicação de microrganismos selecionados, ou modificados, deve ser feita apenas sob condições controladas.

Tabela 5. Diferentes espécies de bactérias hidrocarbonoclasticas.

Organismo	Referência <sup>a</sup>
<b>NAFTALENO</b>	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Alcaligenes denitri_cans</i> , <i>Mycobacterium ps.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. uorescens</i> , <i>P. saccharophila</i> , <i>Brevundimonas vesiculares</i> , <i>Burkholderia cepatia</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Corynebacterium renale</i> , <i>Moxarella sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i> , <i>Burkholderia cereus</i> , <i>P. marginalis</i> , <i>Neptunomonas naphthvorans</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>Cycloclasticus sp.</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Ryu e Oh (1989); Weissenfels et al. (1990) Weissenfels et al. (1991); Kelley e Cerniglia (1991) Dunn e Gunsalus (1973); Allen et al. (1997) Foght e Westlake (1996); Jeffrey et al. (1975) Mueller et al. (1990); Kuhm et al. (1991) Dua e Meera (1981); Tagger et al. (1990) Garcia-Valders et al. (1988); Trower et al. (1988) Grund et al. (1992); Foght e Westlake (1996) Barsley (1975, 1983); Goyal e Zylstra (1986) Yang et al. (1994); Walter et al. (1991) Burd e Ward (1996); Davies e Evans (1964) Stringfellow e Aitken (1995); Filonov et al. (1999) Hedlund et al. (1999); Geiselbrecht et al. (1998) Aitken et al. (1998)
<b>ACENAFTENO</b>	
<i>Beijernickia ps.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. Putida</i> , <i>P. uorescens</i> , <i>Burkholderia cepatia</i> , <i>Cycloclsticus sp.</i> , <i>Neptunomonas naphthvorans</i> , <i>Alcaligenes eutruphus A. paradoxus</i>	Chapman (1979); Schocken e Gibson (1984) Ellis et al. (1991); Geiselbrecht et al. (1998) Hedlund et al. (1999); Selinov et al. (1993)
<b>FENANTRENO</b>	
<i>Aeromonas sp.</i> , <i>A. feacalis</i> , <i>A. denitri_cans</i> , <i>Beijernickia ps.</i> , <i>Arthrobacter Polychromogenes</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>Sp. Paucimobilis</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Vibrio sp.</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Flavobacterium, sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i> , <i>S. griseus</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. saccharophila</i> , <i>P. uorescens</i> , <i>Stenotrphomonas maltophilia</i> , <i>Cycloclsticus sp</i> , <i>Gordona sp.</i> , <i>Acidovoreanx dela_eldi</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Shimgomonas sp.</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Cycloclasticus pugetti</i> , <i>Sp. yanoikuyae</i> , <i>Agrobacterium sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Burkholderia sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Nocardioides sp.</i> , <i>Flavobacterium gondwanense</i> , <i>Halomonas meridiana</i> , <i>Moxarella atlantae</i> , <i>Alteromonas haloplanktis</i>	Kiyohara et al. (1976, 1982, 1990); Jerina et al. (1976) Keuth e rehm, H.J. (1991); Weissenfels et al. (1990, 1991) Colla et al. (1959); West et al. (1984) Kiyohara e Nagao (1978); Treccani et al. (1954) Heitkamp e Cerniglia (1988); Evans et al. (1965) Guerin e Jones (1988, 1989); Sutherland et al. (1990) Foght e Westlake (1988); Trower et al. (1988) Mueller et al. (1990); Barsley (1983) Ghosh et al. (1983); Yang et al. (1994) Savino e Lollini (1977); Kohler et al. (1994) Stringfellow e Aitken (1995); Boonchan (1998) Juhasz (1998); Geiselbrecht et al. (1998) Foght e Westlake (1996); Kastner et al. (1998) Lal e Khanna (1996); Mahro et al. (1995) Shuttleworth e Cerniglia (1996) Dyksterhouse et al. (1995) Goyal e Zylstra (1986); Allen et al. (1999) Aitken et al. (1998); Dyksterhouse et al. (1995) Iwabuchi et al. (1998); Churchil et al. (1999) Juhasz (1991); Cullen et al. (1994) Romero et al. (1998)

Tabela 5. Continuação

Organismo	Referência <sup>a</sup>
<b>ANTRACENO</b>	
<i>Beijernickia ps.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Bu. cepatia</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Arthrobacter ps.</i> , <i>P. marginalis</i> , <i>Cycloclasticus sp.</i> , <i>P. uorescens</i> , <i>Sp. yanoikuyae</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Gordona sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Cycloclasticus pugetii</i>	Colla et al. (1959); Akhtar et al. (1975) Jerina et al. (1976); Evans et al. (1965) Ellis et al. (1991); Weissenfels et al. (1991) Foght e Westlake (1988); Walter et al. (1991) Mueller et al. (1990); Savino e Lollini (1977) Tongpim e Pickard (1996); Burd e Ward (1996) Geiselbrecht et al. (1998); Foght e Westlake (1996) Kim et al. (1997); Lal e Khanna (1996) Mahro et al. (1995); Goyal e Zylstra (1986) Dyksterhouse et al. (1995); Allen et al. (1999)
<b>FLUORANTENO</b>	
<i>A. denitri_cans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Bu. cepatia</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Gordona sp.</i> , <i>Acidovorans dela_eld</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>P. saccharophila</i> , <i>Pausteurella sp.</i>	Kelley e Cerniglia (1991); Walter et al. (1991) Weissenfels et al. (1991); Foght e Westlake (1988) Barsley (1975); Mueller et al. (1990) Ye et al. (1996); Kelley et al. (1993) Boonchan (1998); Juhasz (1998) Lal e Khanna (1996); Shuttleworth e Cerniglia (1996) Mahro et al. (1995); Willumsen e Karlson (1998) Sepic et al. (1998); Willumsen et al. (1998) Churchil et al. (1999); Chen e Aikten (1999)
<b>PIRENO</b>	
<i>A. denitri_cans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Stenotromonas maltophilia</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Gordona sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>Bu. cepatia</i> , <i>P. saccharophila</i> , <i>Moxarella atlantae</i> , <i>Alteromona haloplankits</i>	Heitkamp et al. (1988); Walter et al. (1991) Weissenfels et al. (1991); Grosser et al. (1991) Schneider et al. (1996); Ye et al. (1996) Boonchan (1998); Juhasz (1998) Kastner et al. (1998); Lal e Khanna (1996) Mahro et al. (1995); McNally et al. (1999) Jimenez e Bartha (1996); Churchill et al. (1999) Juhasz et al. (1997); Chen e Aikten (1999) Cullen et al. (1994)
<b>CRISENO</b>	
<i>Rhodococcus sp.</i> , <i>P. marginalis</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Agrobacterium sp.</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Burkolderia sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. saccharophila</i>	Walter et al. (1991); Burd e Ward (1996) Ye et al. (1996); Boonchan (1998) Lal e Khanna (1996); Aitken et al. (1998) Chen e Aikten (1999)
<b>BENZO[a]ANTRACENO</b>	
<i>A. denitri_cans</i> , <i>Beijernickia sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Agrobacterium sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Burkolderia sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. saccharophila</i>	Gibson et al. (1975); Maha_ey et al. (1988) Weissenfels et al. (1991); Schneider et al. (1996) Ye et al. (1996); Boonchan (1998) Juhasz (1998); Chen e Aikten (1999) Aitken et al. (1998)
<b>DIBENZO[a,h]ANTRACENO</b>	
<i>Sp. paucimobilis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ,	Ye et al. (1996); Boonchan (1998) Juhasz (1998)

<sup>a</sup> CERNIGLIA, 1992

### 2.2.1. Fatores que atuam na biodegradação do óleo

Alguns fatores desempenham papel importante na degradação microbiológica do óleo, tais como: a temperatura, disponibilidade das frações do petróleo, pH, taxa de oxigênio e nutrientes.

De acordo com KENNISH, 1997 os alcanos de baixo peso molecular degradam-se rapidamente (em até uma semana), enquanto que as espécies de alto peso molecular dos alifáticos e dos HPAs (Tabela 6) sofrem lenta degradação.

Tabela 6. Taxas de biodegradação de algumas espécies de HPAs (USEPA, 2000)

<b>Espécies</b>	<b>Número de anéis</b>	<b>Meia Vida (dias)</b>
Naftaleno	2	14 – 320
Antraceno	3	~ 130
Fluoreno	3	37
Benzo(a)antraceno	4	1100
Pireno	4	238
Criseno	4	510
Benzo(a)pireno	5	> 1400

A temperatura tem notável efeito sobre a taxa de degradação microbiológica, atuando diretamente nas características físicas e na composição química do óleo, na volatilização, na viscosidade do óleo e no metabolismo bacteriano. De modo geral, as temperaturas mais baixas aumentam a viscosidade e reduzem a biodegradação do óleo.

Por outro lado, o pH afeta principalmente a microbiota, valores fora da faixa entre 5-8 podem inativar certas enzimas essenciais à sobrevivência das bactérias (LAPINSKAS, 1989).

A aeração do solo permite o crescimento de bactérias aeróbias que podem oxidar espécies químicas reduzidas, pois a disponibilidade de oxigênio está intimamente ligada à cinética da oxidação dos hidrocarbonetos. Mesmo sob condições anaeróbicas a biodegradação dos mesmos pode acontecer, contudo com menor intensidade (ATLAS, 1981).

A importância do suprimento de nutrientes para o crescimento e metabolismo microbiológicos é discutida por vários autores, (COULON et al., 2005, LIEBEG et al., 1999, KWOK et al., 2003). LIEBEG et al., 1999

observaram que a adição de fósforo aumenta o consumo de oxigênio e, quando nitrogênio e fósforo estavam ausentes, havia diminuição da microbiota.

Ainda que todos estes fatores sejam importantes, devido à complexidade dos sistemas ambientais, existe a necessidade de se investigar e planejar individualmente a recuperação de cada sítio para os diversos contaminantes presentes.

Não existe uma regra estabelecida para a escolha do tipo de tratamento de locais contaminados. Cada caso deve ser analisado individualmente, considerando-se a relação de custo/benefício e avaliando-se a eficiência de cada tecnologia em relação ao tempo. Mais de uma técnica pode ser aplicada ao mesmo tempo ou alternadamente, tendo-se como objetivo a melhoria da eficiência do processo de remediação (DEOTTI, 2005).

### **2.3. Remediação de ambientes impactados**

A remediação pode ser definida como a aplicação de técnica ou conjunto de técnicas em uma área contaminada, visando a remoção ou a contenção dos contaminantes de modo a possibilitar sua reutilização, com limites aceitáveis de riscos ao meio ambiente e à saúde humana.

Os processos utilizados para tal propósito podem ser classificados como processos físicos, químicos, biológicos e térmicos.

Os processos físicos incluem processos de transferência de massa, como sorção, troca iônica, entre outros. Dentre os processos mais conhecidos podemos citar a extração por vapor e lavagem do solo (soil flushing). Os processos químicos envolvem reações químicas onde se destaca a degradação oxidativa de hidrocarbonetos halogenados em presença de  $Fe^0$ . Os processos térmicos envolvem o aquecimento do contaminante, induzindo a sua volatilização e remoção ou a fundição e solidificação da massa de solo contaminado (vitrificação). O processo térmico mais utilizado no tratamento de resíduos é a incineração, que é considerada por alguns como forma de disposição final de resíduos e consiste na decomposição térmica via oxidação com o objetivo de tornar o resíduo menos volumoso, menos tóxico ou não tóxico (CETESB, 1992). Os processos biológicos como fitorremediação e biorremediação também podem ser utilizados na remediação de locais contaminados. A fitorremediação consiste na utilização de vegetais para a



descontaminação de ambientes contaminados por compostos orgânicos e metais pesados. Já na biorremediação, os hidrocarbonetos presentes nos poluentes são utilizados como fonte de carbono e energia para microorganismos.

Dentre todas as alternativas de tratamento de ambientes impactados apresentadas, este trabalho vai abordar especificamente o processo de biorremediação.

### **2.3.1. Biorremediação**

A biorremediação tem sido definida de muitas formas pelos principais organismos e centros de pesquisa. A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) apresenta uma definição genérica sobre a prática da biorremediação: “Biorremediação é o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microorganismos para degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas”.

Durante muitos anos achava-se que qualquer composto orgânico deveria ser biodegradável. Esse conceito foi mudado somente após a descoberta dos organoclorados, pois são resistentes à degradação. Assim adotou-se o termo de substâncias recalcitrantes para aquelas mais dificilmente degradadas via microorganismos (LIMA, 2004).

Desde meados dos anos 90, estratégias de biorremediação vêm sendo adotadas como alternativas extremamente eficazes e de baixo custo para a remediação de solos contaminados com petróleo e outros compostos orgânicos (TRINDADE, 2005). Os processos de biodegradação podem ocorrer naturalmente no solo sem que alguma ação direta seja efetuada (biorremediação intrínseca) e podem ser estimuladas por diversas técnicas. A adição de nutrientes ou uso de biossurfactantes procuram criar ou atingir condições ótimas, estimulando o crescimento da população de microorganismos ou facilitando o contato destes com os contaminantes.

Existem basicamente duas técnicas de biorremediação, através da bioaugmentação e bioestimulação. A bioaugmentação consiste na adição de microorganismos exógenos ao meio contaminado, já que muitas vezes a população presente não está adaptada, e nem é capaz de degradar toda a gama de substratos existentes em uma mistura complexa (KING et al., 1997).

A técnica de bioestimulação consiste na adição de nutrientes (compostos contendo nitrogênio e fósforo) que são substâncias essenciais aos microrganismos responsáveis pela degradação do óleo (HOFF, 1993). Os nutrientes utilizados na biorremediação podem ser agrupados em três categorias: inorgânicos solúveis em água, formulações oleofílicas e aqueles chamados de *slow release*, com a solubilização lenta dos componentes. Os produtos solúveis são representados por uma grande variedade de fertilizantes agrícolas, com diferentes proporções de compostos contendo nitrogênio, fósforo e potássio. As vantagens de utilização desses produtos é a disponibilidade no mercado e um baixo custo. Por serem facilmente carregados do local contaminado devido a sua solubilidade, a necessidade de repetidas aplicações é uma desvantagem, pois pode levar a um aumento da toxicidade (PRINCE, 1993). Souza, 2003 aplicou um fertilizante agrícola (NPK) diretamente sobre a mancha de óleo derramado, com objetivo de suprir os nutrientes necessários à biorremediação do petróleo pelos microrganismos naturalmente presentes na água do mar. Seus resultados mostram a rápida biodegradação dos n-alcenos já nos 4 primeiros dias e sua completa eliminação após 7 dias de experimento.

As formulações oleofílicas são aquelas desenvolvidas para evitar o carregamento dos nutrientes, pois elas possuem afinidade pelo óleo e aderem às manchas, liberando os nutrientes na superfície óleo-água. A desvantagem desse produto é a competição com o petróleo no fornecimento de carbono aos microrganismos, retardando o processo de biodegradação do óleo (HOFF, 1992).

Os nutrientes *slow release* liberam pequenas quantidades de compostos durante um longo período de tempo, mantendo sua concentração controlada a níveis não tóxicos. São produzidos sob a forma de cápsulas solúveis, ou com grânulos que se prendem às rochas e aos sedimentos (HOFF, 1992, OH et al., 2001). Esses produtos são eficientes, entretanto apresentam custos elevados.

A biorremediação pode ser realizada tanto “*ex situ*” quanto “*in situ*”. No tratamento “*ex situ*”, o material contaminado é removido para um outro lugar para ser tratado, enquanto as técnicas “*in situ*” envolvem tratamentos no próprio local contaminado (COOKSON, 1995).

A biorremediação oferece algumas vantagens sobre outras técnicas de remediação, pois é ecologicamente correta, não altera o equilíbrio dos ecossistemas, visando somente a biodegradação dos compostos poluentes, reduzindo assim sua concentração e/ou toxicidade (PRITCHARD et al., 1991, PRINCE, 1993). Como freqüentemente é conduzida no próprio local, os custos com transporte e a interferência nas atividades realizadas nas proximidades são reduzidos. Ela também pode ser combinada com outras técnicas de descontaminação ambiental, em caso de resíduos complexos (COOKSON, 1995).

### 2.3.2. Biorremediação no mundo

O mercado de tecnologias ambientais atualmente disponível é bastante amplo, sendo que uma atenção maior tem sido dispensada aos tratamentos e remediações de solos e águas. Tal fato verifica-se pois a geração de resíduos sólidos é cada vez maior e, também, pela existência de políticas ambientais cada vez mais restritivas nos últimos anos.

O mercado mundial de aplicação de modelos de biorremediação segue uma rota direcionada pelas agências ambientais dos próprios países (FERNANDES, 1998). É sabido que o maior mercado mundial na área da remediação é o norte-americano (Tabela 7), responsável por 35 a 40% do mercado, sendo detentor do mais completo modelo de controle ambiental em execução. Segundo levantamento realizado pela USEPA, mais de 95,0% dos processos de biorremediação são empregados para descontaminação de solos e águas subterrâneas .

Tabela 7. Mercado mundial de biorremediação (1994-2005) em milhões de dólares.

	1994	1997	2000	2005
USA	160-210	220-270	400-500	500-700
EUROPA	105-175	180-270	450-550	600-800
MUNDO	430-460	500-600	1000-1300	1300-1600

Fonte: FERNANDES, 1998

A técnica de biorremediação tem sido utilizada em vários acidentes relevantes, como o causado pelo petroleiro Amoco Cadiz, na Costa da Bretanha, França em 1978, que derramou aproximadamente 225 milhões de litros de petróleo no mar. Os estudos conduzidos estabeleceram que as

condições ambientais ao longo da costa contribuíram para acelerar o processo natural de biodegradação do petróleo, isto é, a constante aeração causada pela ação das ondas e a lixiviação com o arraste de fertilizantes agrícolas, contendo os nutrientes necessários ao crescimento de microrganismos (HOFF, 1993).

Também foi utilizada a técnica de biorremediação, em acidente ocorrido em 1989, quando uma forte tempestade espalhou a mancha formada pelo derrame de 40 milhões de litros de petróleo do Exxon Valdez, fazendo com que a maior parte do óleo ficasse retida nas praias das diversas ilhas existentes na baía, contaminando mais de 500 km de costa (PRITCHARD et al., 1991). Os resultados positivos alcançados pelos testes de campo formaram a base para que a técnica de biorremediação fosse utilizada em maior extensão na limpeza da costa (PRITCHARD et al., 1991, HOFF, 1993).

Em 1990, o rompimento do oleoduto da refinaria Exxon Bayway, Nova Jersey, contaminou uma praia da Prall's Island. A maior parte do óleo foi removida por meios mecânicos, e em seguida foi iniciado um experimento de biorremediação com o uso do fertilizante Customblen (SOUZA, 2003).

### **2.3.3. Biorremediação no Brasil**

No Brasil, as pesquisas sobre as diversas aplicações da técnica de biorremediação de locais contaminados por petróleo e derivados, vêm sendo desenvolvidas por Universidades, isoladamente ou em conjunto com a Petrobras. Abaixo estão algumas Universidades que desenvolvem este trabalho.

- 1 O Programa de Pós Graduação em Biologia Marinha (Universidade Federal Fluminense) é pioneiro na identificação e no isolamento de bactérias hidrocarbonoclásticas, presentes nas águas e nos sedimentos das baías da Ilha Grande e da Guanabara, no estado do Rio de Janeiro. Há também, pesquisas sobre as respostas da microbiota das praias da Boa Viagem, do Forte do Rio Branco e da área da Estação Hidroviária de Niterói (RJ), aos efeitos agudos e crônicos da exposição a hidrocarbonetos aromáticos do petróleo.
- 2 A Universidade Federal do Paraná em conjunto com a Refinaria Presidente Getúlio Vargas – REPAR/Petrobras desenvolveu microrganismos

especializados para biorremediação de solos contaminados, com utilização tanto em áreas industriais como em áreas urbanas.

- 3 O Programa de Pós Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica (Fundação Universidade Federal do Rio Grande), juntamente com o Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor Petróleo e Gás - PRH-ANP/MCT , através do Convênio **PRH-ANP/MCT nº 27** realizado entre a Agencia Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis e a Fundação Universidade Federal do Rio Grande, desenvolveu um trabalho *in-situ* de biorremediação de local contaminado com óleo diesel e atualmente desenvolve estudos de laboratório sobre biorremediação de solo impactado por petróleo, e trabalhos utilizando técnicas de fitorremediação.

Entretanto, a técnica de biorremediação em solos contaminados com óleo cru sofre limitação devido ao baixo nível de disponibilidade dos hidrocarbonetos (baixa solubilidade em água, alta fixação sobre a matriz do solo e pouca transferência dos poluentes absorvidos da fase sólida para a fase aquosa). Dessa forma, a utilização de um biossurfactante pode minimizar estes problemas e aumentar os índices de biodegradação de óleo cru (VOLKERING et al., 1995). A adição de biossurfactante na técnica de biorremediação tem efeitos positivos em relação à dessorção de compostos orgânicos do solo e ao aumento da solubilidade dos mesmos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

#### **2.4. Surfactantes**

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais, uma vez que atuam como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos. A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o aumento dos cuidados ambientais combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura de surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes.

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica (Figura 4). A porção apolar é freqüentemente uma cadeia carbônica enquanto a porção polar pode ser iônica

(aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (DESAI e BANAT, 1997). Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico).

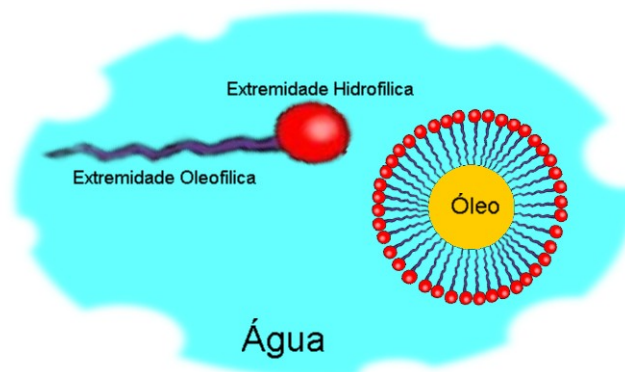


Figura 4. Representação da ação do surfactante sobre uma mancha de óleo (IPIECA, 1993).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular ordenado nas interfaces reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes. Estas propriedades fazem os surfactantes serem adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases. Um dos índices mais utilizados para a avaliação desta atividade surfactante é a concentração de micelas críticas (CMC), que é a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa ou a concentração mínima requerida para atingir a mais baixa tensão superficial ou interfacial (LIN, 1996).

Os surfactantes são aplicados em diversas áreas, como agricultura para formulações de herbicidas e pesticidas, na indústria alimentícia como aditivo em condimentos, nas indústrias farmacêuticas, têxtil e cosmética (LIN et al., 1993). Entretanto, o maior mercado para os surfactantes é a indústria petrolífera, onde são amplamente utilizados para a recuperação terciária de petróleo (EOR – Enhanced Oil Recovery), como na remoção e mobilização de resíduos de óleo e biorremediação (RON e ROSEMBERG, 2002).

Atualmente, nos países industrializados 70-75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, enquanto que nos países em desenvolvimento os compostos de origem natural predominam (BOGNOLO, 1999). No entanto, nos países industrializados existe uma tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais. Esta tendência é movida pela necessidade de produtos mais brandos, pela necessidade de substituição de compostos não biodegradáveis (alquil benzenos ramificados) e pelo aumento da especificidade dos produtos.

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

#### **2.4.1. Biossurfactantes**

Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais (Tabela 8), sendo classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolipídeos, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI e DESAI, 1993).

A classe dos glicolipídeos compreende um dos grupos mais conhecidos e estudados, apresentando longas cadeias de ácidos alifáticos ou ácidos hidroxialifáticos. Nesta classe destacam-se os raminolipídeos que são formados por uma ou duas moléculas de raminose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico (DESAI e BANAT, 1997).

Estes biossurfactantes foram isolados pela primeira vez por Bergstrom et al., 1946 de *Pseudomonas pyocyanea*. Posteriormente Jarvis e Johnson em 1949 conseguiram produzir a partir de *Pseudomonas aeruginosa* com 3% (v/v) de glicerol.

Os biossurfactantes raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* estão entre os mais efetivos e têm sido aplicados em vários processos de biorremediação (BANAT et al., 2000, PROVIDENTI et al., 1995). Sabe-se que a *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de produzir seis tipos diferentes de raminolipídeos com estrutura química e atividade surfactantes

similares (TORRENS et al., 1998). Estes biossurfactantes podem reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN/m com uma CMC de 27-54 mg/L (ABALOS et al., 2001). Estes compostos mostram-se amplamente adequados para aplicações de biorremediação por possuírem alta atividade emulsificante e baixa toxicidade.

Tabela 8. Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.

Naturais	Sintéticos
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biossurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betaínas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

Os biossurfactantes como os surfactantes, possuem moléculas com porções hidrofílicas e hidrofóbicas que tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade. Estas propriedades promovem a redução da tensão superficial conferindo a capacidade de detergência, emulsificação e dispersão das fases (DESAI e BANAT, 1997).

Embora a grande maioria dos biossurfactantes seja produzida por bactérias, fungos e leveduras também o produzem (HEALY et al., 1996).

Segundo GEORGIU et al., 1992 uma grande variedade de microorganismos produz biossurfactantes, sendo que o tipo, a quantidade e a qualidade são influenciados pela natureza do substrato, concentração de íons como P, N, Mg, O<sub>2</sub> e Fe<sup>+2</sup> no meio de cultura, além das condições de cultivo. Uma ampla diversidade de biossurfactantes pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 9. Diversidade de Biossurfactantes (MULLIGAN et al., 2001)

Microorganismos	Biossurfactantes
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipopeptídeo
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina
<i>Candida bombicola</i>	Soforolipídeo
<i>Cândida lipolytica Y-917</i>	Soforolipídeo
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Fosfolipídeo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Raminolipídeo
<i>Pseudomonas florences</i>	Lipopeptídeo
<i>Rhodococcus sp.</i>	Glicolipídeo



Mesmo que a exata utilização dos biossurfactantes, pelas bactérias ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas funções têm sido atribuídas a eles, como por exemplo:

- emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água (NITSCHKE e PASTORE, 2002).
- aderência-liberação da célula a superfícies: uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar. Os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas destas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais tais como:

- atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante (COOPER e PADDOCK, 1984).
- tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas, assim como podem suportar concentrações de até 10% de NaCl (BOGNOLO, 1999).
- biodegradabilidade: diferentes dos surfactantes químicos os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo (MULLIGAN et al., 1993).
- baixa toxicidade: os biossurfactantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais, além disto, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular. (NITSCHKE e PASTORE, 2002). A possibilidade de modificação da estrutura química e das propriedades físicas dos biossurfactantes através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas permite o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas.

#### **2.4.2. Aplicações Industriais**

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na etapa da produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação de petróleo. Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais.

#### **2.4.3. Aplicações na Biorremediação**

Como dito anteriormente, os acidentes com derramamento de óleo se tornaram numerosos e têm causado muitos problemas ecológicos e sociais. Os biossurfactantes aumentam a interação superficial água/óleo, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo ou alternativamente podem ser utilizados microrganismos produtores ou a adição de fatores de crescimento de microrganismos nativos capazes de produzir estes compostos (LANG e WAGNER, 1993).

Alguns estudos demonstraram o aumento da biodisponibilidade de compostos aromáticos pouco solúveis como os HPAs pelo uso de biossurfactantes. O tratamento de amostras contaminadas por fenantreno e naftaleno com biossurfactantes resultou em aumento nas suas taxas de mineralização e solubilização (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Biossurfactantes produzidos por *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *B. subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piche em areias contaminadas (BOGNOLO, 1999).

Os resíduos e frações de óleos pesados que sedimentem no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão. Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos problemático. A utilização de biossurfactantes para a limpeza de tanques, em substituição aos surfactantes convencionais, promoveu a limpeza e recuperação de 90% dos hidrocarbonetos presentes no resíduo (BOGNOLO, 1999).

## **2.5. Características da Área de Estudo e Justificativa**

O município do Rio Grande – RS, está localizado na Planície Costeira Sul do Estado (32°01'40" de latitude sul e de 52°05'40" de longitude oeste), a 2 metros acima do nível do mar. A região possui clima subtropical, com chuvas regularmente distribuídas durante o ano, e média anual das temperaturas máximas em torno de 24°C e temperaturas mínimas de aproximadamente 11°C. A cidade está situada na região estuarina da Laguna dos Patos, a aproximadamente 10 km da desembocadura no Oceano Atlântico. A cidade destaca-se por possuir o maior porto do Rio Grande do Sul, com importância regional dentro do Mercosul, estando entre os portos de maior movimentação de cargas do Brasil. Nela também são realizadas diversas atividades de *midstream* e *dowstream* da indústria do petróleo: refino, distribuição e consumo. As atividades do seu porto englobam desde o traslado de petróleo cru e combustíveis refinados, até o embarque de produtos petroquímicos, cereais, fertilizantes e pesca.

As empresas do setor de P & G instaladas na região estuarina da Lagoa dos Patos são a Refinaria de Petróleo Ipiranga com uma unidade de Refino de

Petróleo e a Transpetro (TERIG) que apresenta um terminal para carga e descarga de petróleo, combustíveis e de derivados do petróleo; e a Granel Química que inclui um terminal para descarga e carga de produtos petroquímicos.

A Refinaria Ipiranga recebe o petróleo através de um duto de 4 km de comprimento, proveniente do píer petroleiro localizado no Porto de Rio Grande operado pela Transpetro. O duto prolonga-se pela região estuarina, passando por uma ponte e pelo aterro da área da antiga conexão do saco da Mangueira, por onde passa uma rodovia com intenso tráfego de produtos derivados do petróleo.

A partir das características sócio-econômicas e ambientais verifica-se que o sistema lagunar estuarino da Laguna dos Patos é um ambiente exposto a possíveis acidentes relacionados a operações de transporte, carga e descarga de petróleo e seus derivados, existindo a necessidade do conhecimento deste local.

Embora muitos trabalhos tenham abordado a contaminação por hidrocarbonetos poliaromáticos no estuário da Laguna dos Patos (ambiente aquático) (BAISCH et al., 2000, CORDEIRO 2003, BENTO 2004, GARCIA 2005, BARBOSA 2005, PEDERZOLLI 2006, FRONZA 2006, OLIVEIRA 2006) até o presente momento não foram encontrados estudos sobre contaminação ou sobre biorremediação de petróleo na região costeira.

BENTO (2004) utilizou um biossurfactante produzido pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, em um derrame simulado de óleo diesel, in situ, em uma ilha situada no estuário da Lagoa dos Patos. Os resultados foram promissores, porém foi recomendado que estudos fossem realizados com microbiota local, uma vez que o fungo utilizado foi isolado de um local contaminado na região sudeste do país.

Sendo assim, realizar um experimento, verificando a possibilidade do uso eficiente de um biossurfactante produzido a partir de um microrganismo isolado em nossa região, além de não ter sido feito até o presente momento, pode oportunizar que em prováveis acidentes envolvendo derrames de petróleo e seus derivados, seja utilizado um surfactante natural.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi dividido em dois experimentos, ambos com simulações de derrames de petróleo em laboratório em que foram utilizados caixas de vidro com  $0,078 \text{ m}^2$  ( $0,28 \text{ m}$  de lado) e  $0,25 \text{ m}$  de altura e adicionados  $10 \text{ kg}$  de solo com densidade igual a  $1,23 \text{ g/cm}^3$  (Figura 5).



Figura 5. Foto das caixas contendo o solo contaminado com petróleo.

No primeiro experimento, iniciado em Janeiro de 2006, o derrame foi feito em caixas com três tratamentos distintos de biorremediação e dois controles, um de solo e outro de petróleo (Figura 6 Experimento I). O segundo experimento, iniciado em Junho de 2006, contou com dois controles (solo e petróleo) e dois tratamentos de biorremediação (Figura 6 Experimento II). Em um dos tratamentos foi adicionado biossurfactante estéril junto aos nutrientes e no outro, nutrientes e biossurfactante não estéril.

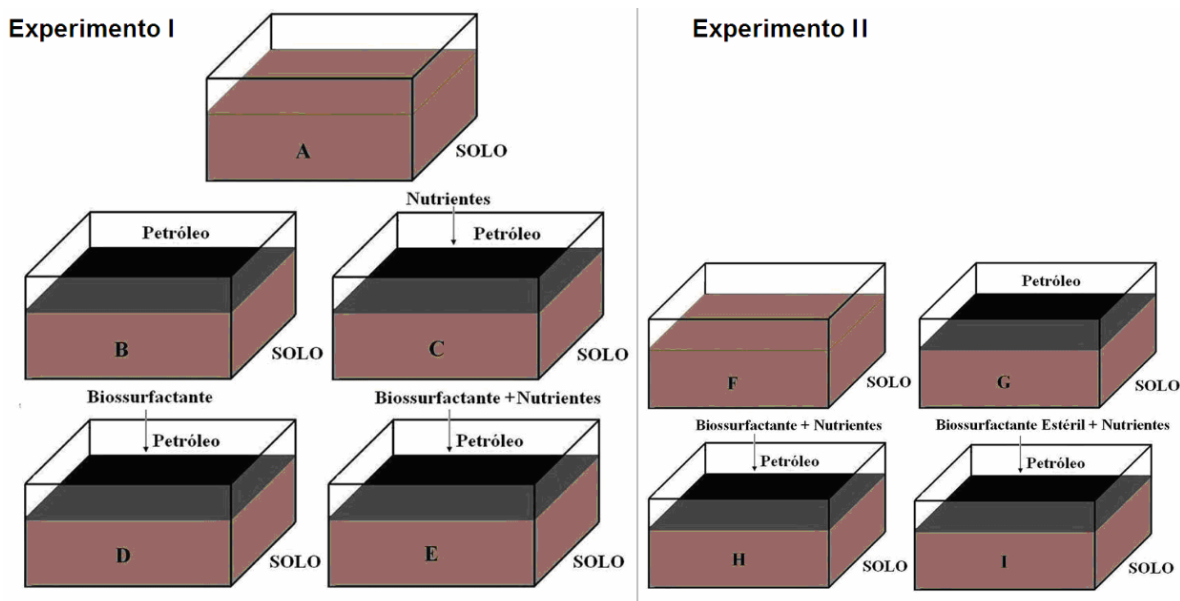


Figura 6. Esquema de composição das caixas.

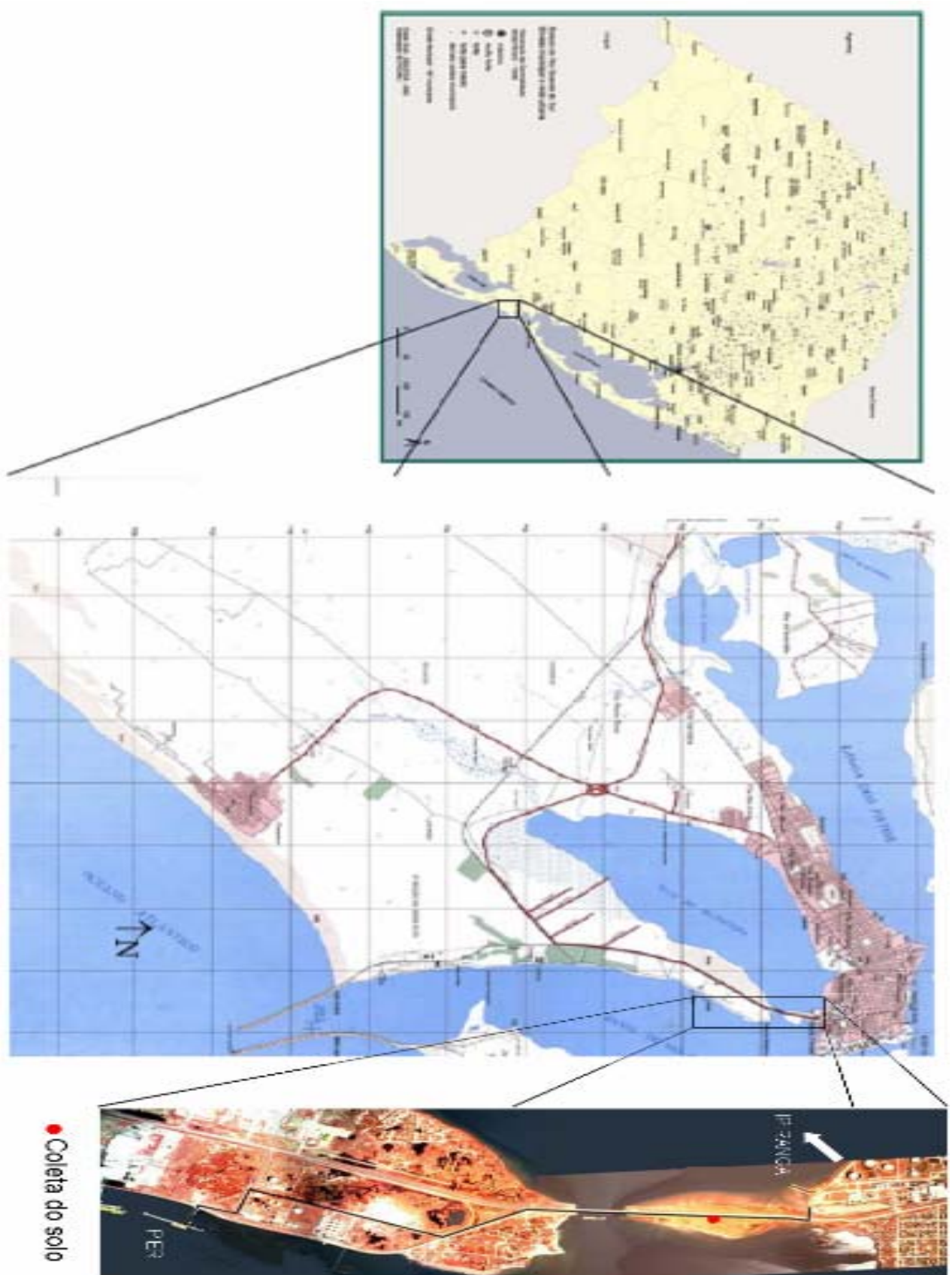


Figura 7. Local da coleta do solo.

O solo escolhido para a realização deste estudo foi amostrado às margens do estuário, em uma região próxima ao oleoduto que liga o terminal da Transpetro (TERIG) à Refinaria Ipiranga (Figura 7). O biossurfactante empregado nos tratamentos foi produzido no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG por uma cepa bacteriana isolada na região de Rio Grande e classificada pelo Laboratório de Microbiologia como *Pseudomonas aeruginosa* LBM10, bem como todas as análises referentes à parte microbiológica, e sua interpretação.

Os derrames de petróleo foram feitos na proporção de 4% m/m de petróleo/solo. Juntamente com o petróleo foram adicionados nutrientes, nitrogênio na forma de uréia (46% de N) e fósforo na forma de superfosfato simples (18% de P) na relação 100:1,25:1 (C:N:P) que segundo TRINDADE, 2005 é uma boa relação para este tipo de experimento. O biossurfactante foi adicionado na relação 1:1 v/v de petróleo/biossurfactante (BENTO, 2005). Os experimentos foram monitorados por um período de seis meses.

Durante o tempo dos experimentos, as caixas foram mantidas com umidade entre 65-80% da capacidade de campo conforme SARKAR et al., 2005, sendo que a temperatura e o pH também foram monitorados.

### **3.1. Tipo de petróleo usado no experimento**

O petróleo utilizado neste trabalho foi fornecido pela Refinaria Ipiranga, sendo um petróleo leve do tipo Hydra com 49,3 °API e densidade de 0,778 g/cm<sup>3</sup>. O Anexo 8.1 contém um certificado de análise desse óleo com uma caracterização mais detalhada.

### **3.2. Produção do biossurfactante**

O biossurfactante foi produzido por fermentação em erlenmeyers contendo meio sintético, com a seguinte composição: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (0,05 M), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,03 M), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (0,04 M), MgSO<sub>4</sub>, (8,0x10<sup>-4</sup>M), CaCl<sub>2</sub>, (7,0x10<sup>-6</sup> M), Na<sub>2</sub>EDTA (4,0x10<sup>-6</sup>M) e óleo de soja (40 g/L). Foram adicionados 4 tubos com inóculo a cada erlenmeyer, que foram raspados com água peptonada 0,1%. Os erlenmeyers foram dispostos em incubadora rotatória a 30°C e 180 rpm por

48h, então decorrido este tempo, o meio submerso foi centrifugado a 6000rpm por 15min, e descartado o precipitado.

### **3.3. Limpeza do Material**

Todo o material utilizado nas análises cromatográficas foi limpo por imersão durante 24 horas em Extran® alcalino da Merck® a 5%, o enxágüe foi feito primeiramente com água corrente, água destilada, e o último enxágüe com água de osmose reversa. O material foi seco em estufa a 105°C, e em seguida limpo com acetona e novamente seco. O material utilizado para as análises de hidrocarbonetos foi ambientado com solvente de uso.

### **3.4. Métodos de análise**

#### **3.4.1. Amostragem de solo**

A amostragem dos solos foi feita sempre de forma aleatória com auxílio de tubos de 12cm de altura, que foram introduzidos no solo. Tomou-se apenas a parte superior ( $\pm 5$  cm) de cada tubo. Em seguida as amostras foram homogeneizadas e quarteadas. Uma parte acondicionada em frascos estéreis para análises microbiológicas que foram processadas no mesmo dia. O monitoramento da microbiota foi realizado através da contagem de bactérias mesófilas, bolores e leveduras. A outra parte da amostra foi seca a temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ), desagregada e acondicionada em frascos de vidro para posterior análise química.

#### **3.4.2. Medição do pH**

A medição do pH foi feita pela utilização de um pH-metro da marca Oakton® (modelo pH6/00702-75, Acorn Series), calibrado com padrões de pH 4 e 7, utilizando eletrodo combinado de vidro (CAMARGO, 1986).

#### **3.4.3. Determinação da Umidade**

Para a análise de umidade foram pesados dois gramas de amostra seca a temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ) em uma cápsula de vidro, previamente seca e tarada. Esta cápsula foi levada a uma estufa com temperatura de 105°C por três horas. A amostra foi retirada da estufa e colocada em um dessecador até



entrar em equilíbrio com a temperatura ambiente, sendo novamente pesada. Este procedimento foi realizado até peso constante. A perda de peso representa a umidade bruta, ou seja, todos os compostos voláteis da amostra.

#### **3.4.4. Contagem de bactérias e fungos**

As bactérias foram inoculadas em profundidade, em placas de Petri, com ágar plate count, em duplicata, incubadas por 48h a 35-37°C. Após a incubação foi realizada a contagem nas placas que continham entre 25 e 250 colônias, utilizando a metodologia segundo a ABNT, 1997 para realizar os cálculos da contagem de bactérias mesófilas.

Os fungos foram inoculados por espalhamento em superfície, em placas de petri, com ágar batata dextrose, em duplicata, incubadas por 3-5 dias a 25°C. Após esta etapa foi realizada a contagem nas placas que continham entre 15 e 150 colônias, utilizando a metodologia segundo FDA, 2001 para realizar os cálculos da contagem de bolores e leveduras.

#### **3.4.5. Análise de Nutrientes**

Os nutrientes avaliados durante o período de experimento foram: carbono orgânico total (COT), nitrogênio total (N) e fósforo total (P), cujos procedimentos são descritos a seguir. Todas as análises químicas dos nutrientes foram feitas em triplicatas.

##### **3.4.5.1. Carbono orgânico total (COT)**

Para a determinação do COT seguiu-se o método descrito por STRICKLAND e PARSONS, 1972 e modificado por GAUDETTE et.al., 1974. A amostra foi pesada em um erlenmeyer onde foi adicionado ácido fosfórico com finalidade de retirar os carbonatos, e seguido de aquecimento de todo o conjunto. Após o resfriamento adicionou-se a solução oxidante ( $H_2SO_4/K_2Cr_2O_7$ ) e novamente levou-se ao aquecimento. Posteriormente a amostra foi diluída e titulada com sulfato ferroso amoniacal (0,1N).

### **3.4.5.2. Nitrogênio total**

Para a determinação do nitrogênio total foi usado o método Micro-Kjeldhal, segundo os procedimentos descritos em TEDESCO, 1995. Inicialmente, a amostra é digerida em meio ácido com o objetivo de converter todo o nitrogênio orgânico à forma amoniacal. A mistura é então alcalinizada e toda a amônia pode ser destilada com vapor d'água. O destilado alcalino foi recebido por uma solução de ácido bórico, a qual foi titulada com ácido sulfúrico.

### **3.4.5.3. Fósforo total**

Na análise de fósforo total as amostras de solo foram calcinadas, para eliminar a matéria orgânica, e posteriormente atacadas com solução de ácido clorídrico segundo RUTTENBERG, 1992. Em seguida adicionou-se ácido ascórbico e molibdato de amônio para a formação de um complexo de fosfomolibdato de cor azulada, possibilitando a determinação da concentração por colorimetria em espectrofotômetro no comprimento de onda de 885 nm.

### **3.4.6. Análise de Óleos e Graxas.**

A determinação de Óleos e Graxas foi realizada segundo o método gravimétrico descrito por RIZZO e RAIMUNDO, 2003 que utilizam a técnica de ultrassom para extração dos hidrocarbonetos. O extrato obtido foi transferido para um balão previamente tarado e levado a um evaporador rotativo, completando a total evaporação do solvente através do uso de fluxo de nitrogênio. O balão é então novamente pesado e pela diferença de peso inicial e final dos balões determinou-se a concentração nas amostras.

### **3.4.7. Extração e Análise dos Hidrocarbonetos**

O procedimento de análises dos hidrocarbonetos seguiu o fluxograma descrito na Figura 8, onde F1 representa os hidrocarbonetos alifáticos de C12 a C36, e F2 representa os HPAs investigados.

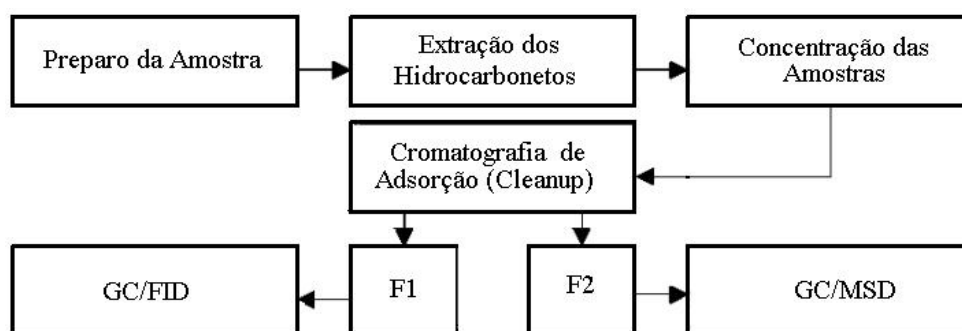


Figura 8. Fluxograma do método de análise de hidrocarbonetos.

#### 3.4.7.1. Extração de hidrocarbonetos nos sedimentos

O procedimento de análises dos hidrocarbonetos seguiu as recomendações do “*Reference methods for marine pollution studies, n° 20: determinations of petroleum hydrocarbons in sediment*” (UNEP, 1991).

Para a extração de hidrocarbonetos do solo as amostras coletadas foram secas à temperatura ambiente, desagregadas, homogeneizadas e pesadas, sendo em seguida adicionados padrões surrogados (Naftaleno D-8, Fenantreno D-10, Crizeno D-12, Perileno D-12 Eicoseno, e Tetradeceno).

As amostras de solo foram extraídas por um período de 12 horas, utilizando um extrator do tipo Soxhlet, e uma mistura de solventes (50% Diclorometano e 50% n-Hexano), ambos com pureza de grau pesticida. Adicionaram-se pequenas lâminas de cobre, limpas e ativadas com solução de ácido clorídrico, com a finalidade de eliminar possíveis compostos de enxofre, que são contaminantes nas análises cromatográficas.

#### 3.4.7.2. Cromatografia de adsorção em coluna de vidro (clean up)

Os extratos dos solos foram concentrados em evaporador rotativo até aproximadamente 3mL, quando foi adicionada uma pequena quantidade de sulfato de sódio para garantir a ausência de água. Então foram submetidos à cromatografia de adsorção em coluna de vidro (clean up), com a finalidade de separar a fração de hidrocarbonetos alifáticos (F1) da fração aromática (F2).

A coluna para o clean up foi empacotada com sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), sílica ( $\text{SiO}_2$ ) e alumina ( $\text{AlO}_3$ ). Todas essas substâncias foram previamente calcinadas a  $200^\circ\text{C}$  durante 4 horas, sendo a lã de vidro utilizada extraída

durante 4h com hexano/diclorometano, com a finalidade de eliminar os resíduos orgânicos que pudessem interferir nas análises.

Para separar F1 o solvente utilizado foi n-hexano e para a obtenção de F2 utilizou-se primeiramente diclorometano em n-hexano (20%) e em seguida diclorometano em n-hexano (50%).

As frações finais foram concentradas em um evaporador rotativo. Em seguida adicionaram-se padrões cromatográficos, hexadeceno para os alifáticos e 9,10-dihidroantraceno para os HPAs e então aferidas a 1mL. A seguir foram transferidas para frascos previamente limpos e rotulados.

### **3.4.7.3. Análise dos Hidrocarbonetos**

Os hidrocarbonetos alifáticos (C12 a C36) foram determinados em cromatógrafo modelo Perkin Elmer Clarus 500 – acoplado com detector de ionização de chama (GC-FID), coluna cromatográfica Elite-1 (Crossbond 100% dimetil polisiloxano), 30 metros, 0,25 mm DI, 0,25  $\mu\text{m}$  DF e injetor automático de amostra.

A rampa de aquecimento utilizada foi de 40°C, aumentando a temperatura na razão 5°C min<sup>-1</sup> até 290°C, sendo mantida por 5 min; mudando a taxa de aquecimento para 10°C min<sup>-1</sup> até 300°C, sendo então mantida por 10 minutos. A temperatura do detector foi de 310°C e o fluxo gases foi de 45 mL min<sup>-1</sup> de hidrogênio e 450 mL min<sup>-1</sup> de ar sintético. As amostras foram injetadas no modo Splitless, com fluxo de 50 mL de hélio, após 1 minuto.

O volume de amostra injetado foi de 1 $\mu\text{L}$  e a temperatura do injetor fixada em 280°C tendo como gás carreador Hélio (1,5 mL.min<sup>-1</sup>). O limite de detecção do equipamento é de 250  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Para a determinação dos HPAs foi utilizado um cromatógrafo de fase gasosa Perkin Elmer Clarus 500 – acoplado com espectrômetro de massa (GC-MS), com coluna Elite-5MS (5% Difenil – 95% dimetilsiloxano) com 30 metros de comprimento, 0,25 mm D.I., 0,25  $\mu\text{m}$  DF e injetor automático de amostra.

A rampa de aquecimento utilizada foi de 40°C, aumentando a temperatura na razão 10°C min<sup>-1</sup> até 60°C continuando o aquecimento na razão 5°C min<sup>-1</sup> até 290°C, sendo mantida por 5 min; mudando o aquecimento para a razão 10°C min<sup>-1</sup> até 300°C, sendo mantida por 10 minutos. Para o detector foi utilizada uma temperatura de fonte de 200°C e a de linha de

transferência 280°C, empregando um impacto eletrônico de 70 eV. As amostras foram injetadas no modo Splitless, com fluxo de 50 mL de hélio, após 1 minuto. O volume de amostra injetado foi de 1 µL e a temperatura do injetor fixa em 280°C tendo como gás carreador Hélio (1,5 mL min<sup>-1</sup>). O limite de detecção do equipamento é de 1 µg.kg<sup>-1</sup>.

A identificação dos hidrocarbonetos foi feita por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massas dos compostos padrões associado com a biblioteca interna do equipamento. A quantificação foi realizada por curvas padrão de cada analito.

Para a identificação dos HPAs foi utilizado o método SIR (selected ion recording) onde os íons característicos correspondentes à massa/carga (m/z) de fragmentação de cada composto foi selecionado e monitorado.

#### **3.4.8. Tratamento Estatístico**

Para fazer uma caracterização geral do experimento utilizou-se a Análise de Componentes Principais (*Principal Components Analysis*). Para os dados de nutrientes (COT, N e P) foram empregados softwares (Excel®, Statistica®, usando ANOVA e teste Tukey), de acordo com os procedimentos convencionais, com um grau de significância de 5%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos durante o período de estudo tanto para o Experimento I, que busca estabelecer qual o melhor tratamento de biorremediação, quanto para o Experimento II que foi utilizado com o intuito de conhecer a influência de um biossurfactante estéril e de outro não estéril, no processo de biorremediação. Serão discutidos os resultados de pH, contagem de bactérias e fungos, carbono orgânico total, nitrogênio, fósforo, hidrocarbonetos totais de petróleo, hidrocarbonetos alifáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

### 4.1. Caracterização do solo.

A coleta de solo para ambos os experimentos foi feita no dia da sua implantação, sendo que para o primeiro experimento o solo foi coletado em Janeiro de 2006 e para o experimento II o solo foi coletado em Junho de 2006. Uma caracterização geral dos solos é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Caracterização do solo utilizado.

Parâmetro	N (%)	P (%)	COT (%)	OG (%)	pH	Porosidade	Granulometria		
							Areia	Silte	Argila
Solo Experimento I	0,02 ± 0,001	0,10 ± 0,006	0,27 ± 0,018	0,05	7,88	0,65	96,8	2,3	0,9
Solo Experimento II	0,05 ± 0,001	0,08 ± 0,002	0,70 ± 0,011	0,23	7,98	0,64	91,0	7,1	1,9

O solo utilizado nos experimentos é um solo arenoso, permitindo uma boa difusão de oxigênio, e desta forma, facilitando o processo aeróbico de degradação.

Embora os solos para ambos os experimentos tenham sido coletados praticamente no mesmo local existe uma heterogeneidade natural, além do fato da região de onde, o solo foi retirado ser fortemente influenciada pelo aporte antropogênico de nutrientes oriundos do distrito industrial da cidade. Cabe salientar ainda que este aporte é sazonal tendo o seu maior pico coincidindo com a implantação do 2º experimento, fato este que ajuda a explicar o aumento do teor de nitrogênio. Outro fator importante é a proximidade do local de coleta a uma rodovia, onde o trânsito de caminhões que transportam matéria-prima para as fábricas de fertilizantes da região, pode ocasionar não só alteração dos

nutrientes pela perda de matéria prima, como variações no teor de compostos de carbono, pela emissão de poluentes.

Em relação ao teor de COT, também é mais provável que esta diferença entre os solos esteja relacionada à estação do ano, uma vez que na época de implantação do segundo experimento a cobertura vegetal era mais antiga, e provavelmente com maior teor de material em decomposição. As diferenças de granulometria podem estar relacionadas a este incremento de matéria orgânica, uma vez que comumente a matéria orgânica está associada às frações mais finas, principalmente sílticas e argilosas.

#### **4.2. Caracterização do Biossurfactante**

Os microorganismos capazes de produzir biossurfactantes crescem em diferentes tipos de substratos, de carboidratos a hidrocarbonetos, contudo o rendimento e a composição desses biossurfactantes dependem das condições utilizadas (pH do meio, composição dos nutrientes, temperatura, substrato e características do fermentador) (MULLIGAN et al., 2002).

Embora existam biossurfactantes de alto peso molecular, estes são menos efetivos na redução da tensão interfacial do que os compostos com peso molecular menos elevado, e entre estes compostos destacam-se como os mais estudados os ramnolípídeos, da classe dos glicolípídeos produzidos principalmente por *Pseudomonas*.

O biossurfactante utilizado neste estudo (produzido por *Pseudomonas aeruginosa*) foi caracterizado por PRIETO, 2007 em termos da estabilidade das emulsões formadas, avaliando o efeito de variações de temperatura, pH, salinidade e substrato sobre o índice de emulsificação, determinados por GAYLARDE, 2000.

Para determinar o efeito da temperatura, o biossurfactante foi mantido a uma determinada temperatura constante por 120 min, utilizando a faixa de 20-100°C. Para determinar o efeito do pH na atividade emulsificante, o pH foi ajustado com ácido ou álcali (4-9). O efeito da adição de diferentes concentrações de NaCl sobre a atividade do biossurfactante foi investigado pela dissolução de NaCl (0,5-20% p/v). E em relação à natureza dos hidrocarbonetos, foram testados diferentes compostos de natureza hidrofóbica

na formação de emulsões, como hexano, óleo de soja, óleo de pescado, óleo diesel, petróleo, gasolina, benzeno-tolueno-xileno (BTX), ciclohexano, clorobenzeno.

Os resultados mostraram que quanto à temperatura o biossurfactante mostrou excelente estabilidade entre 35 e 40°C, contudo a 100°C cerca de 80% da capacidade emulsificante ainda estava presente, mostrando uma boa estabilidade do biossurfactante ao tratamento térmico. Com relação ao pH, verifica-se que as variações entre 6 e 9, não comprometeram a capacidade emulsificante do biossurfactante mostrando-se eficiente. Em baixas concentrações salinas (0,5%), foram obtidas as melhores emulsões, no entanto, em altas concentrações (3%), salinidade próxima a encontrada em regiões estuarinas, cerca de 80% da capacidade emulsificante permanecia. No que diz respeito aos substratos utilizados, obteve-se como melhores resultados o Óleo de soja, Óleo diesel, Gasolina e Ciclohexano, enquanto Petróleo, BTX e Clorobenzeno formaram emulsões estáveis. Já os substratos n-hexano e Óleo de pescado não apresentaram bons índices de emulsificação.

Com isso, pode-se dizer que o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* isolada de ambiente costeiro do sul do Brasil apresentou potencial para produção de biossurfactante ramnolipídico, a partir de diferentes fontes de carbono disponíveis na região, sendo que entre o tipo de substrato os melhores resultados foram obtidos para o óleo de soja. O biossurfactante também se mostrou estável quanto a variação de temperatura, variação salina e variação de pH entre 6 e 9 (PRIETO, 2007).

### **4.3. EXPERIMENTO I**

#### **4.3.1. Controle de Umidade, Temperatura e Potencial Hidrogeniônico (pH)**

O controle da umidade do solo é muito utilizado na agricultura, entretanto existe pouca informação em seu uso para degradação biológica. A maioria dos estudos realizados utiliza valores de umidade próximos aos valores ótimos para o crescimento dos microorganismos.

Neste trabalho a faixa estabelecida de umidade para o experimento foi mantida entre 65 e 80% da capacidade de campo como recomendado por



(SARKAR et al., 2005) que sugeriu esta como uma faixa apropriada para o processo de biodegradação.

A temperatura do solo é um dos fatores mais importantes que regulam a atividade microbológica e a taxa de decomposição de compostos orgânicos. Geralmente aumentando a temperatura aumenta-se a taxa de degradação destes compostos no solo. Normalmente a taxa de crescimento microbológico tende a dobrar para cada aumento de 10°C da temperatura (THIBAUT e ELLIOTT, 1979). Temperaturas muito elevadas, entretanto, causam uma diminuição do crescimento e metabolismo, chegando a ser letal para temperaturas acima de 42°C, quando se inicia o processo de quebra enzimática. No entanto, com o aumento da temperatura, há um aumento da dessorção, fazendo com que mais compostos orgânicos estejam disponíveis para a degradação. O aumento da temperatura também aumenta a evaporação dos alcanos de cadeias curtas e hidrocarbonetos de peso molecular baixo (ATLAS, 1994). Por outro lado, uma diminuição na temperatura é associada a uma diminuição da taxa de crescimento microbológico. Baixas temperaturas podem aumentar o período de aclimação e retardar o início da biorremediação.

Durante o período de experimento, houve variações na temperatura ambiente do laboratório (Tabela 12), no entanto durante a maior parte do tempo a temperatura manteve-se entre 20 e 30°C. As temperaturas mais baixas foram verificadas em dias isolados. Cabe salientar que este experimento foi montado no verão, o que contribuiu para as altas temperaturas observadas. As altas temperaturas verificadas na instalação do experimento propiciaram o incremento dos primeiros processos de intemperização do petróleo, como a evaporação, onde os hidrocarbonetos alifáticos, mais leves são eliminados.

Tabela 12. Variação da temperatura ambiente do laboratório ao longo do período de 180 dias do experimento.

Mês	Mínima	Máxima
Janeiro	25	32
Fevereiro	23	35
Março	22	34
Abril	17	29
Mai	12	25
Junho	8	27
Julho	10	25

A atividade microbiológica no solo é fortemente afetada pela disponibilidade de nutrientes, compostos tóxicos, e pela tolerância dos próprios microorganismos às variações do pH. Alguns microorganismos têm uma maior tolerância a variações de pH, enquanto outros suportam apenas pequenas variações. O pH considerado ótimo para uma rápida decomposição está entre 6.5 a 8.5. Bactérias têm seu pH ótimo próximo de sete. Se o pH é ácido, normalmente as bactérias não conseguem competir com os fungos pelos nutrientes disponíveis. Este pH pode influenciar na solubilidade ou disponibilidade de macro-nutrientes (especialmente fósforo) e micro-nutrientes, na mobilidade de substâncias possivelmente tóxicas, e na reatividade de alguns íons como  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Ca}^{+2}$  (PAR et al., 1983).

Como se pode observar na Figura 9, houve variações de pH em todas as caixas, principalmente no primeiro mês. Contudo, estas variações observadas sempre estiveram dentro da faixa considerada ótima para o crescimento microbiológico, que segundo RISER-ROBERTS, 1998 é de 6,5 a 8,5 e desta forma contribuíram de forma positiva em todos os tratamentos.

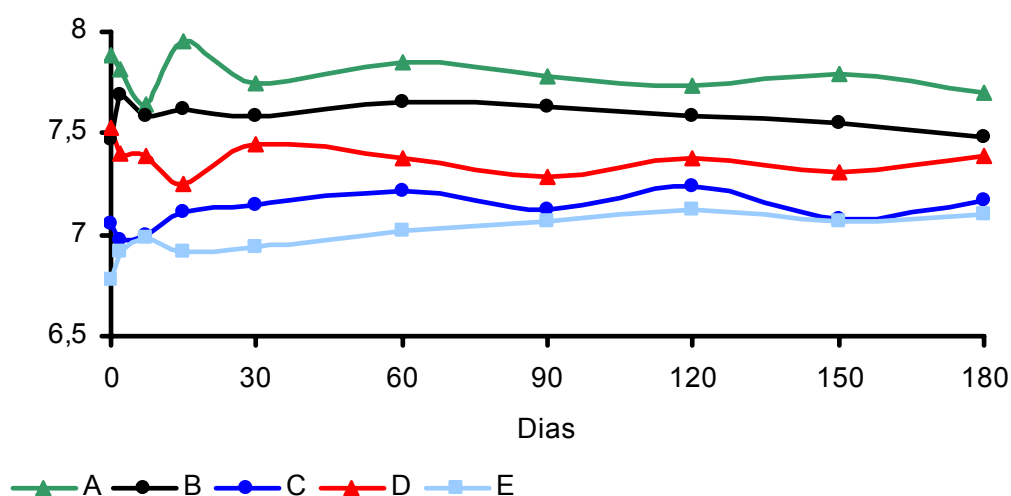


Figura 9. Valores de pH no decorrer do tempo de experimento para as caixas A (controle de solo), B (controle de petróleo), C (adição de nutrientes), D (adição de biossurfactantes) e E (adição de biossurfactantes + nutrientes).

Os solos contaminados por hidrocarbonetos podem conter uma série de metais pesados potencialmente tóxicos para o meio ambiente. Estando o pH destes solos em uma condição próxima à neutralidade, entre 6.5 e 8, além de

favorecer a atividade microbiana, também auxilia na formação de precipitados insolúveis, imobilizando alguns metais pesados.

#### **4.3.2. Análise dos Nutrientes - Carbono Orgânico Total, Nitrogênio e Fósforo.**

Os solos possuem naturalmente uma grande quantidade de microorganismos: bactérias, fungos, protozoários entre outros organismos, os quais precisam de uma fonte de carbono para o crescimento celular, assim como de uma fonte de energia, nitrogênio e fósforo para a manutenção das funções metabólicas necessárias para o crescimento. Embora o petróleo sirva como fonte de carbono para os microrganismos, ele não fornece outros nutrientes que também são necessários (NAS, 1985). Nos sistemas naturais, o hidrogênio e o oxigênio são supridos pela água, já fósforo e nitrogênio são nutrientes que geralmente encontram-se em quantidade insuficientes, sendo que os demais elementos se apresentam no solo em quantidade superior à demandada pelos microorganismos. Os nutrientes que se encontram em menor quantidade são limitantes para a biodegradação, devendo, portanto ser adicionados no solo para aplicação de técnicas de biorremediação. Em geral o nitrogênio e fósforo, necessários para manutenção metabólica, são adicionados em maior quantidade que os outros elementos (SCHMIDT, 2004)

O carbono é o elemento fundamental da matéria orgânica dos solos uma vez que esta é composta por cerca de 60 % desse elemento, enquanto os demais elementos perfazem o restante. Quando uma molécula do óleo chega ao solo, ela pode sofrer os processos de degradação e sorção, e os resultados destes dois processos podem ser: a absorção da molécula pelas plantas, a lixiviação da molécula para camadas subsuperficiais do solo, e assim atingir os cursos de água subterrâneos.

O nitrogênio é o nutriente mais freqüentemente utilizado em biorremediação, sendo geralmente adicionado na forma de uréia ou sais de amônio e é usado principalmente para o crescimento celular.

Além do nitrogênio, os microrganismos também necessitam de fósforo para o crescimento, e este pode ser adicionado na forma de sais de fosfato.

Sob condições favoráveis de temperatura e nutrientes, a biodegradação pode recuperar o solo contaminado por derrames de petróleo.

Os valores encontrados para os nutrientes COT, N e P são apresentados na Tabela 11, em que se pode verificar que na caixa controle de solo (A) os valores mantiveram-se sem grandes alterações, no entanto as demais caixas controle de petróleo (B), adição de nutrientes (C), adição de biossurfactante (D) e adição de nutrientes + biossurfactante (E) apresentaram variações importantes nos teores de COT. Quanto aos teores de N e P, apenas as caixas em que houve adição de nutrientes apresentaram diferenças significativas quando comparados os valores final e inicial.

Tabela 11. Médias dos valores das triplicatas de nitrogênio (N), fósforo (P) e carbono orgânico (COT), ao longo de 180 dias de experimento, com grau de significância de 5%, sendo A (controle de solo), B (controle de petróleo), C (adição de nutrientes), D (adição de biossurfactantes) e E (adição de biossurfactantes + nutrientes).

Caixa	Tempo do experimento (Dias)	N (%)	P (%)	COT (%)
A	0	0,024 ± 0,001	0,101 ± 0,006	0,274 ± 0,018
	30	0,025 ± 0,001	0,101 ± 0,003	0,277 ± 0,060
	60	0,023 ± 0,001	0,097 ± 0,006	0,180 ± 0,079
	90	0,019 ± 0,002	0,093 ± 0,003	0,174 ± 0,057
	120	0,025 ± 0,002	0,098 ± 0,003	0,235 ± 0,001
	150	0,025 ± 0,001	0,100 ± 0,001	0,234 ± 0,031
	180	0,024 ± 0,001	0,107 ± 0,006	0,222 ± 0,014
B	0	0,036 ± 0,001	0,246 ± 0,007	2,906 ± 0,021
	30	0,038 ± 0,001	0,214 ± 0,004	2,152 ± 0,022
	60	0,037 ± 0,001	0,208 ± 0,005	1,884 ± 0,038
	90	0,037 ± 0,002	0,206 ± 0,003	2,191 ± 0,048
	120	0,045 ± 0,001	0,209 ± 0,002	2,198 ± 0,038
	150	0,035 ± 0,002	0,233 ± 0,003	2,222 ± 0,041
	180	0,033 ± 0,001	0,224 ± 0,002	1,362 ± 0,061
C	0	0,070 ± 0,002	0,404 ± 0,010	1,620 ± 0,032
	30	0,056 ± 0,001	0,367 ± 0,004	1,517 ± 0,065
	60	0,051 ± 0,001	0,364 ± 0,006	1,464 ± 0,012
	90	0,052 ± 0,001	0,322 ± 0,009	1,633 ± 0,048
	120	0,054 ± 0,001	0,292 ± 0,015	1,681 ± 0,038
	150	0,056 ± 0,002	0,286 ± 0,004	1,127 ± 0,014
	180	0,042 ± 0,001	0,289 ± 0,007	0,483 ± 0,020
D	0	0,038 ± 0,002	0,242 ± 0,006	1,858 ± 0,154
	30	0,043 ± 0,001	0,228 ± 0,006	1,606 ± 0,068
	60	0,036 ± 0,002	0,229 ± 0,007	1,586 ± 0,117
	90	0,036 ± 0,001	0,220 ± 0,011	1,791 ± 0,060
	120	0,035 ± 0,001	0,211 ± 0,009	1,705 ± 0,004
	150	0,036 ± 0,001	0,228 ± 0,001	1,625 ± 0,078
	180	0,035 ± 0,001	0,239 ± 0,038	1,363 ± 0,143
E	0	0,065 ± 0,001	0,408 ± 0,005	1,633 ± 0,023
	30	0,066 ± 0,001	0,359 ± 0,005	1,241 ± 0,038
	60	0,058 ± 0,001	0,345 ± 0,006	0,937 ± 0,063
	90	0,059 ± 0,001	0,331 ± 0,005	1,304 ± 0,012
	120	0,055 ± 0,002	0,325 ± 0,004	1,298 ± 0,044
	150	0,055 ± 0,001	0,364 ± 0,004	1,459 ± 0,073
	180	0,058 ± 0,001	0,356 ± 0,007	1,123 ± 0,012

Para analisar melhor o comportamento dos nutrientes na Figura 8, são apresentados gráficos que mostram a variação dos teores de COT, N e P no período de seis meses de duração do experimento.

Como se pode verificar na Figura 8 (a), a caixa controle de solo (A) mantém-se praticamente sem alterações durante o período do experimento, não apresentando diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Com relação as caixas controle de petróleo (B), adição de nutrientes (C), adição de biossurfactantes (D) e adição de biossurfactantes + nutrientes (E) nota-se que após os 180 dias do experimento todas apresentaram queda, que segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foram significativas, porém a diferença mais acentuada ocorreu na caixa C (adição de nutrientes), em que houve uma redução de cerca de 70% do valor inicial. Nas demais caixas as reduções ficam entre 27-53%. Essa maior redução no teor de COT está fortemente associado ao incremento de nutrientes que foi feito nesta caixa, uma vez que a falta destes nutrientes serve como fator limitante para o consumo de carbono por parte dos microorganismos.

Já em relação a N e P (respectivamente Fig. 10 (b) e (c)), é possível observar que existe uma redução mais efetiva apenas nas caixas em que houve adição de nutrientes C (adição de nutrientes) e E (adição de nutrientes + biossurfactante), sendo estas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados os valores iniciais e finais destes nutrientes. Verifica-se também nestas caixas, um aumento do nº de bactérias, principalmente nos primeiros dias do experimento, decorrente deste maior consumo de nutrientes.

Nas outras caixas (A, B e D) mesmo com variações estas não foram significativas ( $p < 0,05$ ).

Este consumo de nutrientes observado nas caixas em que foi realizada a adição dos mesmos mostra mais uma vez, que as bactérias também necessitam destes elementos.

E desta forma conseguindo-se estabelecer uma boa relação C:N:P, melhor será o resultado de remoção dos poluentes.

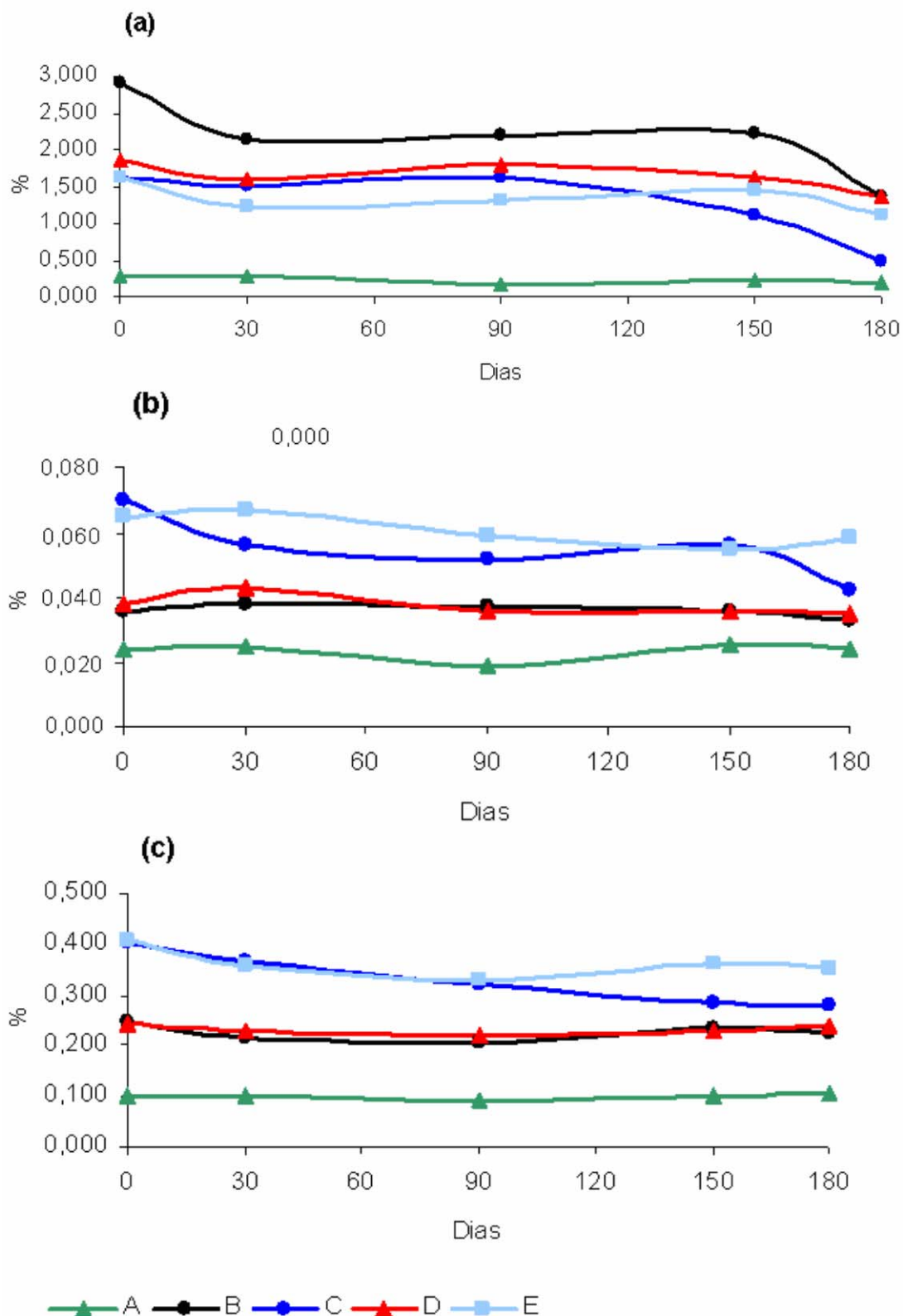


Figura 10. Teores de nutrientes no período de 6 meses de experimento, onde (a) carbono orgânico total, (b) nitrogênio total e (c) fósforo total para as caixas A (controle de solo), B (controle de petróleo), C (adição de nutrientes), D (adição de biosurfactantes) e E (adição de biosurfactantes + nutrientes).

### 4.3.3. Óleos e Graxas

Óleos e graxas é um termo utilizado para descrever uma grande família que inclui óleos, gorduras, ceras, e outros compostos, muitas vezes, alguns destes compostos derivados de petróleo.

Essas substâncias podem ser lançadas no ambiente por acidentes relacionados a derrames de petróleo, resíduos industriais entre outros, e quando entram em contato com partículas do solo se aderem às mesmas permanecendo por um longo período.

Podem ser extraídos de plantas ou matéria animal através de solventes orgânicos apolares ou de baixa polaridade, tais como clorofórmio, éter etílico, hexano, ou tolueno.

Como se observa na Figura 11, com relação à caixa controle de petróleo (B) houve uma redução mais efetiva no primeiro mês, em seguida tendendo a estabilidade. Esta caixa reproduz os processos de intemperização natural do petróleo, demonstrando que os processos iniciais, como a volatilização, tiveram a tendência de decréscimo, como as demais caixas, embora em valor menor, mas os demais processos de intemperização são mais difíceis de serem detectados no período analisado.

Já nos tratamentos propostos adição de nutrientes (C), adição de biossurfactantes (D) e adição de biossurfactantes + nutrientes (E) foi possível observar remoções mais efetivas quando comparados à caixa B (controle de petróleo), que não recebeu nenhum tratamento.

Os três tratamentos apresentaram comportamentos bastante semelhantes, contudo verifica-se que o tratamento em que houve adição apenas de nutrientes (caixa C) foi o que obteve maior porcentagem de remoção de contaminantes 90,4%, aproximando-se dos valores encontrados para a caixa controle de solo (A) que manteve-se sem grandes alterações durante o tempo estudado. Já os outros dois tratamentos adição de biossurfactante (caixa D) e adição de biossurfactante + nutrientes (caixa E) removeram respectivamente 58,1 e 78% dos contaminantes.

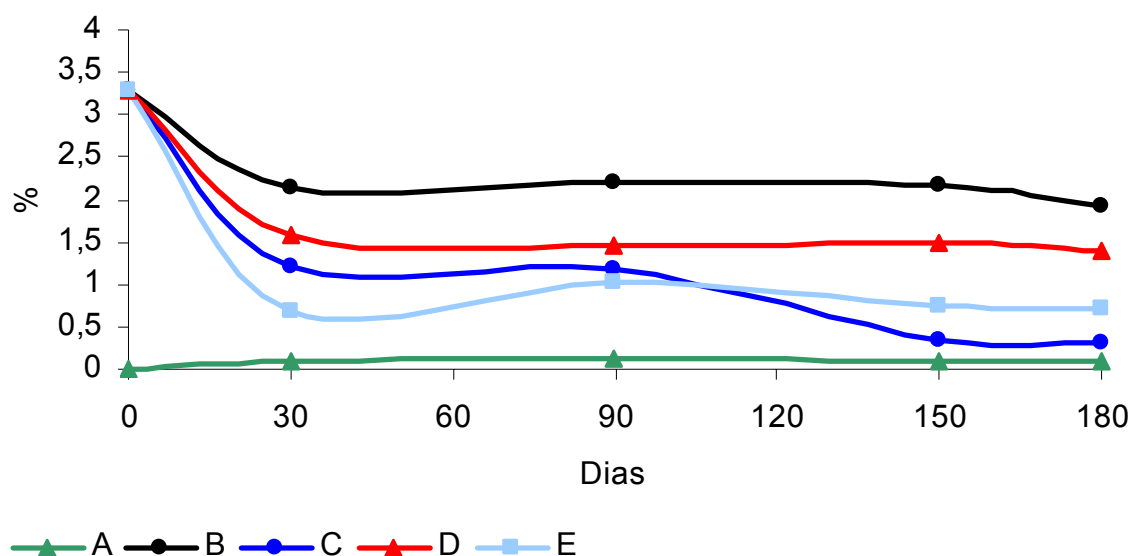


Figura 11. Remoção de OG no período de 6 meses de experimento para as caixas A (controle de solo), B (controle de petróleo), C (adição de nutrientes), D (adição de biossurfactantes) e E (adição de biossurfactantes + nutrientes).

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com os dados obtidos por SANJEET et al., 2001 que aplicou a técnica de biorremediação em dois locais contaminados com óleo. No processo de biorremediação ele utilizou um consórcio de bactérias e solução nutriente, onde obteve índices de remoção em torno de 91%, houve remoção de 94,2% dos alifáticos e de 91,9% de HPAs. Outro trabalho que apresenta resultados semelhantes é o de SALANITRO et al., 1997 que utilizou a técnica de bioestimulação em solo siltico (15% argila, 60% silte e 25% areia). Esse autor obteve uma remoção entre 75-90% para óleos leves (55°API), óleos médios (30°API) 65-70% e entre 10-50% para óleos pesados (14°API).

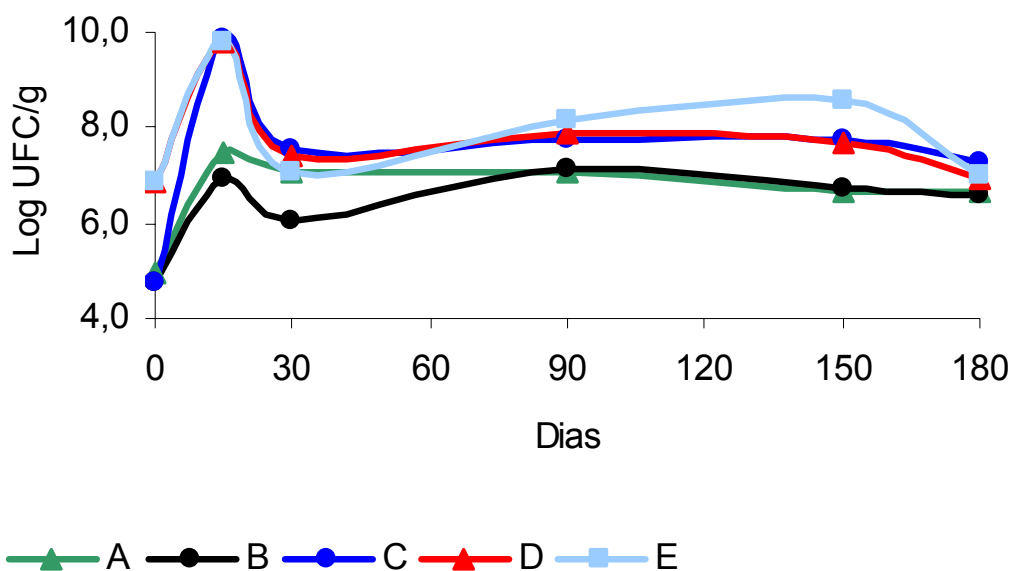
#### 4.3.4. Contagem de Bactérias e fungos

Os hidrocarbonetos de um ambiente contaminado geralmente são degradados por bactérias, havendo também a possibilidade de atuação de fungos. Entretanto a contribuição de cada um varia com os fatores ambientais e as propriedades físico-químicas do solo. Desta forma, consideram-se os fungos mais eficientes em condições adversas, como solos com valores extremos de pH, limitação de nutrientes e com baixo teor de umidade. Já as bactérias são



mais eficientes em condições opostas, ou seja, pH na faixa da neutralidade, boas condições de nutrientes e umidade (CUNHA, 1996).

(a)



(b)

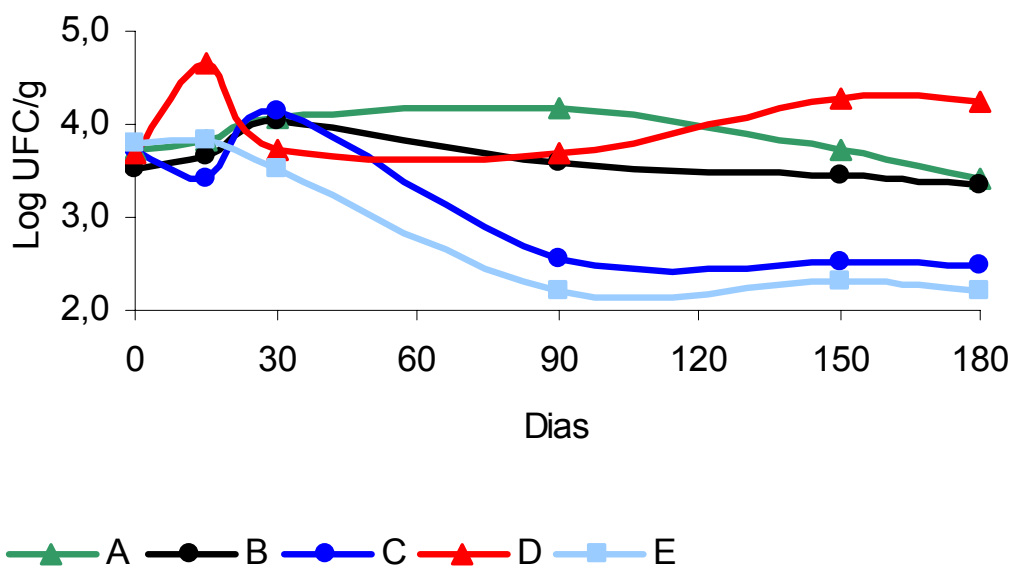


Figura 12. (a) Variação do número de bactérias mesófilas e (b) Variação do número de fungos ao longo de 180 dias de experimento para as caixas A (controle de solo), B (controle de petróleo), C (adição de nutrientes), D (adição de biossurfactantes) e E (adição de biossurfactantes + nutrientes)

A Figura 12 (a) mostra a contagem de bactérias e (b) a contagem de fungos no período de 6 meses do experimento. Observa-se nesta figura que existe um maior número de bactérias quando comparado aos fungos. Isso se deve provavelmente às condições experimentais que estavam ótimas para as bactérias (umidade entre 65 e 80%, pH neutro)

Nota-se que as caixas controle de solo (A), controle de petróleo (B) e adição de nutrientes (C) partem com um número menor de bactérias do que as caixas adição de biossurfactantes (D) e adição de biossurfactantes + nutrientes (E), isso está provavelmente relacionado a presença da *Pseudomonas aeruginosa* uma vez que foram detectadas colônias de coloração típica desta bactéria (verde metálico) provavelmente proveniente do biossurfactante utilizado que não foi esterilizado.

Nas caixas C, D e E, observou-se crescimento expressivo da população bacteriana nos primeiros 15 dias, atingindo níveis máximos de  $7,20 \times 10^9$ ;  $6,75 \times 10^9$  e  $6,60 \times 10^9$  UFC/g, respectivamente. Tais fatos podem ser explicados pela adição dos nutrientes e/ou biossurfactante (cujo extrato também contém nutrientes). A partir do 30º dia houve tendência à redução e estabilização da população bacteriana, pelo provável decréscimo dos nutrientes.

As oscilações observadas podem ser indicativas de mudança na biodiversidade da microbiota, com a predominância de organismos hidrocarbonoclasticos (BENTO et al., 2005).

Quanto aos fungos, não foram observadas grandes variações ao longo do experimento, obtendo-se apenas uma tendência à redução nas caixas C e E (ambas com nutrientes) e de aumento na caixa D ao final do processo. Foram observados com maior frequência a presença dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria*.

#### **4.3.5. Hidrocarbonetos Alifáticos e Poliaromáticos**

Os hidrocarbonetos alifáticos e os hidrocarbonetos aromáticos têm sido motivo de importantes estudos ambientais em todo mundo.

Em relação ao conjunto de compostos do petróleo, os hidrocarbonetos alifáticos não são considerados um grupo de elevada toxicidade, contudo são importantes indicativos da contaminação petrogênica. Os hidrocarbonetos

alifáticos investigados neste trabalho foram os n-alcenos (C12-C36) e os alcenos isoprenóides (pristano e fitano).

Os HPAs encontrados no petróleo são formados por moléculas de 2 a 6 anéis aromáticos, são poluentes orgânicos de importância ambiental e interesse toxicológico, pois muitos apresentam propriedades carcinogênicas e/ou mutagênicas para homens e animais (PEREIRA NETTO et al., 2000).

Estes compostos são emitidos por diversas fontes, naturais tais como os vulcões, ou antropogênicas como os derrames de petróleo, queima de combustíveis, resíduos industriais (LOPES e ANDRADE, 1996). Após a emissão, os HPAs que são lipofílicos, podem permanecer por um longo período no meio ambiente, distribuindo-se nos compartimentos ambientais em proporções que dependem de suas propriedades físico-químicas e das características de cada compartimento.

Neste trabalho, a identificação de alifáticos foi feita por cromatografia equipada com o detector de Ionização por Chama (FID – *Fire Ionized Detection*) e os HPAs por cromatografia equipada com o detector massas, sendo ambos relacionados com os tempos de retenção, obtidos pela análise de padrões externos com concentrações conhecidas. Contudo, na identificação dos HPAs ainda utilizou-se a comparação com os espectros da biblioteca de dados do equipamento.

Para uma melhor visualização e interpretação dos resultados, os teores de alifáticos e HPAs são apresentados em porcentagem em relação aos valores encontrados no primeiro dia de experimento, os quais foram considerados como 100%.

Como pode ser observado na Figura 13, não foram identificados para a caixa controle de solo (A) os hidrocarbonetos alifáticos mais pesados, ( $>C_{20}$ ), já os leves que foram identificados apresentaram variações do primeiro ao último dia de experimento. Com relação aos HPAs, pode-se notar a presença dos mais leves (2 e 3 anéis) além de fenantreno e criseno. Ao final do experimento apenas o criseno foi encontrado.

Cabe salientar que o solo utilizado nos experimentos foi retirado de uma região próxima ao distrito industrial da cidade de Rio Grande, assim como de uma rodovia, e desta forma está exposto a diversos tipos de contaminação,

sendo compreensível encontrar alguma contaminação de HPAs e alifáticos no solo utilizado.

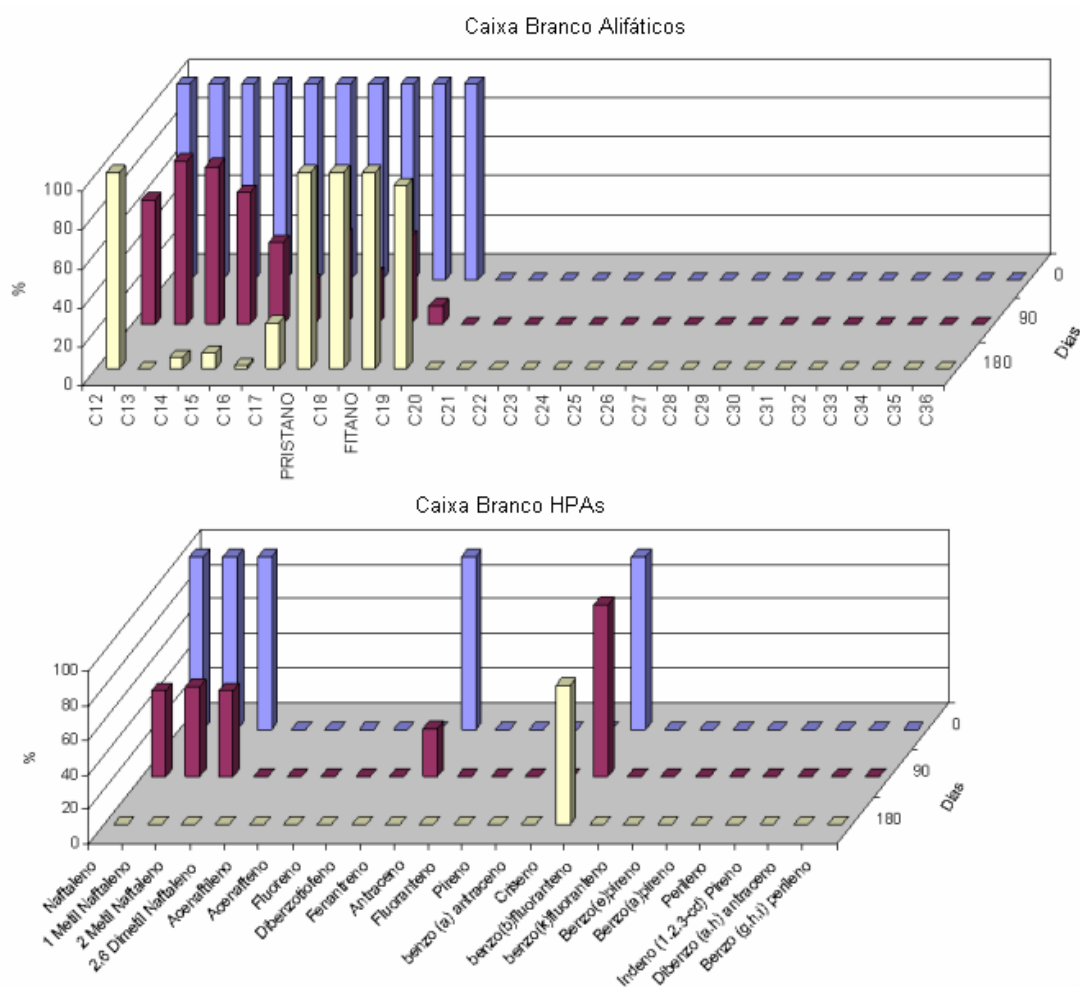


Figura 13. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa controle de solo (A) no período de 180 dias.

A Figura 14 mostra os resultados de hidrocarbonetos alifáticos para a caixa controle de petróleo (B), onde foi monitorada somente a degradação natural do petróleo. Nesse caso, observa-se uma redução mais efetiva nos últimos 90 dias do experimento, sendo que os hidrocarbonetos que mais decaíram foram os alifáticos leves. Este fato é provavelmente o resultado de uma melhor assimilação destes compostos leves por parte das bactérias nativas da região.

Para os HPAs é possível verificar que os mais leves, de 2 a 3 anéis, reduziram mais em relação aos HPAs pesados que tiveram uma redução menos efetiva.

Este processo de atenuação natural de um poluente orgânico do solo, ou seja, sem acréscimo de nutrientes ou adequação de qualquer condição ambiental, pode ocorrer de maneira contínua devido ao processo de adaptação natural da microbiota nativa do solo impactado.

Esses microrganismos passam, então, a utilizar o composto orgânico poluente como fonte de carbono, ocasionando assim uma redução da sua concentração ao longo do tempo (BAPTISTA e RIZZO, 2005).

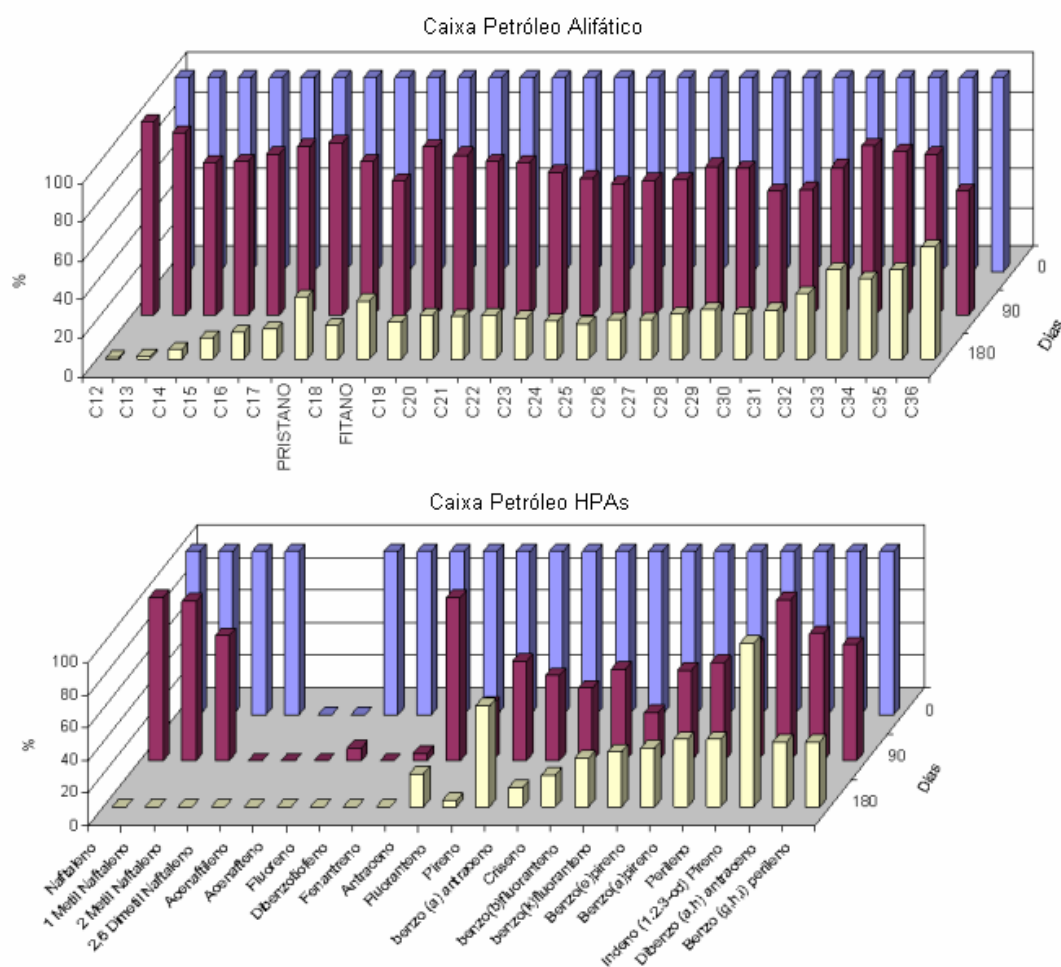


Figura 14. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa controle de petróleo (B) no período de 180 dias.

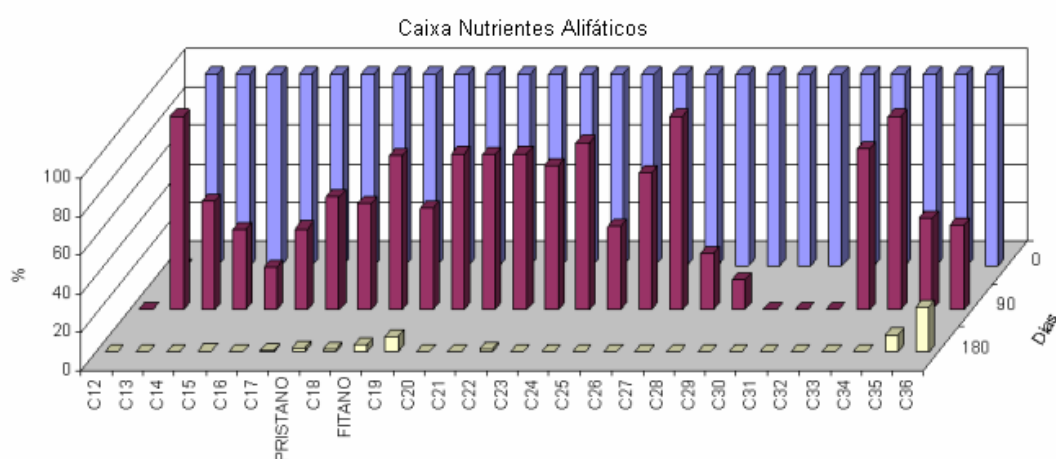
Segundo RAN XU et al., 2005 a presença de nutrientes aumenta significativamente a biodegradação de contaminantes de petróleo, principalmente os mais leves, entretanto a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos e nutrientes à microbiota nativa é crucial para o processo.

A Figura 15 mostra os resultados para a caixa adição de nutrientes (C). Nota-se um comportamento semelhante ao da caixa B (controle de petróleo) com uma degradação mais acentuada na parte final do experimento, porém com uma redução mais efetiva tanto para os hidrocarbonetos alifáticos quanto para os HPAs, apresentando uma remoção de 96,82% de alifáticos e de 83,6% para os HPAs.

Observa-se também que este tratamento foi o que apresentou melhores taxas de remoção para os HPAs pesados, de 4 a 6 anéis, reduzindo seus teores em 71,6% como pode ser visto na Tabela 13.

GOGOI et al., 2003 utilizando uma técnica de biorremediação em solo contaminado com petróleo em Borhola na Índia, com suplementação de nutrientes e microorganismos obteve uma remoção acima de 75% dos contaminantes. Este resultado está bem próximo ao encontrado por VASUDEVAN e RAJARAM, 2001 que no período de 90 dias conseguiu uma remoção de 76%.

Contudo, a adição de nutrientes deve ser feita com cautela, pois segundo AYOTAMUNO et al., 2006 que testou concentrações de fertilizante (N,P,K - 20:10:10) em solo com baixo teor de areia, concluiu que a melhor taxa de remoção (95%) foi obtida com a menor quantidade de fertilizante, enquanto que com uma adição quatro vezes maior de fertilizante a remoção caiu para 50% durante um período de seis semanas.



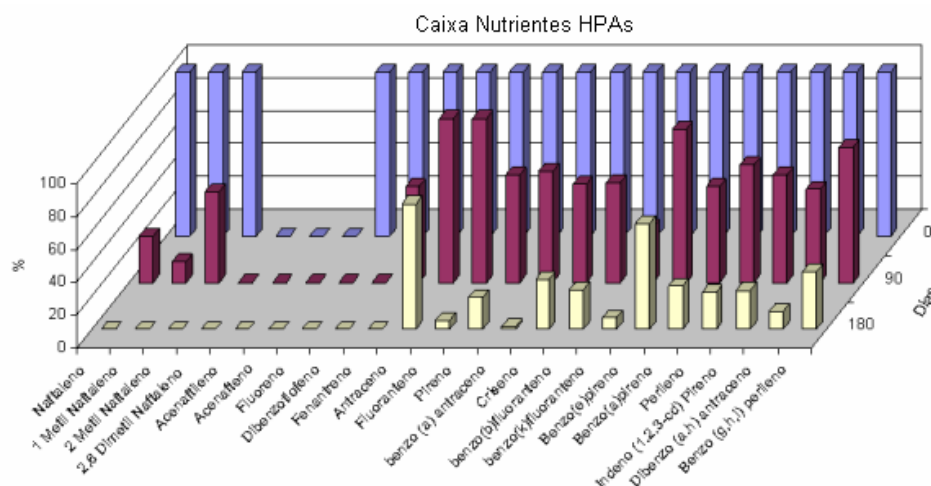


Figura 15. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa adição de nutrientes (C) no período de 180 dias.

Observando os resultados obtidos na caixa adição de biossurfactante (D) (Figura 16), nota-se que também houve redução para os alifáticos (55,4%). Porém a redução foi mais acentuada na primeira metade do experimento chegando ao final com uma maior remoção dos leves.

Com relação aos HPAs, verifica-se que houve uma boa remoção no final dos 180 dias de experimento, alcançando 61,85% de degradação do somatório dos HPAs, porém a fração dos HPAs pesados manteve-se com valores elevados.

MORAN et al., 2000 estudou a degradação de borras oleosas em ensaios feitos com a adição de um biossurfactante (surfactin) e observou que a degradação foi melhor na presença do biossurfactante em conjunto com o inóculo da microbiota nativa.

No estudo da utilização do biossurfactante JBR 215 (15% concentrado de ramnolipídeos), SANTOS e MILLIOLI, 2005 verificaram um bom percentual de biodegradação (19,8%) em 42 dias, confirmando o aumento da disponibilidade dos hidrocarbonetos para ação dos microrganismos.

Estes índices não foram maiores provavelmente, pela presença de compostos recalcitrantes no óleo cru.

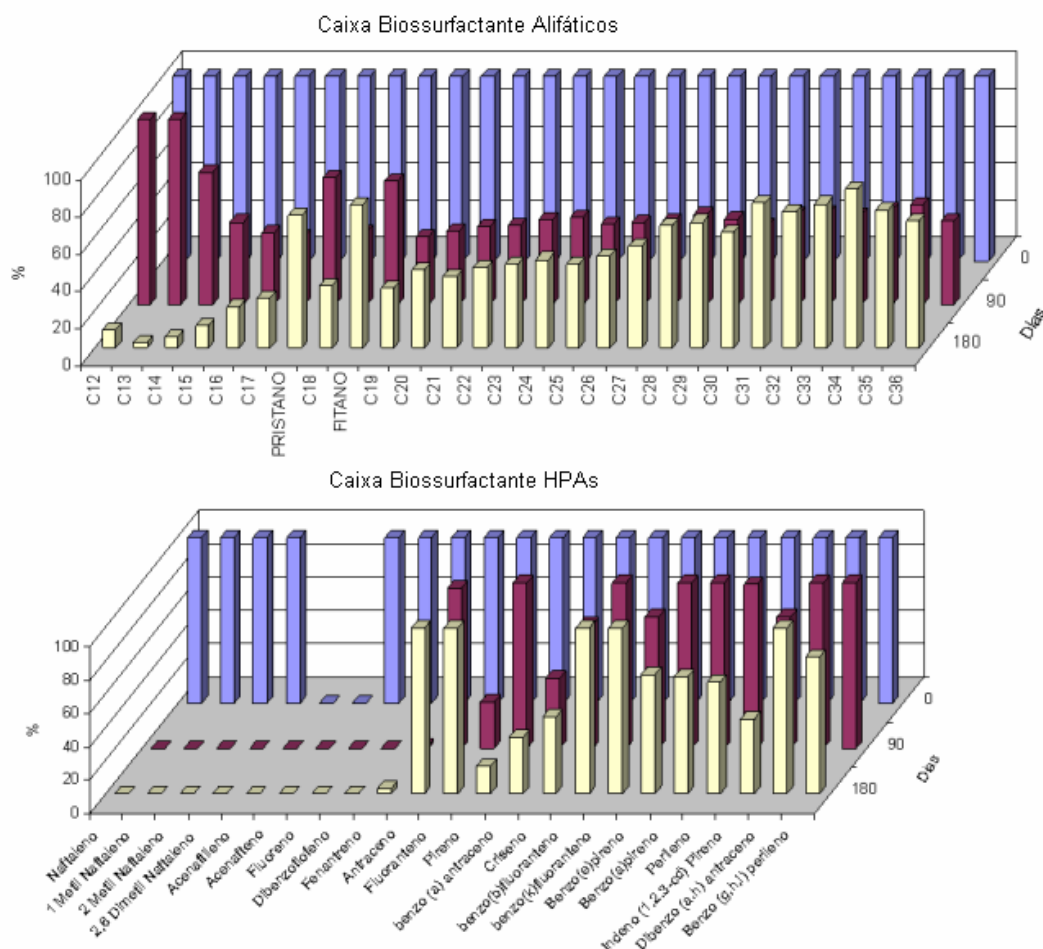


Figura 16. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa adição de biossurfactante (D) no período de 180 dias.

A Figura 17 apresenta os dados da caixa adição de nutriente + biossurfactante (E) em que se observa uma ótima remoção de alifáticos nos primeiros 90 dias (98,35%) alcançando valores próximos a zero já neste período.

Quanto aos HPAs também houve remoção quase total dos leves (94,74%) e alguns pesados como pireno e criseno. O restante dos HPAs pesados mesmo tendo boas remoções não foram tão eficientes quanto a remoção dos leves.



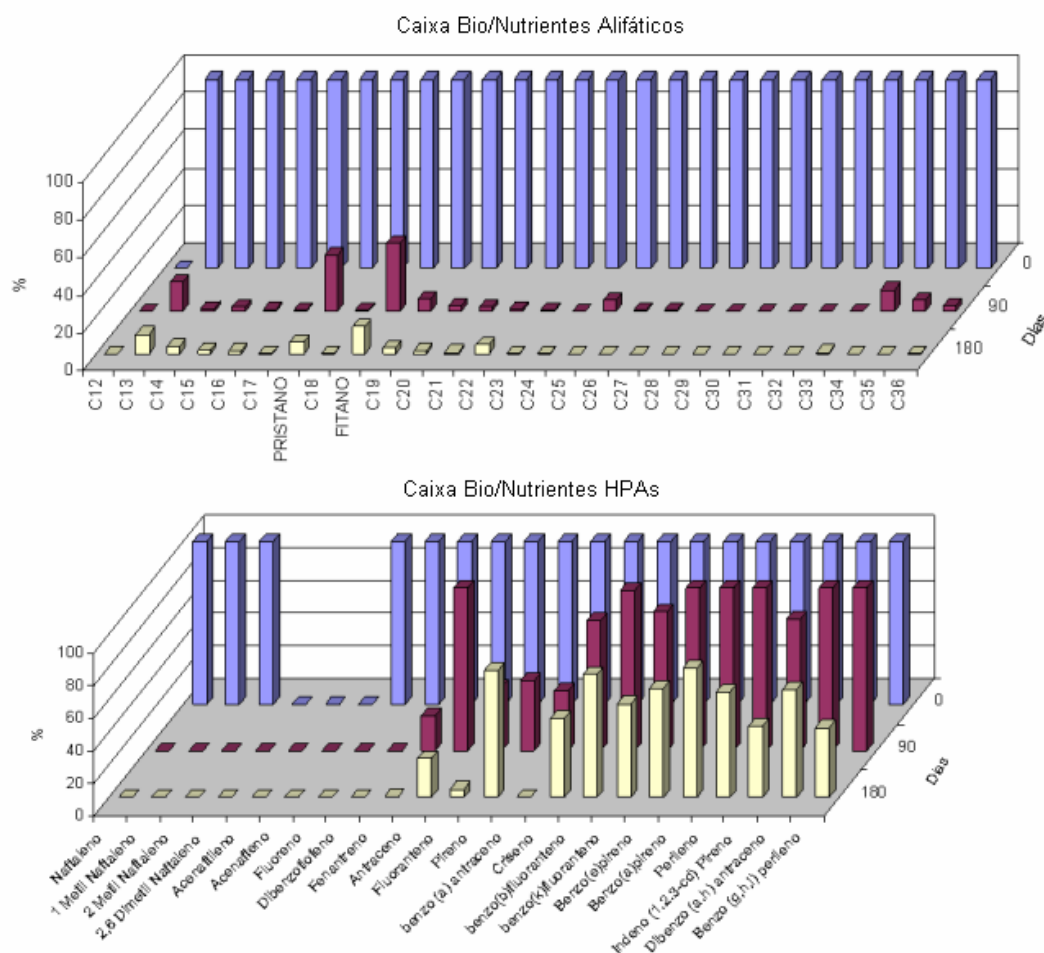


Figura 17. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa adição de nutrientes + biossurfactante (E) no período de 180 dias.

Ao final dos 180 dias de experimento, observam-se melhores resultados de remoção para os hidrocarbonetos alifáticos nos tratamentos C (adição de nutrientes) e E (adição de nutrientes + biossurfactante), como pode ser observado na Tabelas 13, corroborando com os resultados obtidos pela análise de OG. Vale ressaltar que nestas caixas houve a adição de nutrientes.

Tabela 13. Remoção de Hidrocarbonetos Alifáticos para as caixas em que houve tratamento de bioestimulação.

Treatment	Alifáticos ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ )	% Remoção	
C	0	229,39	
	90	149,75	96,82
	180	7,29	
D	0	1418,48	
	90	658,24	55,4
	180	632,68	
E	0	1492,8	
	90	67,55	98,35
	180	24,65	

Com relação as taxas de remoção observou-se taxas maiores para os HPAs mais leves, enquanto os mais pesados mesmo tendo uma redução, esta foi em menor intensidade.

Os dados de remoção do somatório de HPAs encontrados neste trabalho são apresentados na Tabela 14, onde é possível observar boa remoção para os HPAs leves nos três tratamentos C, D e E (95,8, 81,91 e 94,7%). Quanto aos HPAs pesados o tratamento que melhor respondeu foi o C, com 71,6% seguido pelos tratamentos E e D com 49,9 e 41,9% respectivamente.

Tabela 14. Remoção de HPAs para as caixas em que houve tratamento.

Tratamento		$\Sigma$ 2-3 Anéis ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ )	% Remoção	$\Sigma$ 4-6 Anéis ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ )	% Remoção
C	0	3,038	95,753	0,639	71,552
	90	1,343		0,420	
	180	0,129		0,182	
D	0	2,383	81,91	1,351	41,78
	90	0,148		1,241	
	180	12,547		0,786	
E	0	7,057	94,742	1,202	49,873
	90	2,741		1,024	
	180	0,371		0,603	

Comparando as figuras 14, 15 e 16 verifica-se que os tratamentos respondem diferentemente à redução de determinados hidrocarbonetos aromáticos, como é o caso do benzo(a) antraceno que praticamente desaparece para os tratamentos C e E, mas ainda é detectado no tratamento D, diferentemente do pireno, que foi bastante reduzido nos tratamentos C e D, mas ainda é bastante significativo no tratamento E. Provavelmente, os diferentes tratamentos oportunizaram crescimento de distintas cepas de bactérias, com características de degradação peculiares, sugerindo estudos futuros mais aprofundados, de isolamento de espécies degradadoras promissoras.

#### 4.3.6. Caracterização geral do experimento

A partir dos dados encontrados para todas as variáveis de estudo aplicou-se a Análise de Componentes Principais (*Principal Components Analysis* - PCA), que consiste em uma técnica cujo objetivo principal é reduzir as dimensões do sistema, restringindo o número de variáveis. O número

máximo de fatores possíveis para uma análise, corresponde ao número total de variáveis, o PCA determina um número mínimo de fatores necessários para explicar o máximo de variância do conjunto original dos dados. De acordo com MANLY, 1994 os passos de uma PCA podem ser resumidamente demonstrados em poucas etapas (Figura 18).

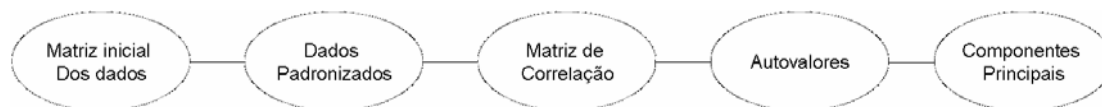


Figura 18. Diagrama indicando as principais etapas de uma Análise de Componentes Principais (PCA).

Com a preocupação de se efetuar um exame simplificado e global do conjunto dos dados produzidos no experimento, foi aplicada a análise de componentes principais (PCA) com base na matriz de correlação das variáveis (R-mode).

Para essa análise foi escolhido o conjunto completo de parâmetros medidos de todos os experimentos ( $n=15$ ), retirando-se desse conjunto os valores referentes ao experimento do branco ( $n=3$ ). Foi empregada uma PCA de onde foram selecionados 3 fatores, com base na porcentagem total de variância característica dessa componente principal. Optou-se por eliminar os fatores que possuíam valores menores do que 5 % do total de variância, tendo em vista possuírem pequena capacidade de explicação das variáveis. Como base nessa medida prática foram selecionados 3 fatores (componentes principais) respectivamente com variâncias de 64,3 % (fator 1), 10,5 % (fator 2) e 7,8% (fator 3).

Com base nas coordenadas das variáveis, verifica-se que o fator 1 é formado (pólo negativo) pela fração alifática (C12 a C35), Pristano, COT, e a maior parte da fração aromática (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fenantreno, pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(g,h,i)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno). Os HPAs fluoranteno e dibenzo(a,h)antaceno participam com maior intensidade na construção dos outros fatores. Verifica-se que este fator 1 é constituído pelos parâmetros que sofrem uma redução de seus valores provocados pelos processos de degradação induzida ou não induzida.

O fator 2, por sua vez, é formado pelo nitrogênio total (N), fósforo total (P), porosidade (POR), potencial hidrogeniônico (pH), naftaleno (NAF), 1-metil-naftaleno, 2-metil-naftaleno e fluoranteno. Embora o fluoranteno integre este fator, ele também participa com valor elevado para a construção do fator 1. Este fator reúne espécies da fração aromática de menor peso molecular especialmente as espécies metiladas do naftaleno e os parâmetros direta ou indiretamente relacionados com a adição de nutrientes.

O comportamento diferenciado de N e P é resultante do fato destes elementos terem sido adicionados em apenas dois experimentos, no tratamento C em que houve apenas adição de nutrientes e no tratamento E que os nutrientes foram adicionados juntamente com o biossurfactante.

As espécies metiladas de naftaleno se comportam de uma forma diferenciada, tanto dos outros HPAs como dos Alifáticos, isto se deve provavelmente a estes compostos terem sido formados pela biodegradação da fração aromática relativamente leve.

O sinal contrário do pH indicando um comportamento contrário aos demais parâmetros deste fator foi provavelmente produzido pela adição de nutrientes com caráter alcalino.

Já o fator 3 é constituído por fitano e C36 com coordenadas positivas, juntamente com o número de bactérias e o dibenzo(ah)antraceno com coordenadas negativas. Apesar do dibenzo(ah)antraceno e do C36 fazerem parte deste fator, eles também possuem valores elevados e mesmo sinal para a constituição do fator 1.

Deve-se destacar que este fator tem pequena importância, visto que todos os parâmetros que o integram possuem valores relativamente baixos, explicando somente 7,8% da variância total do conjunto de amostras.

Por esta razão apresentaremos apenas a representação gráfica dos eixos formados pelos fatores 1 e 2 (Figura 19).

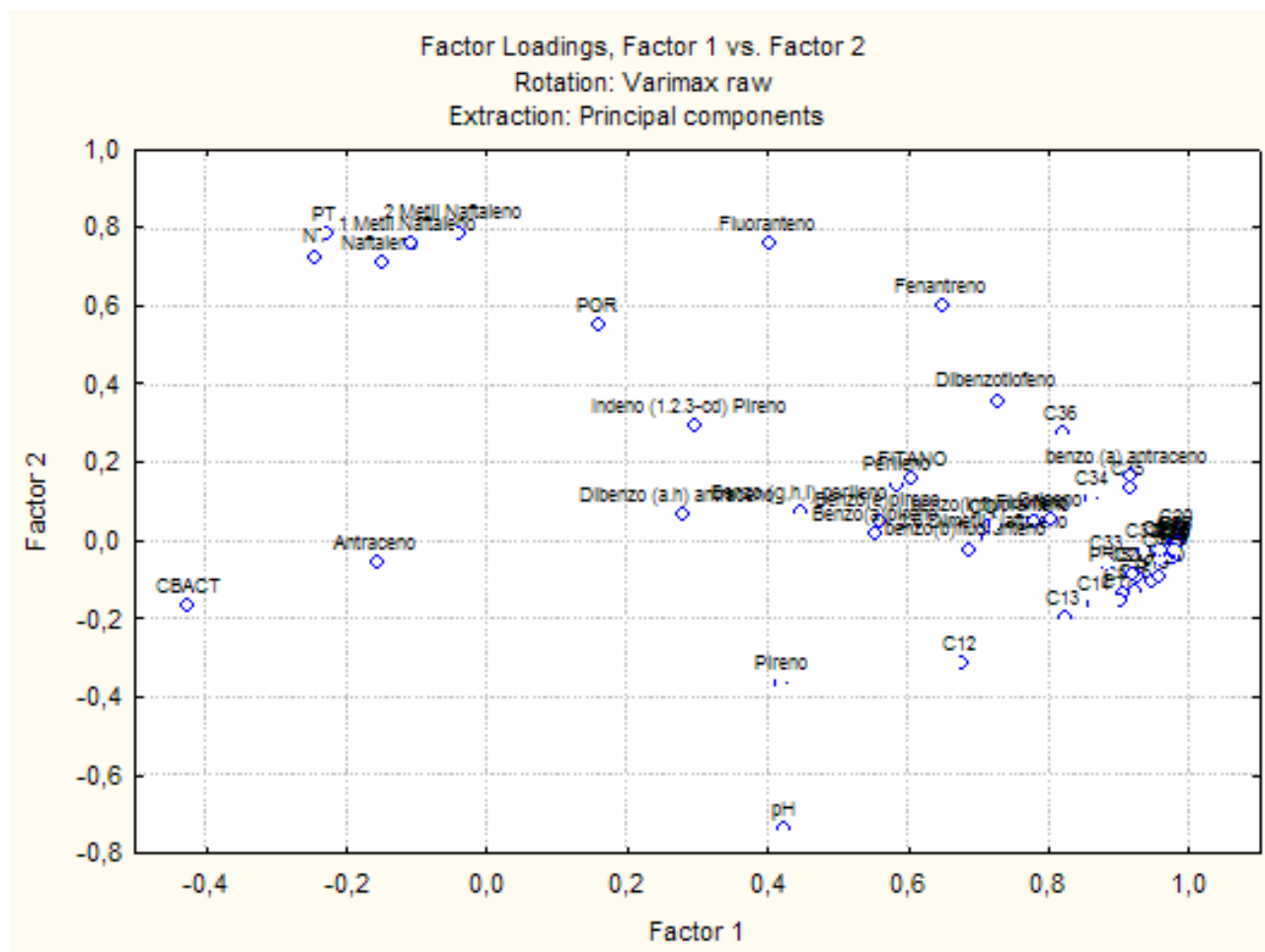


Figura 19. Caracterização geral do experimento por uma Análise de Componentes Principais (PCA).

Na figura representativa dos fatores 1 e 2 verifica-se que as bactérias e nutrientes estão no hemisfério negativo, enquanto que a fração aromática e alifática situa-se na região mais afastada deste hemisfério. Este quadro estatístico representa em linhas gerais o processo de crescimento das bactérias juntamente com um consumo de nutrientes e a degradação da fração aromática e alifática.

#### 4.4. EXPERIMENTO II

Durante a contagem de bactérias do Experimento I foi verificada a existência de colônias de cor característica da *Pseudomonas*, colocando em dúvida a eficiência do processo de degradação por microorganismos nativos, uma vez que esta bactéria pode ter sido introduzida pela adição do biossurfactante e desta forma estaria atuando na degradação do petróleo.

Julgou-se conveniente realizar um novo experimento (Experimento II) comparando a utilização de um biossurfactante estéril e outro não estéril, com o objetivo de verificar a eficiência do biossurfactante na degradação dos hidrocarbonetos de petróleo e garantir pela esterilização a não introdução no ambiente de microrganismos não nativos.

#### 4.4.1. Análise Geral

Os resultados encontrados para os nutrientes são apresentados em valores médios com seus respectivos desvios padrões na Tabela 15, e também na Figura 19 onde (a) refere-se a carbono orgânico total (COT), (b) para nitrogênio total (N) e (c) para fósforo total (P).

Tabela 15. Médias dos valores das triplicatas de nitrogênio (N), fósforo (P) e carbono orgânico (COT), ao longo de 180 dias de experimento com grau de significância de 5%, sendo F (controle de solo), G (controle de petróleo), H (adição de biossurfactante/nutrientes) e I (biossurfactante estéril/nutrientes).

Caixa		N (%)	P (%)	COT (%)
F	0	0,046 ± 0,001	0,084 ± 0,002	0,070 ± 0,011
	3	0,044 ± 0,001	0,084 ± 0,002	0,063 ± 0,058
	8	0,044 ± 0,002	0,088 ± 0,003	0,065 ± 0,019
	30	0,043 ± 0,001	0,093 ± 0,002	0,060 ± 0,018
	90	0,041 ± 0,001	0,094 ± 0,003	0,063 ± 0,033
	180	0,037 ± 0,001	0,090 ± 0,003	0,063 ± 0,021
G	0	0,051 ± 0,002	0,108 ± 0,004	3,096 ± 0,027
	3	0,042 ± 0,002	0,093 ± 0,002	3,182 ± 0,035
	8	0,046 ± 0,001	0,088 ± 0,002	3,181 ± 0,100
	30	0,038 ± 0,002	0,099 ± 0,003	2,697 ± 0,081
	90	0,039 ± 0,001	0,100 ± 0,004	2,786 ± 0,027
	180	0,040 ± 0,001	0,109 ± 0,002	2,762 ± 0,059
H	0	0,046 ± 0,001	0,102 ± 0,006	3,001 ± 0,075
	3	0,139 ± 0,003	0,579 ± 0,009	2,824 ± 0,072
	8	0,138 ± 0,002	0,551 ± 0,008	3,159 ± 0,073
	30	0,139 ± 0,001	0,547 ± 0,001	2,712 ± 0,029
	90	0,126 ± 0,003	0,538 ± 0,006	2,523 ± 0,027
	180	0,099 ± 0,002	0,518 ± 0,003	2,318 ± 0,067
I	0	0,045 ± 0,001	0,106 ± 0,005	3,021 ± 0,024
	3	0,159 ± 0,003	0,590 ± 0,009	3,004 ± 0,015
	8	0,157 ± 0,003	0,572 ± 0,010	3,142 ± 0,144
	30	0,164 ± 0,001	0,533 ± 0,005	2,887 ± 0,146
	90	0,152 ± 0,001	0,533 ± 0,013	2,610 ± 0,197
	180	0,113 ± 0,001	0,494 ± 0,015	2,403 ± 0,032

Como citado no Experimento I, a umidade oscilou entre 65 e 80% da capacidade de campo como recomendado por SARKAR et al., 2005, a temperatura variou entre 8 e 32°C (Tabela 16), sendo que na maior parte do tempo ficou entre 20 e 25°C.

Tabela 16. Variação da temperatura ambiente do laboratório ao longo do tempo.

Mês	Mínima	Máxima
Junho	8	27
Julho	10	25
Agosto	8	25
Setembro	8	25
Outubro	14	31
Novembro	14	31
Dezembro	22	32

O comportamento COT (Fig. 20 (a)) nas caixas de controle de petróleo (G), biossurfactante/nutrientes (H) e biossurfactante estéril/nutrientes (I) é bem similar até o trigésimo dia de experimento. A partir desta data os teores de COT se mantiveram estáveis na caixa G enquanto nas caixas H e I continuaram a diminuir até o fim do experimento apresentando uma redução de 22,84 e 20,51% respectivamente. Ao comparar-se os valores finais e iniciais destas três caixas (G, H e I) verificam-se diferenças significativas em todas. As quedas observadas nos teores de COT após os 30 dias nas caixas H e I, está relacionada com o incremento de N e P feita nas mesmas.

Na caixa do controle de solo (A), os teores se mantiveram estáveis ao longo dos 6 meses.

Tendo em vista que a adição de biossurfactante foi realizada apenas 24h após o derrame, visando uma melhor comparação com o ambiente real uma vez que as medidas de remediação nunca são realizadas imediatamente após o derrame, verifica-se que os teores de N e P (Fig 20 (b) e (c)) se elevaram nas caixas biossurfactante/nutrientes (H) e biossurfactante estéril/nutrientes (I) no início do experimento. A partir deste ponto há um decréscimo significativo em ambas as caixas até o final dos 6 meses. As caixas controle de solo (F) e controle de petróleo (G), não mostraram diferenças expressivas no comportamento dos teores destes nutrientes durante o período de estudo.

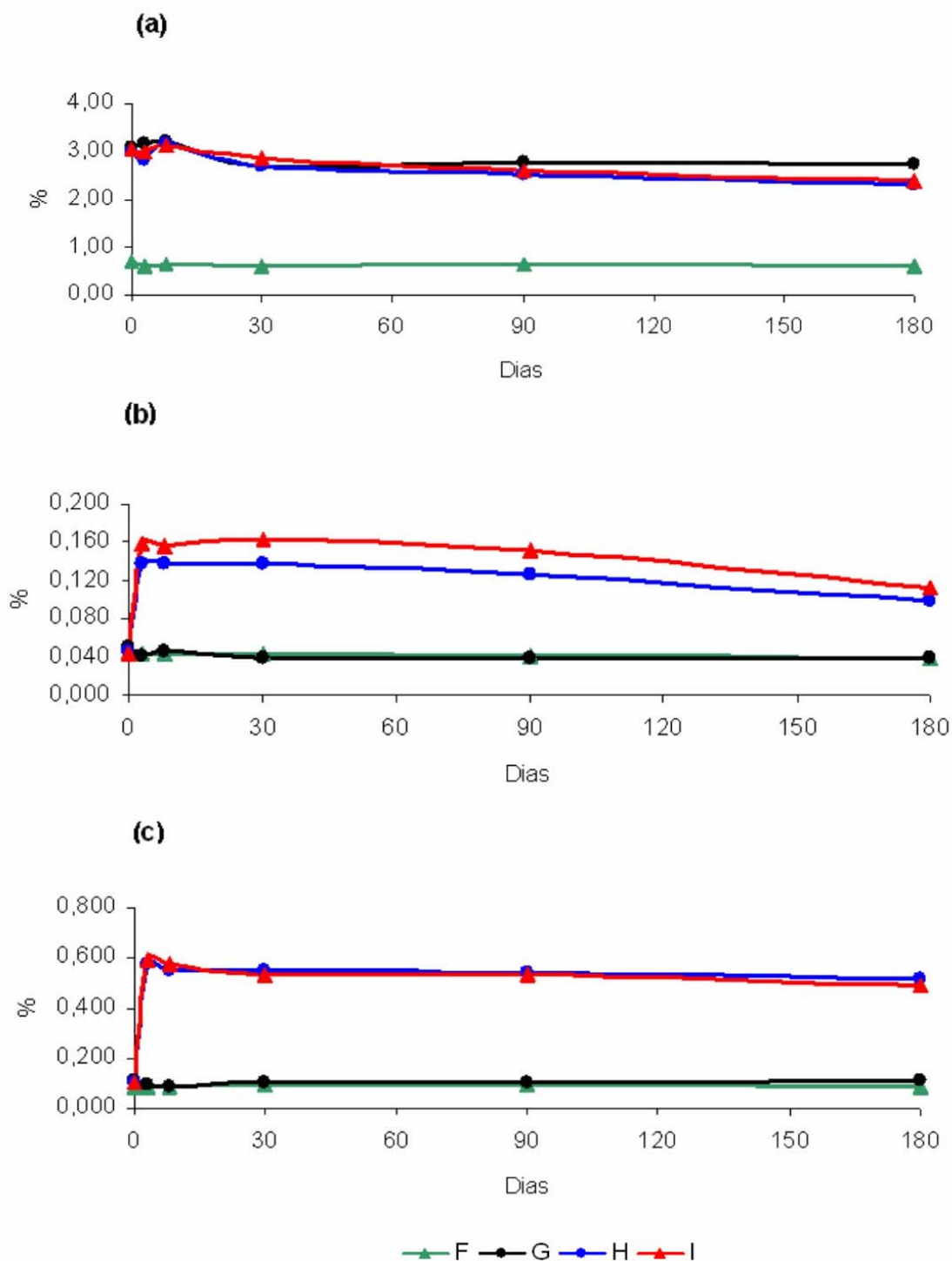


Figura 20. Teores de nutrientes no período de 6 meses de experimento, onde (a) carbono orgânico total, (b) nitrogênio total e (c) fósforo total para as caixas F (controle de solo), G (controle de petróleo), H (adição de biosurfactante/nutrientes) e I (biosurfactante estéril/nutrientes).

O pH neste segundo experimento também ficou em uma faixa considerada boa para o crescimento microbiano, entre 6,5 e 8,5 como pode ser observado na Figura 21.



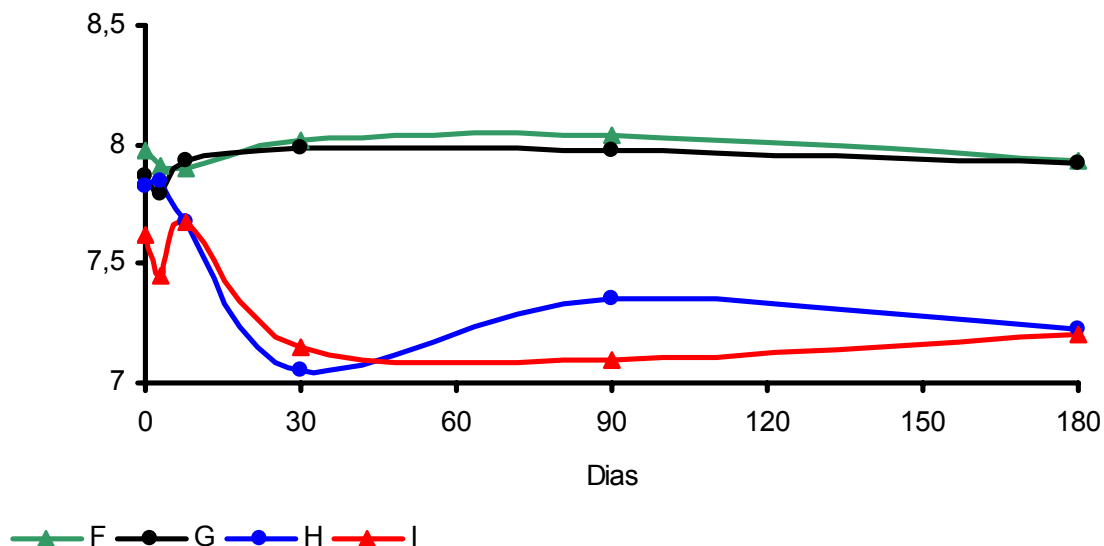


Figura 21. Valores de pH no decorrer do tempo de experimento para as caixas F (controle de solo), G (controle de petróleo), H (adição de biossurfactante/nutrientes) e I (biossurfactante estéril/nutrientes).

Quanto a óleos e graxas, como pode ser observado na Figura 22 na caixa controle de petróleo (G) teve uma pequena redução, chegando a 20,96%, enquanto nas caixas biossurfactante/nutrientes (H) e biossurfactante estéril/nutrientes (I) que tiveram comportamentos muito parecidos, esta redução foi mais efetiva alcançando índices de 63,03 e 59,91% respectivamente.

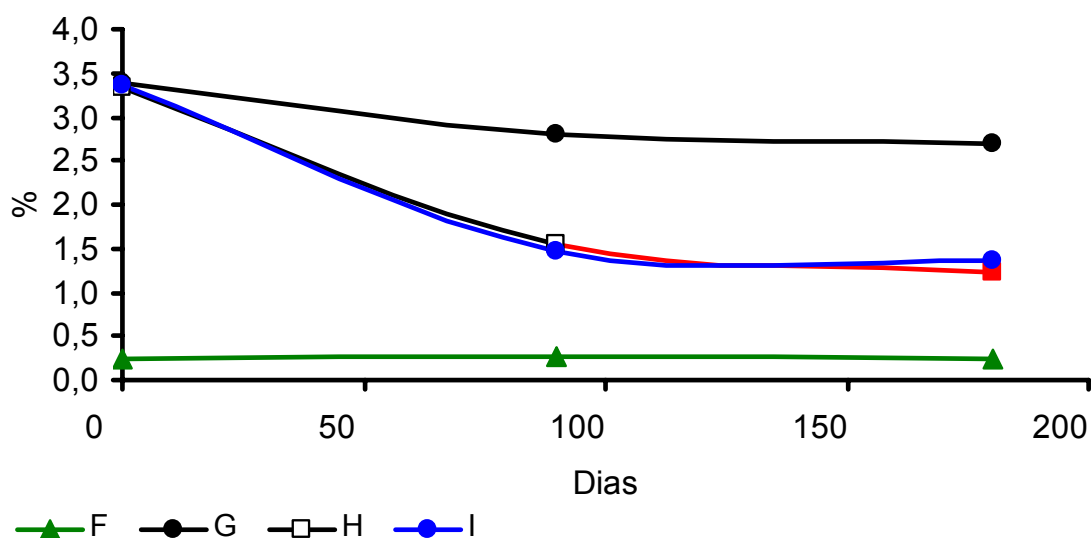


Figura 22. Remoção de OG no período de 6 meses de experimento para as caixas F (controle de solo), G (controle de petróleo), H (adição de biossurfactante/nutrientes) e I (biossurfactante estéril/nutrientes).

Em relação ao comportamento microbiológico, a Figura 23 (a) mostra a contagem de bactérias e (b) a contagem de fungos no período de 6 meses de experimento. Quanto às bactérias, verifica-se que diferentemente do experimento I, no início do experimento existe praticamente o mesmo número de colônias em todas as caixas, havendo uma elevação deste número nos primeiros dias. Porém no decorrer do tempo o número de colônias decai para as caixas de controle de solo (F) e controle de petróleo (G) enquanto para as caixas biossurfactante/nutrientes (H) e biossurfactante estéril/nutrientes (I) eles continuam altos. Na caixa I verifica-se uma maior regularidade do número de colônias ao longo do tempo.

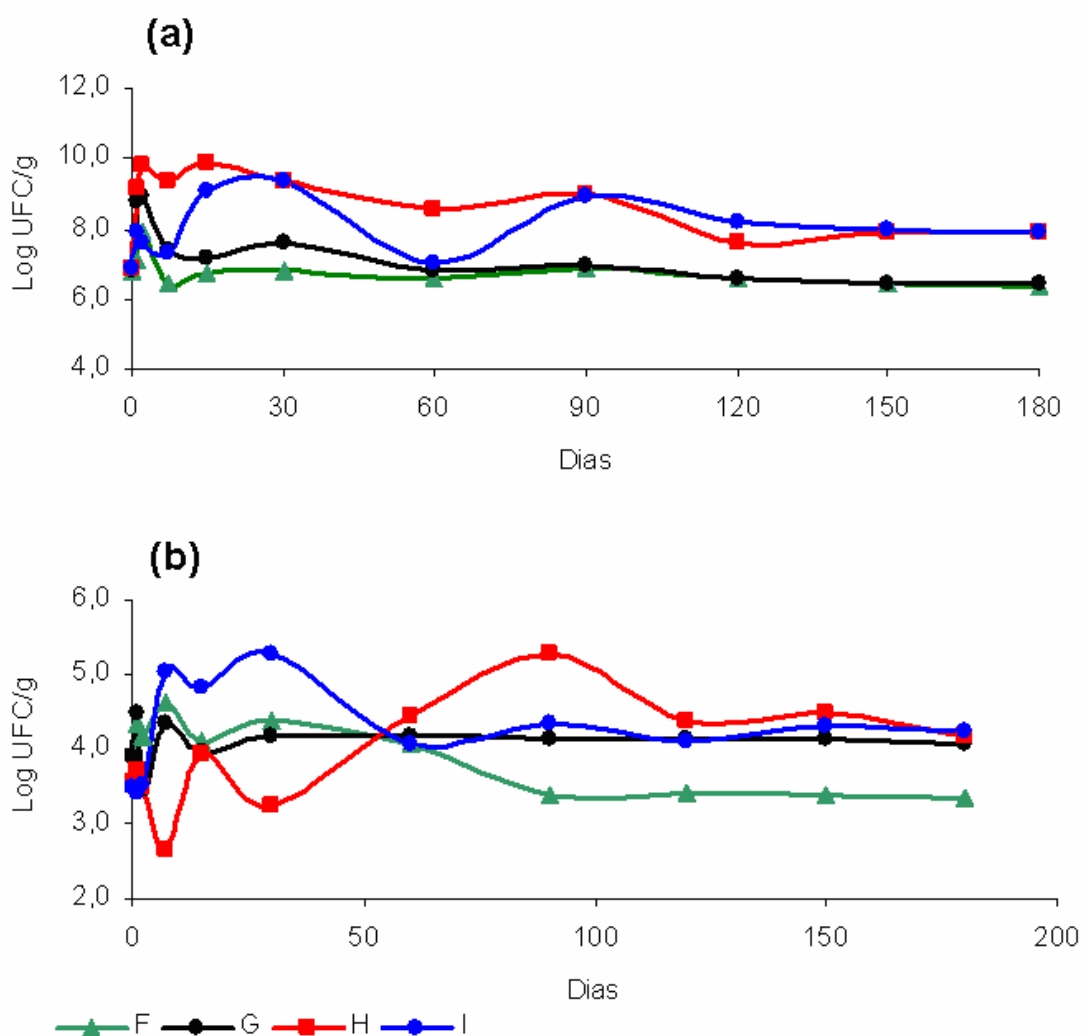


Figura 23. (a) Variação do número de bactérias mesófilas e (b) Variação do número de fungos ao longo de 180 dias de experimento. para as caixas F (controle de solo), G (controle de petróleo), H (adição de biossurfactante/nutrientes) e I (biossurfactante estéril/nutrientes).

Nas caixas biossurfactante/nutrientes (H) e biossurfactante estéril/nutrientes (I) nota-se um bom crescimento da população bacteriana ao fim do primeiro mês, atingindo níveis máximos de  $7,8 \times 10^9$  e  $2,38 \times 10^9$  respectivamente. A partir deste ponto, o número de colônias foi decrescendo lentamente até o fim do experimento para a caixa I, enquanto na caixa H observou-se uma oscilação dos valores, porém no final dos 6 meses ambos estavam com valores bem próximos. Quanto aos fungos, foram observadas algumas variações ao longo do experimento, verificando-se uma tendência à redução na caixa I e um aumento na caixa H ao final do processo.

Como no Experimento I, neste experimento os teores de alifáticos e HPAs são apresentados em porcentagem em relação aos valores encontrados no primeiro dia de experimento, os quais foram considerados como 100%.

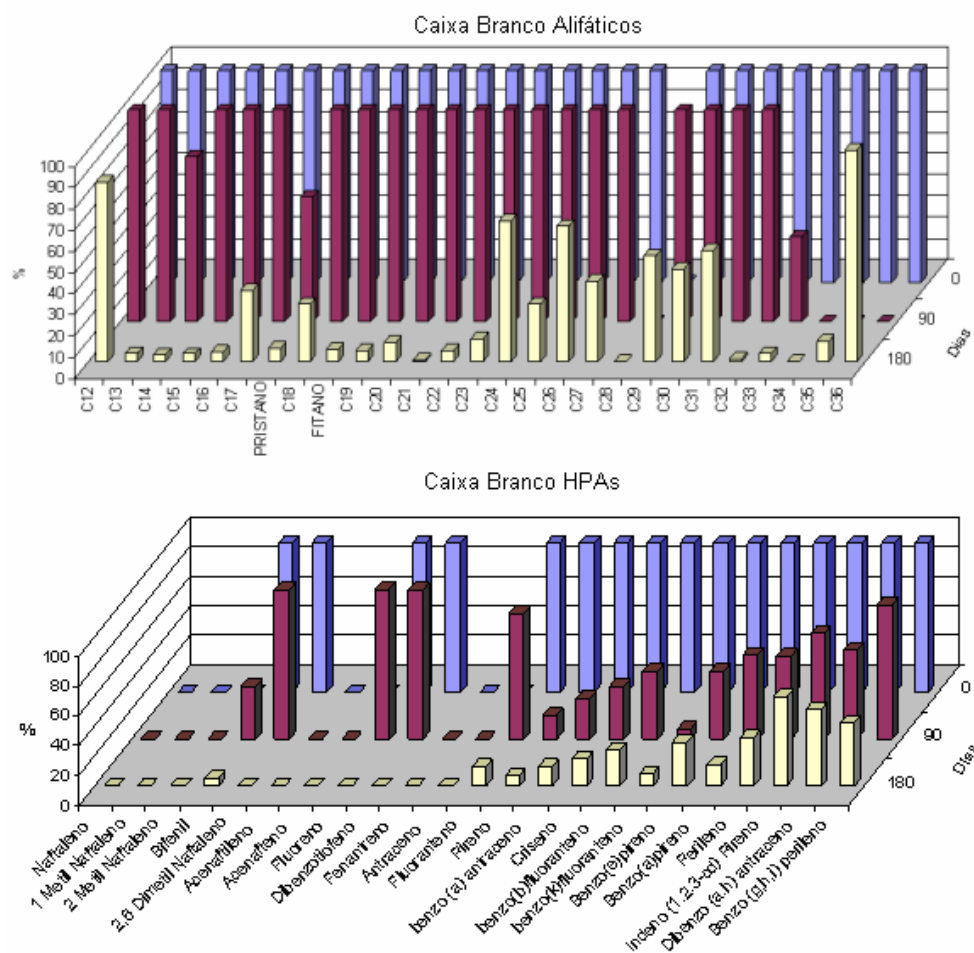


Figura 24. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa controle de solo (F) no período de 180 dias.

Como podem ser observados na Figura 24 (controle de solo), os alifáticos encontrados mesmo com valores baixos ( $\Sigma$  Alifáticos  $\cong 20 \mu\text{g. g}^{-1}$ ), se mantiveram por um tempo, decaindo no final do experimento ( $\Sigma$  Alifáticos  $\cong 8 \mu\text{g. g}^{-1}$ ), porém é importante ressaltar que este gráfico está em porcentagem, e para valores baixos qualquer decréscimo se torna expressivo.

Com relação aos HPAs, nota-se a presença dos mais pesados, (4 e 6 anéis) além de alguns leves, apresentando um decréscimo ao final dos 180 dias.

Os resultados encontrados para a caixa controle de petróleo (G) apresentados na Figura 25 mostram que o somatório dos alifáticos sofreram pequenas alterações ao final dos seis meses ( $\Sigma$  Alifáticos  $\cong 567$  para  $369 \mu\text{g. g}^{-1}$ ), reduzindo-os cerca de 35%. Já para os HPAs é possível notar ao final de 180 dias uma boa redução dos leves, enquanto os pesados se mantiveram com valores altos conforme dados apresentados na Tabela 17.

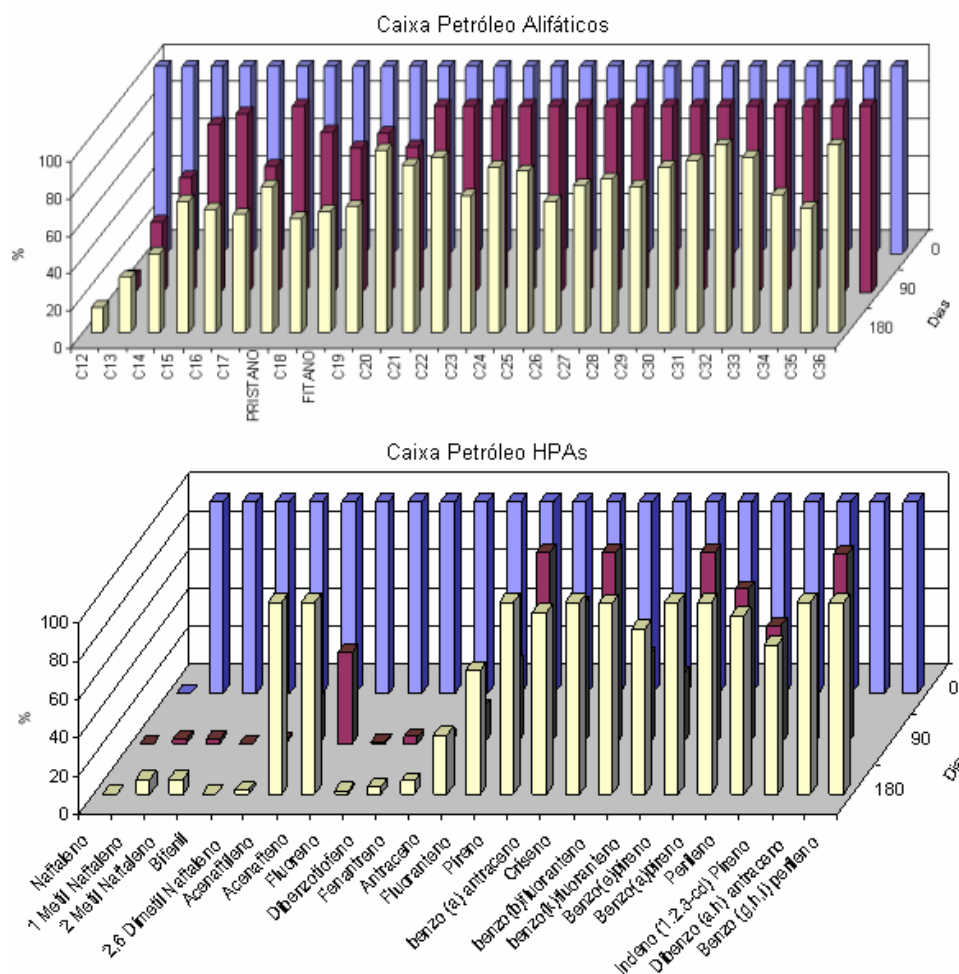


Figura 25. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa controle petróleo (G), no período de 180 dias.

Tabela 17. Remoção de HPAs para a caixa controle de petróleo (G), caixa biossurfactante/nutrientes (H) e biossurfactante estéril/nutrientes (I).

Tratamento		$\Sigma$ 2-3 Anéis ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ )	% Remoção	$\Sigma$ 4-6 Anéis ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ )	% Remoção
G	0	13,112		3,315	
	90	1,117	85,95	3,796	5,70
	180	1,842		3,126	
I	0	7,764		2,164	
	90	0,129	92,3	1,541	18,84
	180	0,598		1,757	
-	0	6,456		3,707	
	90	2,060	95,59	2,930	32,95
	180	0,284		2,486	

Na caixa biossurfactante/nutrientes (H), (Fig. 26) observa-se uma ótima redução dos alifáticos ( $\Sigma$  Alifáticos  $\cong$  660 para 30  $\mu\text{g. g}^{-1}$ ), representando um decréscimo de 95,5%. Com relação aos HPAs, também verifica-se uma boa redução ( $\Sigma$  HPAs  $\cong$  10 para 2,4  $\mu\text{g. g}^{-1}$ ), porém esta é muito mais efetiva para os leves, tal como verificado na Tabela 15.

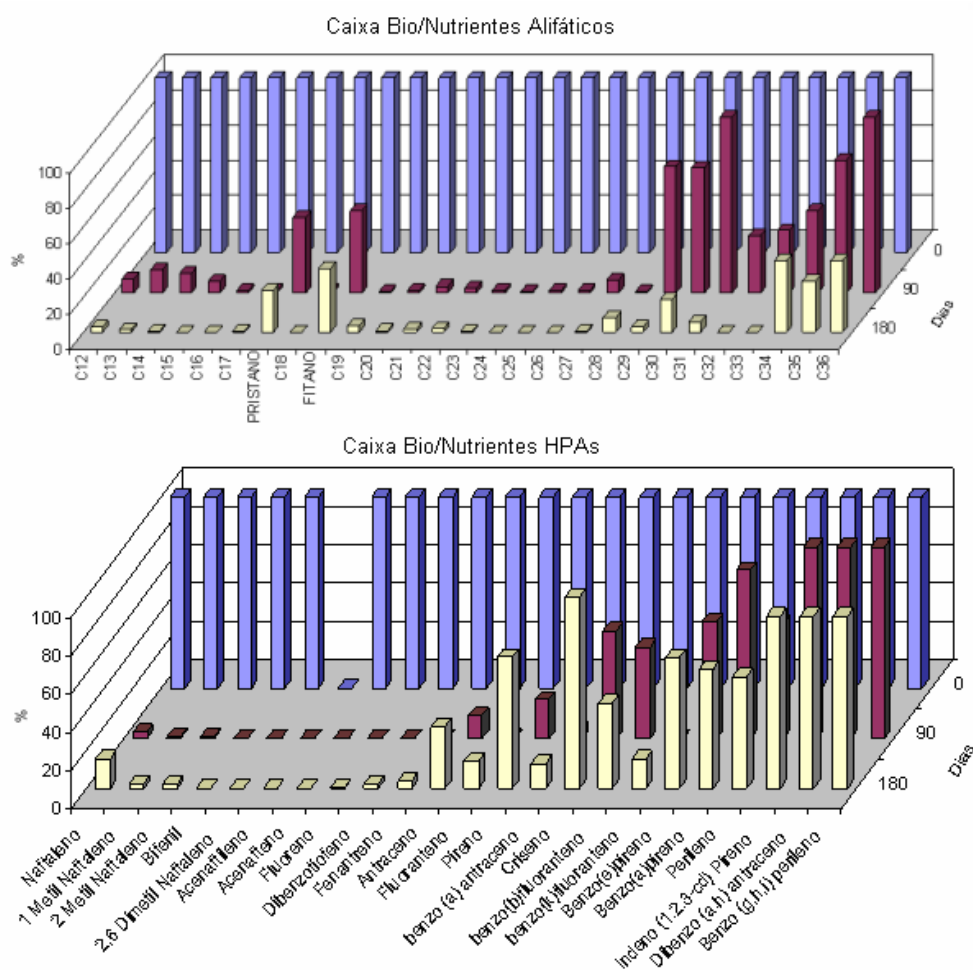


Figura 26. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa biossurfactante/nutrientes (H) no período de 180 dias.

Na caixa bio surfactante estéril/nutrientes (I) (Fig.27), observa-se um comportamento muito semelhante ao da caixa H, com boa redução dos alifáticos ( $\Sigma$  Alifáticos  $\cong$  685 para  $90 \mu\text{g. g}^{-1}$ ) representando 90,1%. Quanto aos HPAs, eles seguem a mesma tendência, reduzindo cerca de 64,27% dos valores iniciais.

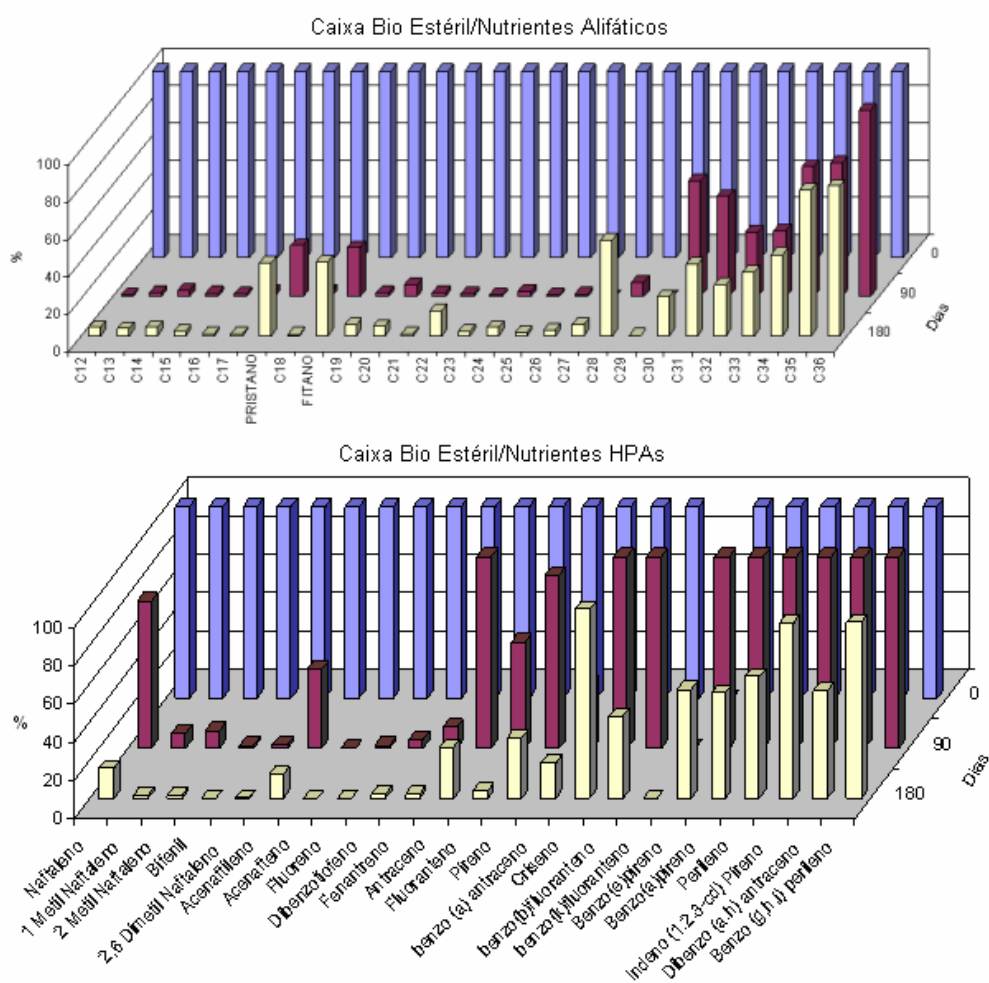


Figura 27. Porcentagem de Hidrocarbonetos alifáticos e HPAs para a caixa bio surfactante estéril/nutrientes (I) no período de 180 dias.

De um modo geral, não se pode dizer que existem diferenças de remoção dos contaminantes de petróleo quanto a utilização dos tratamentos com bio surfactante/nutrientes (H) e com bio surfactante estéril/nutrientes (I), pois ambos se comportaram de maneira muito semelhante em todas os parâmetros investigados. Desta forma, fica claro que uma possível adição de *Pseudomonas* junto com o bio surfactante não influenciou de forma expressiva na degradação dos contaminantes estudados.

Mesmo não havendo diferenças entre os tratamentos, considera-se mais adequada a utilização do biossurfactante estéril a fim de evitar a introdução de um organismo exótico ao meio, uma vez que esta introdução poderia prejudicar ou até mesmo eliminar a microbiota nativa.

## 5. CONCLUSÃO

Com o estudo de biorremediação desenvolvido nesta dissertação, que visava estabelecer qual a técnica mais eficiente para aplicação em solo característico das margens da região estuarina da Laguna dos Patos, foi possível construir algumas conclusões, entre as quais se destacam:

- ✓ Com relação aos teores de OG qualquer um dos tratamentos propostos (adição de nutrientes, adição de biossurfactante, adição de biossurfactante e nutrientes) apresentou melhores resultados quando comparados ao controle de petróleo (atenuação natural), sendo que as caixas adição de nutrientes (C) e adição de nutrientes + biossurfactante (E) alcançaram teores de remoção de 90,4 e 78% respectivamente;
- ✓ Entre os tratamentos, as caixas adição de nutrientes (C) e adição de nutrientes + biossurfactante (E) foram as que apresentaram as melhores taxas de remoção tanto para os alifáticos com 96,82 e 98,35% quanto para os HPAs com 83,58 e 72,3% respectivamente;
- ✓ O tratamento da caixa C (adição de nutrientes) foi o que apresentou melhores taxas de remoção para os HPAs pesados (4-6 anéis), reduzindo seus teores em 71,6%.
- ✓ Não foram verificadas diferenças quanto ao uso do biossurfactante estéril e não estéril;
- ✓ Considera-se mais adequado a utilização do biossurfactante estéril a fim de evitar a introdução de um organismo exótico ao meio, uma vez que esta introdução poderia prejudicar ou até mesmo eliminar a microbiota nativa.



## 6. RECOMENDAÇÕES FUTURAS

Neste item, serão expostas algumas sugestões que foram observadas durante o desenvolvimento deste experimento visando aprimorar o desempenho das técnicas utilizadas e também a diversificação dos materiais empregados.

- ✓ Realizar tratamentos de biorremediação em diferentes tipos de solo, como, solos com maior teor de argila.
- ✓ Utilizar diferentes tipos de petróleo no processo de biorremediação como por exemplo petróleo pesado.
- ✓ Aplicar a técnica de biorremediação em ambientes aquáticos, com coluna d'água analisando a dispersão do petróleo.
- ✓ Estudar os metabólitos dos HPAs formados, e fazer em paralelo um estudo de toxicidade a fim de verificar se os produtos formados são mais tóxicos do que os seus precursores.
- ✓ Fazer um estudo específico para estabelecer qual a melhor relação C:N:P para as condições locais.
- ✓ Fazer um experimento *in situ*, utilizando nutrientes para verificar se os bons resultados obtidos em laboratório serão reproduzidos no ambiente.
- ✓ Ao longo do experimento fazer isolamentos de bactérias para detectar prováveis espécies degradadoras de hidrocarbonetos específicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALOS, A., PINAZO, A. INFANTE, M.R., CASALS, M., GARCIA, F., MARESA, A., 2001 **Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes**, *Langmuir* 17, 1367–1371.
- ABNT-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1997 **Microrganismos Viáveis, Aeróbios e Anaeróbios em Alimentos: Contagem Padrão em Placas**. Rio de Janeiro/RJ.
- ATLAS, R. M., 1981 **Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons and Environmental Perspectives**. *Microbiological Reviews*, v. 45, n. 1, p. 180-209.
- ATLAS, R.M. 1994 **Microbial Hydrocarbon degradation-biorremediation of oil spills**. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*. 52, pp. 149-156.
- AYOTAMUNO M.J., KOGBARA R.B., OGAJI S.O.T., PROBERT S.D. 2006 **Bioremediation of a crude-oil polluted agricultural-soil at Port Harcourt, Nigeria** *Applied Energy* 83,1249–1257
- BAISCH, P., ZAMBONI, A., CORDEIRO, L. H. & ROCHA, A. C. 2000 **Níveis de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos nos sedimentos do estuário d Lagoa dos Patos, Rio Grande, RS**. XIII Sem. Nacional de Oceanografia. Itajaí. SC. Anais, pp. 302-304
- BANAT, I.M., MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S.S., 2000 **Potential commercial applications of microbial surfactants**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 495 –508.
- BAPTISTA, P. M., RIZZO, A. C. L., 2005 **Acompanhamento do Processo de Atenuação Natural de Solo Contaminado por Petróleo**. In: XIII Jornada de Iniciação Científica – CETEM

- BARBOSA, C.D.R., 2005 **Avaliação dos Aportes de Hidrocarbonetos à Lagoa dos Patos (RS – Brasil)**. Dissertação de Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica. Fundação Universidade Federal do Rio Grande.
- BENTO, D. M., 2005 **Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS**. Dissertação de Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica. Fundação Universidade Federal do Rio Grande - RS.
- BENTO, F. M., CAMARGO, F. A. O., OKEKE, B.C., FRANKENBERGER, W. T., 2005 **Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation**. *Bioresource Technology* , v. 96, p. 1049-1055.
- BOGNOLO, G., 1999 **Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons**. *Colloids and Surfaces* 152, 41–52.
- BRITO, E. M. S., 2004 **Degradação de Óleo por Bactérias Isoladas dos sedimentos de Manguezal da A.P.A. de Guapimirim - Baía de Guanabara – RJ**. Tese de Doutorado em Geociências. Universidade Federal Fluminense.
- CABRAL, J., KOIDE, S., SIMÕES, S., 2000 **Recursos Hídrico Subterrâneos. Hidrologia aplicada à gestão de pequenas bacias hidrográficas**. J. B. D. Piava, Paiva, E.M.C.D.. Santa Maria, RS.
- CALABRESE, E. J., KOSTECKI, P. T., 1992 **Hydrocarbon contaminated soils and groundwater**, v. 2. Chelsea: Lewis Publishers, p. 237-293
- CAMARGO, O. A., 1986 **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos**. Instituto Agrônomo de Campinas, p.3.
- CERNIGLIA, C. E., 1992 **Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**. *Biodegradation*, v. 3, p. 351-368.

- CETESB, 1992 **Resíduos sólidos industriais**. Companhia de tecnologia desaneamento ambiental. São Paulo, SP.
- CLARK J.R., BROWN, D. N., 1977 **Petroleum properties and analyses in biotic and abiotic systems**. In: Malis. D.C. (ed.). **Effects of petroleum on Arctic and Subarctic environments in organisms. 1- Nature and fate of petroleum**. New York: Academic press, 1-89.
- COOKSON, J.T., 1995 **Bioremediation Engineering - Design and application**. New York: Mc Graw - Hill Inc.: 524p.
- COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A., 1984 Application Environmental Microbiology, (47), 173.
- CORDEIRO, L. H. C. 2003 **Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos nos sedimentos do estuário da Lagoa dos Patos**. Dissertação de Mestrado. Rio Grande: Fundação Universidade do Rio Grande. p. 111.
- COULON, F., PELLETIER E., GOURHANT L., DELILLE F., 2005 **Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil**; Chemosphere 58, 1439–1448.
- CUNHA, C. D., 1996 **Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo**. Dissertação Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, p. 97.
- D'AGOSTINHO, A., FLUES, M., 2006 **Determinação do Coeficiente de Distribuição (Kd) de Benzo(a)pireno em Solo por Isotermas de Sorção** – Química Nova, 29 (4), 657-661
- DEOTTI, L. O. G., 2005 **Controle de pH na Técnica de Biorremediação Eletrocínética**. Dissertação de Mestrado em Ciências da Engenharia Civil. Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ.
- DESAI, J. D., & BANAT, I. M., 1997 **Microbial production of surfactants and their commercial application**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61(1), 47–74.

- DESAI, J. D., DESAI, A. J., 1993 **Biosurfactants: production, properties, applications**. Marcel Decker, New York, cap. 3.
- EPA (Environmental Protection Agency), <http://ww.itopf.com> acesso em 27/11/2006.
- ETKIN, D. S., 1999 **Historical Overview of Oil Spills from All Sources (1960-1998)** [Perspectiva Histórica sobre Derramamentos de Petróleo de Todos os Tipos], apresentado na Conferência Internacional sobre Derramamento de Petróleo. disponível na página: [http://www.environmental-research.com/publications/pdf/spill\\_costs/papen.pdf](http://www.environmental-research.com/publications/pdf/spill_costs/papen.pdf) em janeiro de 2006.
- FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001 Center for Food Safety & Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual.
- FERNANDES, F. M., 1998 Bioremediation – **State of the Art**. In Third Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symposium. Florianópolis, 27-30 Abril.
- FERRÃO, C. M., 2005 **Derramamentos de Óleo no Mar por Navios Petroleiros**. Dissertação de Especialização em M.B.E. Pós Graduação Executiva em Meio Ambiente.
- FRONZA, L., 2006 **Capacidade de Liberação de Hidrocarbonetos dos Sedimentos de Áreas Contaminadas do Estuário da Lagoa dos Patos –RS** Dissertação de Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica. Fundação Universidade Federal do Rio Grande - RS.
- GOGOI, B.K., DUTTA, N.N., GOSWAMI, P., KRISHNA MOHANB, T.R., 2003 **A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site**. Advances in Environmental Research 7, 767–782
- HARDISTY, J. 1990 **Beaches Form & Process**. Londres, Unwin Hyman Ltd.
- HEALY, M.G., DEVINE, C.M., MURPHY, R., 1996 **Microbial production of biosurfactants**. Resources, Conservation and Recycling, 18, 41-57.

- HOFF, R.Z., 1992 **Bioremediation: A countermeasure for marine oil spills.** Newsletter Spill Technology, 17 (1): 14p.
- HOFF, R.Z., 1993 **Bioremediation: An overview of its development and use of oil spill cleanup,** Marine Pollution Bulletin, 26 (9): 476-481.
- IPIECA, 1993 **Dispersants and their role in Oil Spill Response.** IPIECA Report Series. London, UK, V. 5, p. 24.
- KENNISH, M.J. 1997 **Pollution impacts on marine biotic communities.** CRC Press LLC, Boca Raton, FL. p. 310.
- KESSLER, A., RUBIN, H., 1987 **Relationships between water infiltration and oil spill migration in sandy soils.** Journal of Hidrology, v. 91, p. 187-204.
- KING, R.B., LONG, G.M.; SHELDON, J.K., 1997 **Practical environmental bioremediation: The field guide,** Second edition, Boca Raton: Lewis Publishers/CRC Press, 185p.
- KWOK, C., LOH K., 2003 **Effects of Singapore soil type on bioavailability of nutrients in soil Bioremediation.** Advances in Environmental Research 7, 889–900
- LANG, S., WAGNER, F., 1993 **Biosurfactants: production, properties, applications;** Marcel Decker, New York cap. 8.
- LAPINSKAS, J., 1989 **Bacterial Degradation of Hydrocarbon Contamination in Soil and Groundwater.** Chemistry and Industry, v. 784-789, 1989.
- LIEBEG, E.W.; CUTRIGHT, T.J, 1999 **The Investigation of Enhanced Bioremediation Throught the Addition of Macro and Micro Nutrients in a PAH Contaminated Soil.** Int. Biodeterioration and Biodegradation, v. 44, p. 55-64.
- LIMA, C.A., 2004 **Quantificação do Decréscimo de Risco Associado a Biorremediação de um Solo Contaminado por Hidrocarbonetos de Petróleo.** Tese M.Sc., UFRJ/EQ, Rio de Janeiro - RJ.

- LIN, S.C., 1996 **Biosurfactant: recent advances**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 63, 109–120.
- LIN, S, C., SHARMA, M. M., GEORGIU, G., 1993 **Production and deactivation of biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2**. Biotechnology Program, v 9, p. 138-145
- LOPES, W. A., ANDRADE, J. B., 1996 **Fonte, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos(HPA) na atmosfera**. Química Nova, 19: 497 – 516.
- MANLY, B. F. J., 1994 **Multivariate Statistical Methods**. London, Chapman & Hall.
- MORAN, A.C., OLIVERA, N., COMMENDATORE, M., ESTEVES, J.L. AND SINERIZ, F., 2000 **Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9**. Biodegradation. 11: 65-71.
- MULLIGAN, N.C., GIBBS, B.F., 1993 **Biosurfactants: production, properties, applications**. Marcel Dekker, New York, p. 366.
- MULLIGAN, C.N., YONG, R.N., GIBBS, B.F., 2001 **Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review**. Engineering Geology 60, 371–380.
- NAS (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES), 1985 **Oil in the Sea, Inputs, Fates and Effects**. National Academy Press. Washington, DC, Chap. 4, p. 270-368.
- NITSCHKE, M. PASTORE,G.M., 2002 **Biossurfactantes: propriedades e aplicações**. Química Nova, vol. 25, No. 5, pp. 772-776.
- NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1985 **Oil in the sea, inputs, fates and effects**. National Academy Press, Washington.
- OH, Y.S.; SIM, D.S.; KIM, S.J., 2001 **Effects os nutrients on crude oil**

**biodegradation in the upper intertidal zone.** Marine Pollution Bulletin, 42 (12) 1367-1372.

PAR, J.F., SIKORA, L.J., BURGE, W.D., 1983 **Factors affecting the degradation and inactivation of waste constituents in soil** In: **Land Treatment of Hazardous Wastes.** Parr, J.F., Kla, J.M. (eds). Park Ridge, NJ, Noyes Data Corp., pp. 20-49,321-337.

PEDERZOLLI, E. M., 2006 **Comparação de áreas submetidas a impacto pelo refino de petróleo (RS).** Dissertação de Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica. Fundação Universidade Federal do Rio Grande - RS.

PEREIRA NETTO, A. D., MOREIRA, J. C., DIAS, A. E. X. O., ARBILLA, G., FERREIRA, L. F. V., OLIVEIRA, A. S., BAREK, J., 2000 **Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs):** Uma revisão metodológica. Química Nova, 23: 765 – 773.

PRIETO, L. M., 2007 **Produção, caracterização parcial e aplicação de ramnolípídeos de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de resíduos de pescado capturado no extremo sul do Brasil.** Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande - RS.

PRINCE, R.C., 1993 **Petroleum spill bioremediation in marine environments.** Critical Reviews in Microbiology, 19 (4): 217-242.

PRITCHARD, H.F.; COSTA, C.F., 1991 **EPA's Alaska oil spill bioremediation project.** Environ. Sci. Technol., 25 (9): 373-379.

PROVIDENTI, M.A., FLEMMING, C.A., LEE, H., TREVORE, J.T., 1995 **Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries,** FEMS Microbiol. Ecol. 17, 15 – 26.



- RAN XU, ANGELINA N.L., LAU, Y. G. L., OBBARD J. P., 2005 **Bioremediation of oil-contaminated sediments on an inter-tidal shoreline using a slow-release fertilizer and chitosan**. *Marine Pollution Bulletin* 51, 1062-1070.
- RIBEIRO, T.H.; RUBIO, J.; SMITH, R.W. **A dried hydrophobic aquaphyte as an oil filter for oil/water emulsions**. *Spill Science & Technology Bulletin* . v.8, n.5, p.483-489, 2003.
- RISER-ROBERTS, E., 1998 **Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes**. CRC Press LLC, Boca Raton.
- RIZZO, A. C. L., RAIMUNDO, R., 2003 **Determinação de óleos e graxas, em solo, por gravimetria empregando método de extração com ultrassom**. IT2003-001-00 – Instrução de Trabalho elaborada para o CETEM.
- RON, E. Z., ROSEMBERG, E., 2002 **Biosurfactants and oil Bioremediation**. *Current Opinion in Biotechnology*, v 13, p. 249-252.
- RUTTENBERG, K. C., 1992 **Development of a sequential extraction method for different forms of phosphorus in marine sediments**. *Limnology & Oceanography*, V. 37, p. 1460-1482.
- SALANITRO, J. P., DORN, P. B., HUESEMANN, M. H., MOORE, K. O., RHODES, I. A., JACKSON, L. M. R., VIPOND, T., WESTERN, M. M., WISNIEWSKI, H., 1997 **Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxicity Assessment**. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1769-1776
- SANJEET M., JEEVAN J., RAMESH C. K., BANWARI L., 2001 **Evaluation of Inoculum Addition To Stimulate In Situ Bioremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil**. *Applied and Environmental Microbiology* p. 1675–1681 Vol. 67, No. 4
- SANTOS, L. C., MILLIOLI, V. S., 2005 **Avaliação da potencialidade do uso**

**de biossurfactante na biorremediação de solo contaminado por óleo cru.** In: XIII Jornada de Iniciação Científica – CETEM

SARKAR D., FERGUSON M., DATTA R, BIRNBAUM S., 2005 **Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation.** Environmental Pollution 136, 187-195.

SCHMIDT, C. A. B., 2004 **Aplicação de Técnica Eletrocinética em Laboratório a Dois Tipos de Solos Argilosos.** Tese de Doutorado em Ciências em Engenharia Civil – Rio de Janeiro - RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

SIMS, R. C.; SIMS, J. L.; SORENSEN, D. L.; HASTINGS, L. L. 1988. **Waste/soil treatability studies for four complex industrial wastes: methodologies and results.** USEPA, Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory, V. 1, p. 154.

SOUZA, E. S., 2003 **Desenvolvimento de métodos de biorremediação aplicados a derrames de petróleo em água do mar.** Tese de Doutorado em Engenharia de Reservatório e Exploração de Petróleo – Macaé - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF.

STRICKLAND, J.H.D., PARSONS, T., 1972 **A practical handbook of seawater analysis.** 2nd edition. J. Fis. Res. Ed. Canada, Ottawa Bull (167). 310 p.

SUGUIO, K. 1973 **Introdução à sedimentologia.** Ed. Edgard Blücher. São Paulo. 1a edição. p. 317.

TEDESCO, M. J., GIANELLO, C., BISSANI, C. A., BOHNEN, H., VOLKWEISS, S. J., 1995 **Análises de solo, plantas e outros materiais.** 2. ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

THIBAUT, G.T., ELLIOTT, N.W., 1979 **Accelerating the biological clean-up of hazardous materials spills** In: Proc. Oil and Haz. Mater. Spills:

**Prevention-Control-Cleanup-Recovery-Disposal.** Dec 3-5. Sponsored by Haz. Mater. Control Res. Inst. And Info. Transfer, inc, pp. 115-120.

TORRENS, J.L., HERMAN, D.C., MILLER-MAIER, R.M., 1998 **Biosurfactant (rhamnolipid) sorption and the impact on rhamnolipid-facilitated removal of cadmium from various soils under saturated flow conditions**, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 776–781.

TRINDADE, P. V. O., 2005 **Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study**. Chemosphere 58 515–522

TSALIK, S., SCHIFFRIN, A., 2005 **Reportando o Petróleo**, Open Society Institute, New York-USA.

UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME), 1991 **Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments**. Reference methods for marine pollution studies, no 20, p. 97.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2000 **Bioaccumulation testing and interpretation for the purpose of sediment quality assessment: status and needs**. EPA 83-R-00-001. Washington, D.C. 20460, p. 111.

VASUDEVAN N., RAJARAM, P., 2001 **Bioremediation of oil sludge-contaminated soil**. Environment International 26, 409 - 411

VEIGA, I.G., 2003. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos / Bahia**. Dissertação de mestrado em Engenharia de Reservatório e de Exploração. Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ. 225p.

VOLKERING, F., BREURE, A.M., VAN ANDEL, J.G. and RULKENS, W.H., 1995 **Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons**. Appl. Environ.

Microbiol. vol. 61 pp. 1699 - 1705.

WEISMAN, W., 1998 **Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media**. Amherst Scientific Publishers, v 1, p. 1-98.

WITT, G., 1995 **Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of the Baltic Sea**. Marine Pollution Bulletin – 31, 237 – 248.

## 8. Anexos

## 8.1. Certificado de análise do Petróleo.



Refinaria de Petróleo Ipiranga S. A. Depto. Controle de Qualidade e M. A.		
CERTIFICADO DE ANÁLISE DO PRODUTO		
Produto:	<b>Petróleo Hydra</b> Data: 10/10/2003	
ENSAIOS	MÉTODOS REFERÊNCIA	RESULTADOS
Densidade à 20/4°C	ASTM D1298	0,778
API	ASTM D1298	49,3
Viscosidade a 30°C (cSt)	MB-298	33,184
Nitrogênio Básico, (ppm)		143,96
Cloretos, (mg/l)	MB-298	5,0
Resíduo de Carbono Ramsbottom, (%)	ASTM D524	1,217
Enxofre, (%)	ASTM D1552	0,045
Água e Sedimento, (%)	ASTM D4007	0,05
TAN, (mgKOH/g)	ASTM D664	0,15
Ponto Fluidez, (°C)	ASTM D97	Inf 0
Pressão Vapor Reid, (Kgf/cm <sup>2</sup> )	ASTM D5482	7,8
Ferro, (ppm)	Absorção Atômica	1,46
Vanádio, (ppm)	Absorção Atômica	0,31
Cobre, (ppm)	Absorção Atômica	Zero
Níquel, (ppm)	Absorção Atômica	Zero
Sódio, (ppm)	Absorção Atômica	8,37
Benzeno/Tolueno (% volume)	Cromatografia	0,050/0,197
Mercurio, (ug/Kg)		
P. Inicial, °C	33	
30° C		210° C 56,0      310° C 70,0
40° C	1,0	120° C 32,5      220° C 57,0      320° C 71,0
50° C	3,0	130° C 37,0      230° C 58,0      330° C 72,5
60° C	7,0	140° C 40,0      240° C 58,5      340° C 76,0
70° C	13,0	150° C 42,0      250° C 60,5      350° C 77,0
80° C	16,5	160° C 45,0      260° C 62,0      360° C 78,0
90° C	21,0	170° C 47,0      270° C 63,0      370° C 79,0
100° C	25,0	180° C 49,0      280° C 64,0      380° C
110° C	30,0	190° C 53,0      290° C 66,0      390° C
		200° C 54,0      300° C 68,0      Cracking, °C 377,0
OBS: Não temos Método para Análise de Mercúrio em Óleos.		

Refinaria de Petróleo Ipiranga S. A.

Rua Engenheiro Héitor Amaro Barcellos, 551  
CEP 96202-900 - Rio Grande - RS

**8.2. Teor de hidrocarbonetos alifáticos nos solos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para as cinco caixas (Experimento I).**

	A			B			C			D			E		
	0	90	180	0	90	180	0	90	180	0	90	180	0	90	180
C12	0,02	0,01	0,06	6,30	8,55	0,03	0,00	0,14	0,00	0,22	4,04	0,02	0,00	0,06	0,01
C13	0,13	0,11	0,00	81,39	76,54	1,01	0,69	1,03	0,00	4,52	12,52	0,12	1,74	0,26	0,18
C14	0,48	0,38	0,03	217,48	171,34	10,64	2,78	1,56	0,00	33,19	23,69	1,85	18,94	0,20	0,72
C15	0,78	0,52	0,06	286,39	227,14	31,00	6,72	2,77	0,04	76,81	34,36	9,33	52,66	1,09	1,11
C16	0,80	0,33	0,01	305,51	253,46	42,49	7,14	1,56	0,03	88,69	34,33	19,52	64,92	0,59	0,92
C17	0,98	0,22	0,23	303,67	264,89	46,85	10,26	4,30	0,12	107,06	39,49	29,00	75,13	0,41	0,17
PRISTANO	0,95	0,43	1,99	182,74	162,64	58,22	41,12	24,03	0,97	74,45	50,90	52,87	81,35	23,99	5,20
C18	0,46	0,12	0,48	291,55	231,61	50,31	12,48	6,85	0,21	98,30	38,19	32,91	75,58	0,26	0,19
FITANO	0,25	0,11	1,34	111,48	77,39	33,38	21,39	17,04	0,90	39,31	26,33	30,46	42,05	15,10	5,91
C19	0,29	0,03	0,27	284,78	247,08	54,41	7,74	4,07	0,63	115,51	42,44	37,31	97,71	6,05	2,99
C20	0,00	0,00	0,02	254,89	211,12	57,93	16,86	13,63	0,05	93,15	37,33	39,05	109,42	2,65	1,57
C21	0,00	0,00	0,00	236,81	188,59	51,99	10,16	8,15	0,00	82,28	34,45	31,45	92,51	1,56	0,67
C22	0,00	0,00	0,00	226,74	178,37	50,65	9,30	7,52	0,14	77,60	33,36	33,82	85,85	1,25	4,21
C23	0,00	0,00	0,00	218,11	161,22	45,71	8,10	6,02	0,00	69,36	31,88	31,11	80,50	0,43	0,22
C24	0,00	0,00	0,00	204,25	144,55	39,72	7,64	6,62	0,00	60,58	28,55	28,84	71,16	0,00	0,27
C25	0,00	0,00	0,00	173,22	117,67	31,78	5,53	2,39	0,00	56,45	24,49	25,47	65,45	3,61	0,00
C26	0,00	0,00	0,00	143,87	100,29	29,01	4,81	3,41	0,00	46,02	20,54	22,65	51,04	0,33	0,00
C27	0,00	0,00	0,00	126,24	88,83	26,03	3,86	5,23	0,00	39,36	17,79	21,64	46,97	0,12	0,00
C28	0,00	0,00	0,00	108,02	83,19	25,10	2,14	0,62	0,00	32,10	15,57	21,13	43,56	0,00	0,00
C29	0,00	0,00	0,00	100,46	76,32	25,55	1,11	0,17	0,00	33,04	15,26	22,41	44,86	0,00	0,00
C30	0,00	0,00	0,00	85,48	55,06	19,80	0,14	0,00	0,00	26,41	11,38	16,39	33,75	0,00	0,00
C31	0,00	0,00	0,00	79,59	51,72	20,00	0,75	0,00	0,00	23,38	11,48	18,21	35,49	0,00	0,00
C32	0,00	0,00	0,00	67,09	51,15	22,30	3,56	0,00	0,00	25,94	12,82	18,99	39,25	0,00	0,00
C33	0,00	0,00	0,00	67,20	58,66	30,97	9,01	7,50	0,00	31,51	15,08	24,44	41,75	0,00	0,29
C34	0,00	0,00	0,00	64,68	54,89	27,02	11,03	13,81	0,00	29,81	15,21	25,48	52,52	5,84	0,00
C35	0,00	0,00	0,00	53,32	44,28	24,42	11,68	5,51	1,07	28,62	15,48	21,34	48,99	2,73	0,00
C36	0,00	0,00	0,00	40,40	25,93	23,23	13,38	5,82	3,14	24,81	11,28	16,84	39,66	1,00	0,01

### 8.3. Teor de HPAs nos solos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para as cinco caixas (Experimento I).

	A			B			C			D			E		
	0	90	180	0	90	180	0	90	180	0	90	180	0	90	180
Naftaleno	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
1 Metil Naftaleno	0,002	0,001	0,000	0,005	0,004	0,000	0,002	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000
2 Metil Naftaleno	0,000	0,000	0,000	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000
2,6 Dimetil Naftaleno	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acenaftileno	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acenafteno	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Fluoreno	0,000	0,000	0,000	0,406	0,032	0,000	0,014	0,000	0,000	0,137	0,000	0,000	0,044	0,000	0,000
Dibenzotiofeno	0,000	0,000	0,000	0,096	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,057	0,000	0,000	0,066	0,000	0,000
Fenantreno	0,031	0,009	0,000	5,147	0,259	0,012	0,932	0,549	0,000	1,937	0,027	0,059	4,200	0,898	0,007
Antraceno	0,000	0,034	0,058	0,395	0,406	0,079	0,160	0,529	0,122	0,074	0,072	12,190	1,226	1,256	0,293
Fluoranteno	0,000	0,001	0,000	1,293	0,446	0,050	0,140	0,265	0,007	0,173	0,049	0,297	1,496	0,587	0,071
Pireno	0,000	0,000	0,000	0,085	0,052	0,052	0,019	0,012	0,004	0,095	0,117	0,016	0,023	0,010	0,018
benzo (a) antraceno	0,000	0,000	0,000	0,270	0,141	0,031	0,070	0,048	0,001	0,128	0,054	0,044	0,128	0,048	0,000
Criseno	0,000	0,012	0,000	1,712	0,764	0,338	0,282	0,169	0,086	0,617	0,464	0,288	0,529	0,421	0,255
benzo(b)fluoranteno	0,000	0,000	0,000	0,332	0,186	0,099	0,065	0,040	0,016	0,120	0,136	0,143	0,116	0,114	0,086
benzo(k)fluoranteno	0,000	0,000	0,000	0,038	0,011	0,013	0,007	0,002	0,000	0,012	0,009	0,016	0,012	0,011	0,007
Benzo(e)pireno	0,000	0,002	0,000	0,354	0,195	0,127	0,070	0,065	0,045	0,124	0,158	0,089	0,127	0,139	0,085
Benzo(a)pireno	0,000	0,000	0,000	0,141	0,084	0,058	0,028	0,017	0,008	0,057	0,074	0,040	0,054	0,065	0,042
Perileno	0,000	0,000	0,000	0,046	0,032	0,019	0,014	0,010	0,003	0,023	0,022	0,015	0,023	0,024	0,015
Indeno (1.2.3-cd) Pireno	0,000	0,000	0,000	0,079	0,078	0,080	0,034	0,022	0,008	0,076	0,060	0,034	0,084	0,068	0,036
Dibenzo (a,h) antraceno	0,000	0,000	0,000	0,100	0,078	0,040	0,024	0,014	0,002	0,053	0,077	0,061	0,056	0,070	0,037
Benzo (g,h,i) perileno	0,000	0,000	0,000	0,099	0,070	0,040	0,026	0,022	0,009	0,046	0,068	0,039	0,051	0,055	0,021

**8.4. Teor de hidrocarbonetos alifáticos nos solos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para as cinco caixas (Experimento II).**

	F			G			H			I		
	0	90	180	0	90	180	0	90	180	0	90	180
C12	0,093	0,888	0,079	26,527	2,296	3,486	18,007	1,428	0,594	20,433	0,145	0,981
C13	2,246	3,100	0,085	43,650	16,401	12,703	35,191	4,556	0,491	41,080	0,922	1,503
C14	4,569	3,559	0,150	49,326	30,376	20,636	43,649	4,913	0,352	39,349	1,461	1,844
C15	3,138	3,709	0,115	46,320	41,932	32,278	43,899	2,818	0,049	50,877	0,900	1,137
C16	1,352	3,088	0,059	48,096	46,251	31,609	39,664	0,397	0,000	43,077	0,490	0,449
C17	0,484	1,683	0,163	45,757	31,156	28,815	43,818	0,705	0,232	45,879	1,184	0,363
PRISTANO	0,864	0,512	0,053	28,954	32,989	22,467	24,921	10,705	5,892	24,823	6,853	9,679
C18	0,434	1,634	0,118	43,604	37,434	26,388	40,451	0,564	0,006	44,574	1,265	0,316
FITANO	0,551	0,750	0,031	16,389	12,733	10,539	14,919	6,996	5,398	20,411	5,340	8,156
C19	0,194	1,223	0,010	47,200	40,379	31,548	43,604	0,099	1,526	47,435	0,992	2,876
C20	0,457	0,988	0,042	19,604	15,354	19,072	35,895	0,543	0,400	36,026	2,203	1,894
C21	0,222	0,788	0,001	18,198	19,212	16,297	32,954	1,276	0,615	31,955	0,666	0,388
C22	0,350	0,887	0,019	17,744	20,110	16,596	33,050	0,857	0,774	32,463	0,529	4,460
C23	0,247	0,996	0,026	16,883	18,998	12,336	29,999	0,423	0,160	31,678	0,156	0,672
C24	0,333	1,364	0,222	14,315	18,000	12,666	27,289	0,189	0,025	26,807	0,669	1,201
C25	0,355	1,192	0,097	11,807	15,145	10,161	22,592	0,279	0,049	24,090	0,252	0,456
C26	0,323	1,286	0,207	11,065	14,863	7,726	19,915	0,317	0,017	22,432	0,245	0,702
C27	0,304	1,170	0,116	9,498	12,482	7,450	17,376	1,284	0,183	16,851	0,000	0,995
C28	0,000	0,000	0,000	6,107	12,673	4,999	13,041	0,106	1,091	14,917	1,132	7,668
C29	0,602	1,320	0,300	7,918	13,442	6,159	14,598	10,476	0,387	15,767	0,000	0,003
C30	0,225	1,259	0,099	6,696	11,279	5,901	12,085	8,606	2,238	11,130	6,893	2,350
C31	0,834	1,104	0,442	6,415	10,640	5,870	12,229	15,540	0,697	9,503	5,125	3,618
C32	0,325	0,627	0,005	5,818	9,778	6,288	10,406	3,358	0,022	8,875	3,065	2,437
C33	0,611	0,244	0,023	5,565	9,072	5,223	9,496	3,373	0,019	8,698	3,059	2,987
C34	0,334	0,000	0,000	5,767	10,292	4,237	10,440	4,889	4,298	7,264	5,062	3,157
C35	0,956	0,000	0,094	4,900	7,567	3,245	7,429	5,631	2,136	6,674	4,807	5,216
C36	0,508	0,000	5,162	2,951	8,735	4,308	5,231	5,326	2,155	3,214	5,453	2,585



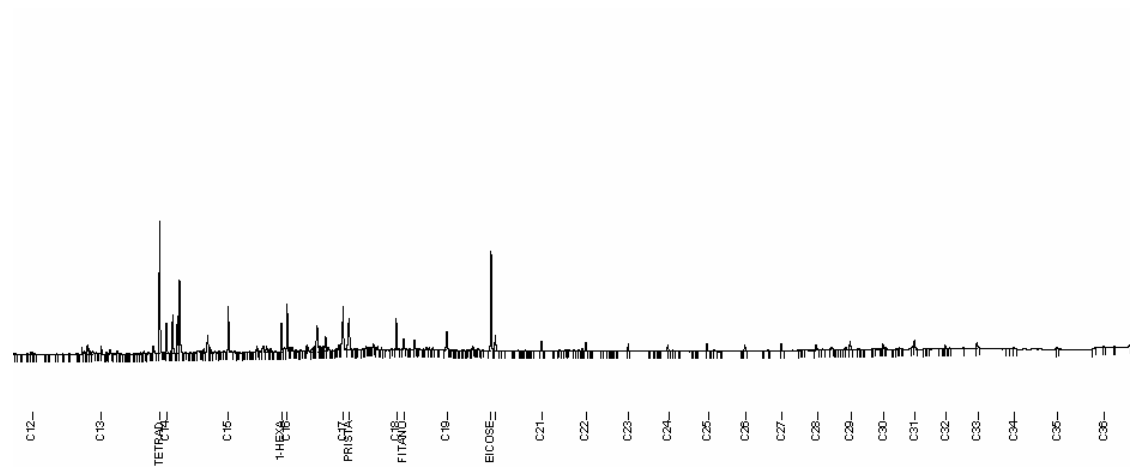
### 8.5. Teor de HPAs nos solos ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) para as cinco caixas (Experimento II).

	F			G			H			I		
	0	90	180	0	90	180	0	90	180	0	90	180
Naftaleno	0,000	0,009	0,001	0,000	0,003	0,006	0,009	0,000	0,001	0,007	0,005	0,001
1 Metil Naftaleno	0,000	0,007	0,001	0,053	0,001	0,004	0,044	0,000	0,001	0,044	0,003	0,001
2 Metil Naftaleno	0,000	0,005	0,001	0,042	0,001	0,003	0,029	0,000	0,001	0,036	0,003	0,001
2,6 Dimetil Naftaleno	0,014	0,005	0,001	0,869	0,002	0,002	0,407	0,000	0,001	0,212	0,003	0,001
Acenaftileno	0,001	0,003	0,000	0,081	0,001	0,002	0,100	0,000	0,000	0,089	0,002	0,000
Acenafteno	0,000	0,002	0,000	0,004	0,001	0,006	0,000	0,000	0,000	0,004	0,002	0,001
Fluoreno	0,000	0,000	0,000	0,002	0,001	0,005	0,003	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
Dibenzotiofeno	0,003	0,003	0,000	0,859	0,009	0,014	0,558	0,001	0,002	0,487	0,009	0,001
Fenantreno	0,001	0,003	0,000	0,386	0,014	0,015	0,142	0,000	0,004	0,174	0,009	0,004
Antraceno	0,000	0,087	0,006	7,825	0,276	0,516	4,670	0,015	0,183	3,911	0,444	0,082
Fluoranteno	0,000	0,977	0,442	1,964	0,373	0,608	0,837	0,101	0,268	0,595	1,083	0,158
Pireno	0,049	0,041	0,006	1,028	0,434	0,661	0,964	0,010	0,137	0,896	0,497	0,035
benzo (a) antraceno	0,045	0,007	0,003	0,052	0,107	0,174	0,053	0,011	0,037	0,077	0,069	0,024
Criseno	0,011	0,003	0,002	0,304	0,219	0,287	0,225	0,009	0,030	0,303	0,102	0,056
benzo(b)fluoranteno	0,667	0,238	0,121	0,709	1,859	0,568	0,538	0,302	0,790	1,061	1,052	1,045
benzo(k)fluoranteno	0,101	0,046	0,024	0,764	0,349	0,758	0,279	0,133	0,124	0,484	0,653	0,206
Benzo(e)pireno	0,013	0,001	0,001	0,059	0,021	0,051	0,011	0,000	0,002	0,000	0,018	0,011
Benzo(a)pireno	0,182	0,083	0,053	0,535	0,539	0,836	0,461	0,282	0,315	0,788	0,843	0,449
Perileno	0,070	0,040	0,009	0,249	0,200	0,306	0,177	0,156	0,110	0,323	0,339	0,177
Indeno (1.2.3-cd) Pireno	0,042	0,023	0,014	0,138	0,085	0,128	0,089	0,053	0,052	0,126	0,151	0,080
Dibenzo (a,h) antraceno	0,073	0,052	0,044	0,180	0,132	0,139	0,091	0,232	0,082	0,175	0,254	0,160
Benzo (g,h,i) perileno	0,034	0,020	0,018	0,140	0,138	0,191	0,098	0,180	0,089	0,178	0,220	0,100

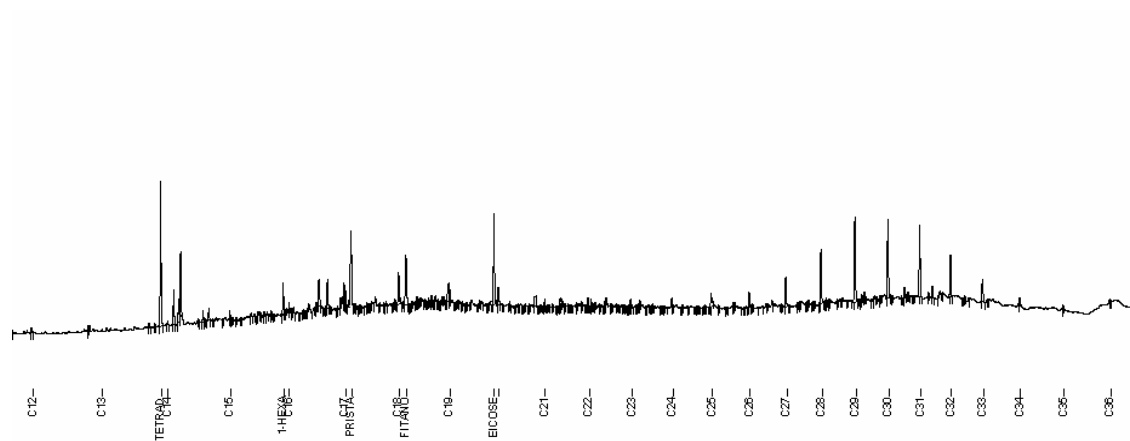
## 8.6. Cromatogramas Experimento I

### 8.6.1. Hidrocarbonetos Alifáticos

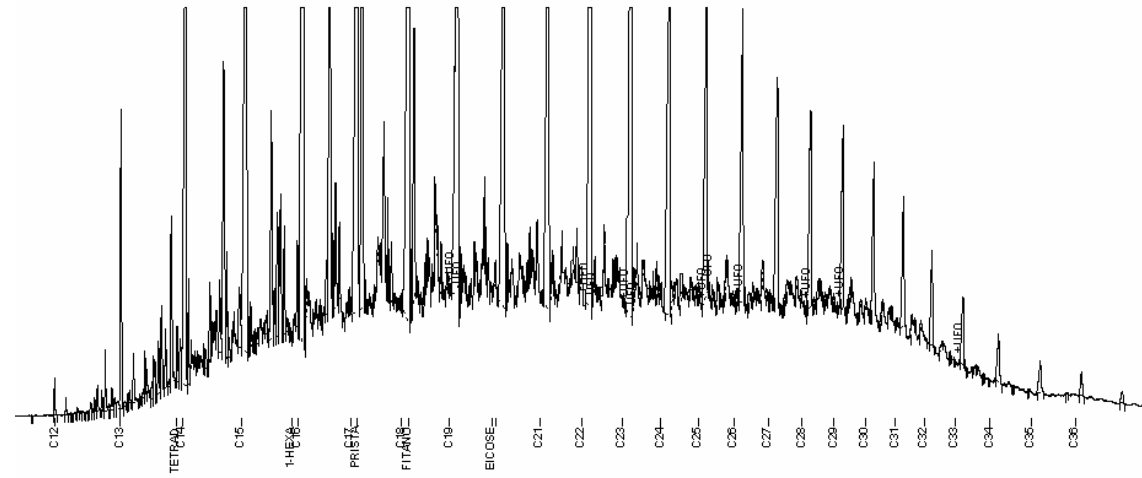
Caixa Branco (A) 0



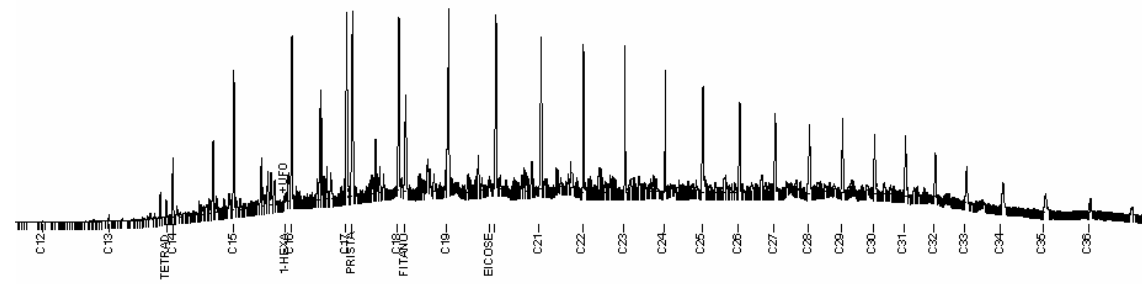
Caixa Branco (A) 180



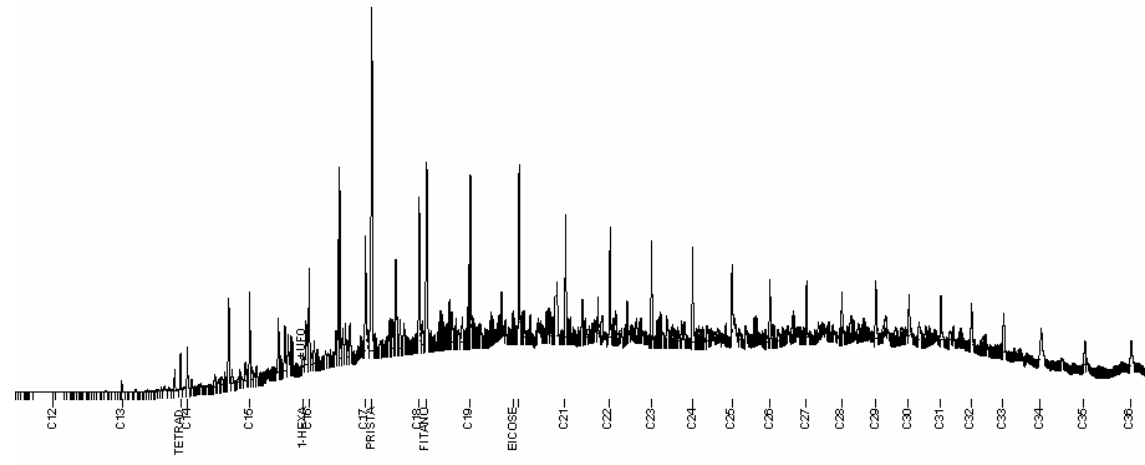
## Caixa Petróleo (B) 0



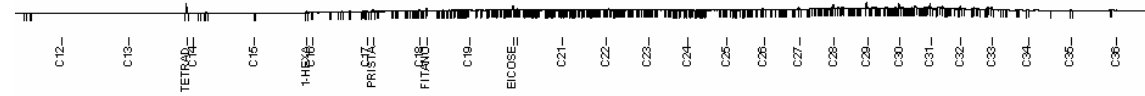
## Caixa Petróleo (B) 180



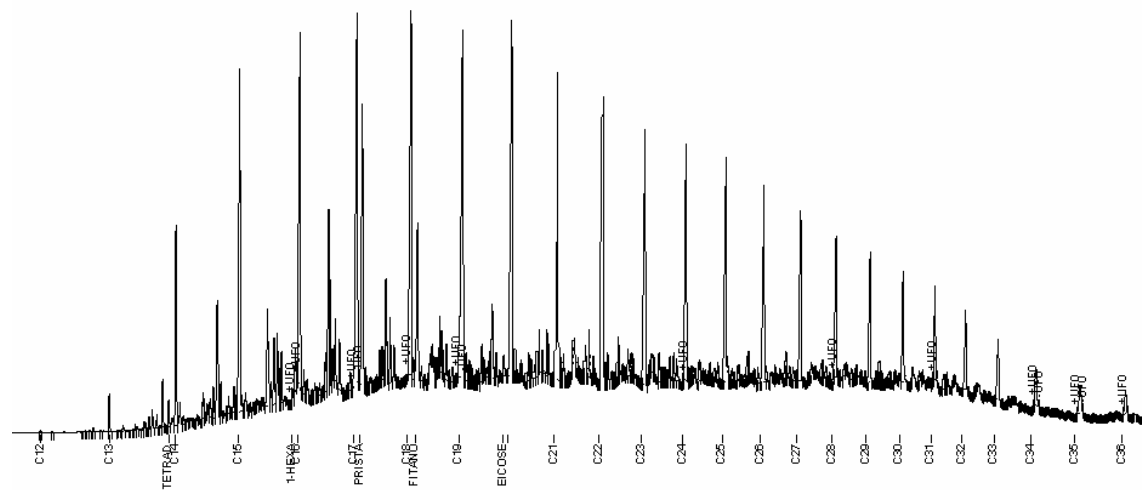
Caixa Nutrientes (C) 0



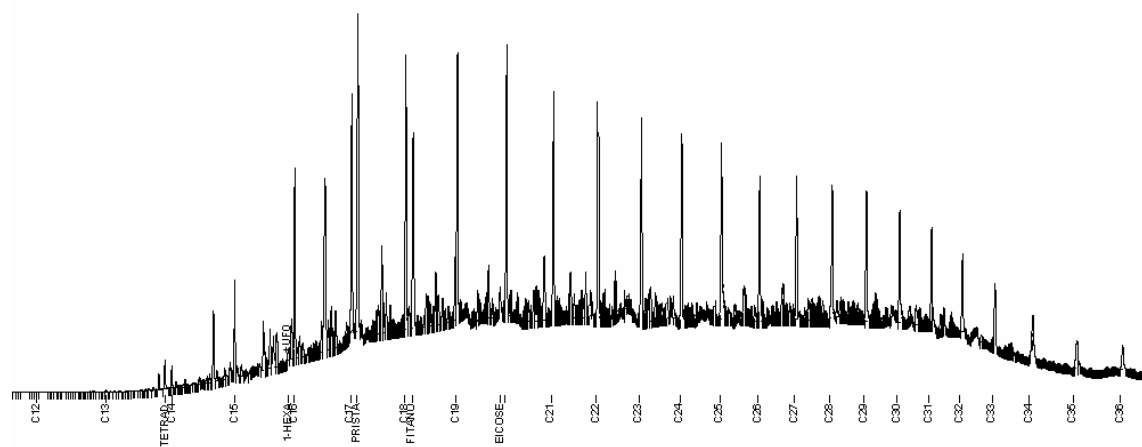
Caixa Nutrientes (C) 180



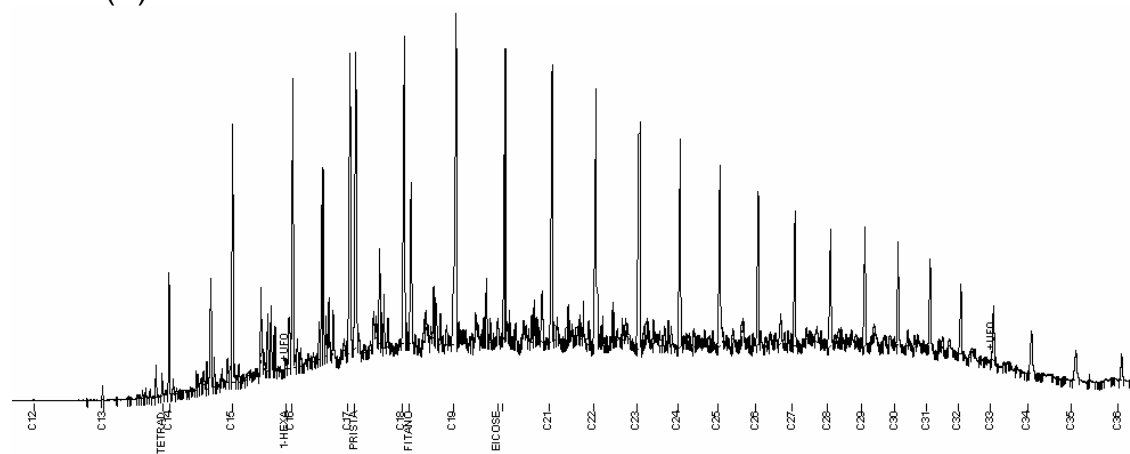
## Caixa Biosurfactante (D) 0



## Caixa Biosurfactante (D) 180



## Caixa Biosurfactante/Nutriente (E) 0

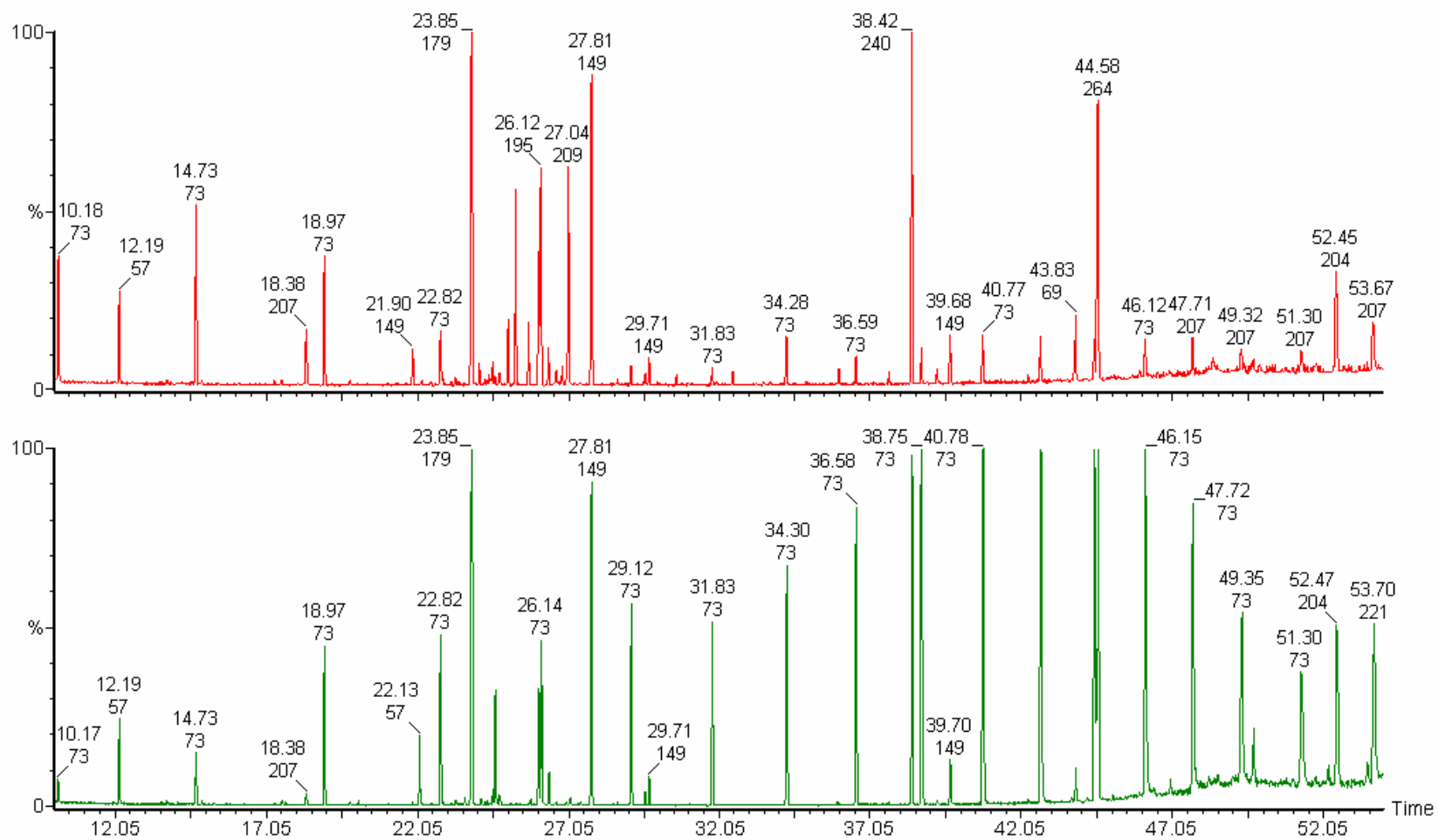


## Caixa Biosurfactante/Nutriente (E) 180

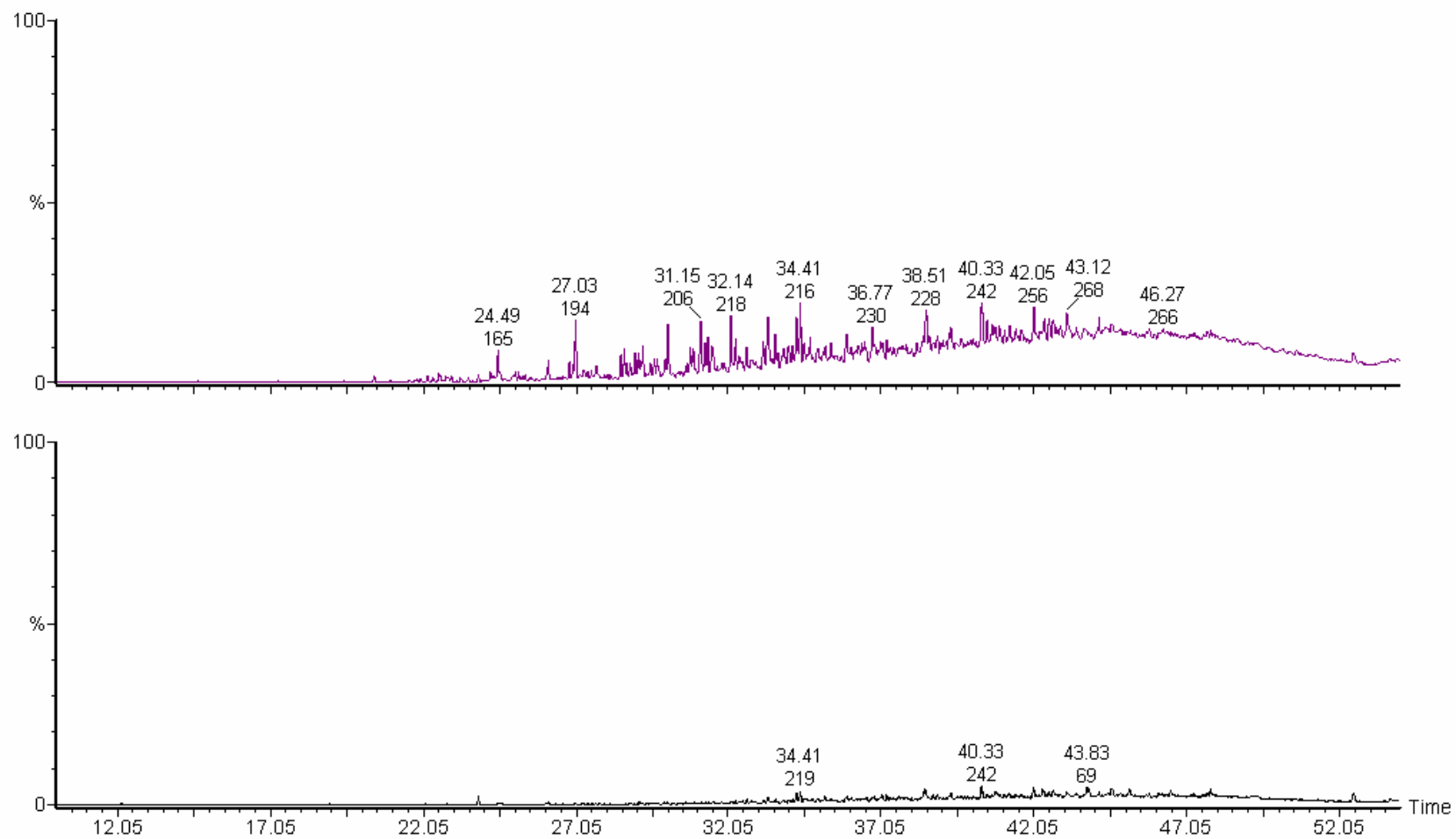


### 8.6.2. Hidrocarbonetos Poliarmáticos (HPAs)

Caixa Branco (A) 0 e 180

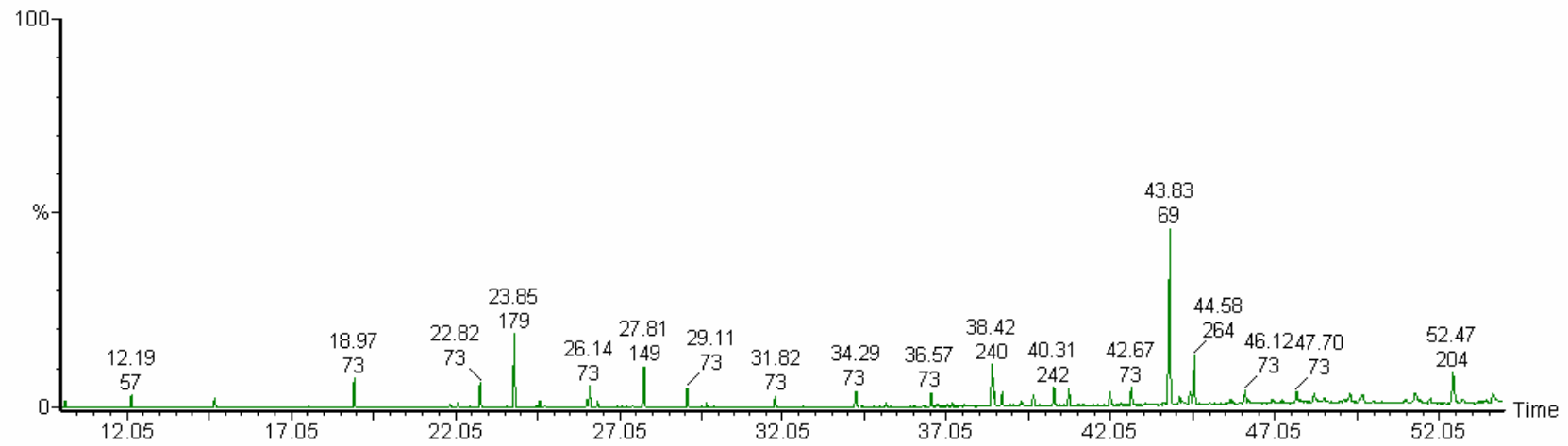
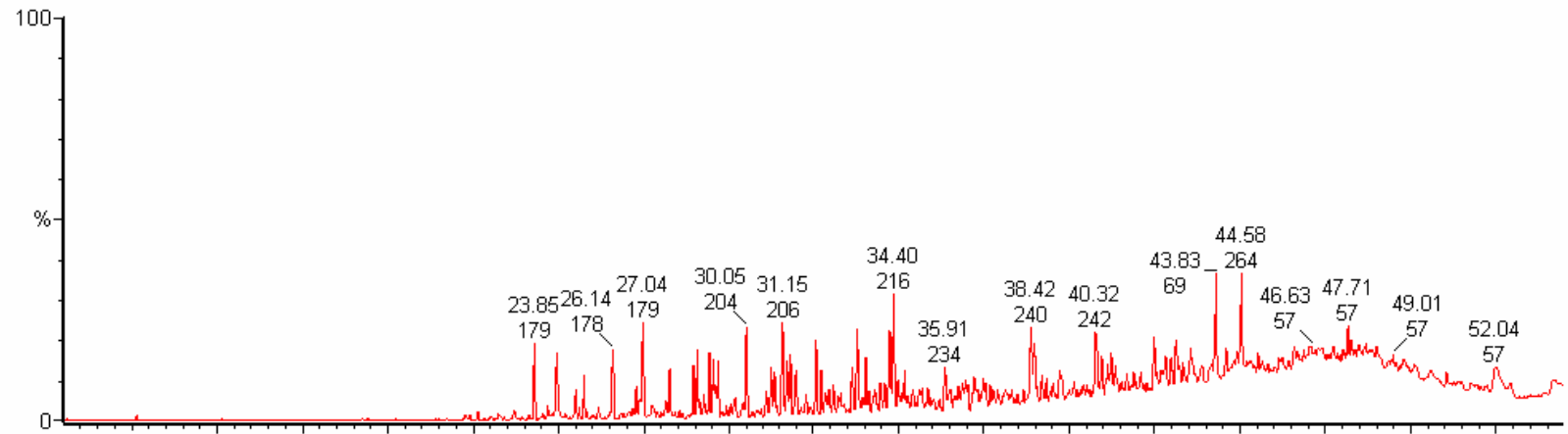


## Caixa Petróleo (B) 0 e 180

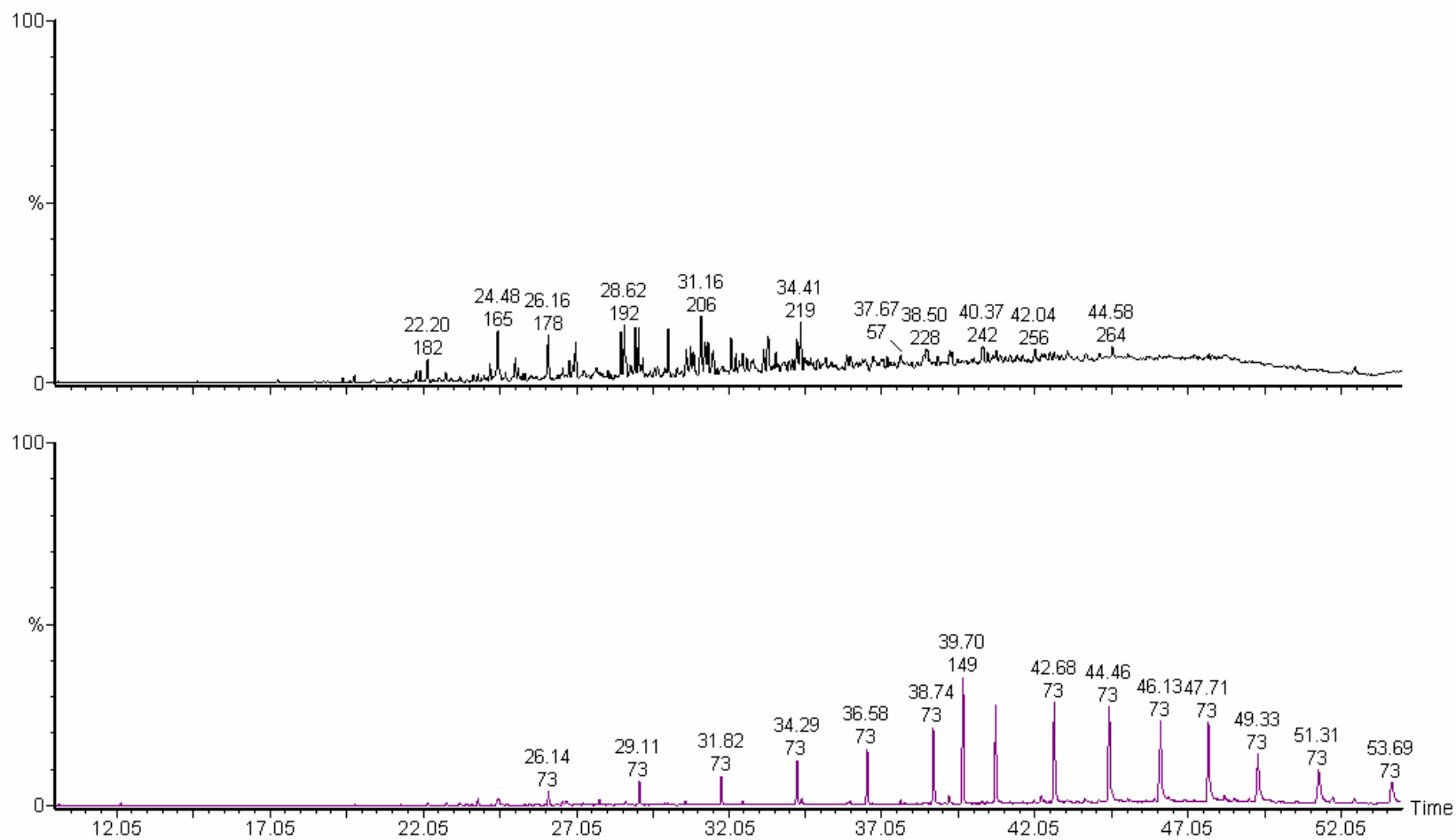




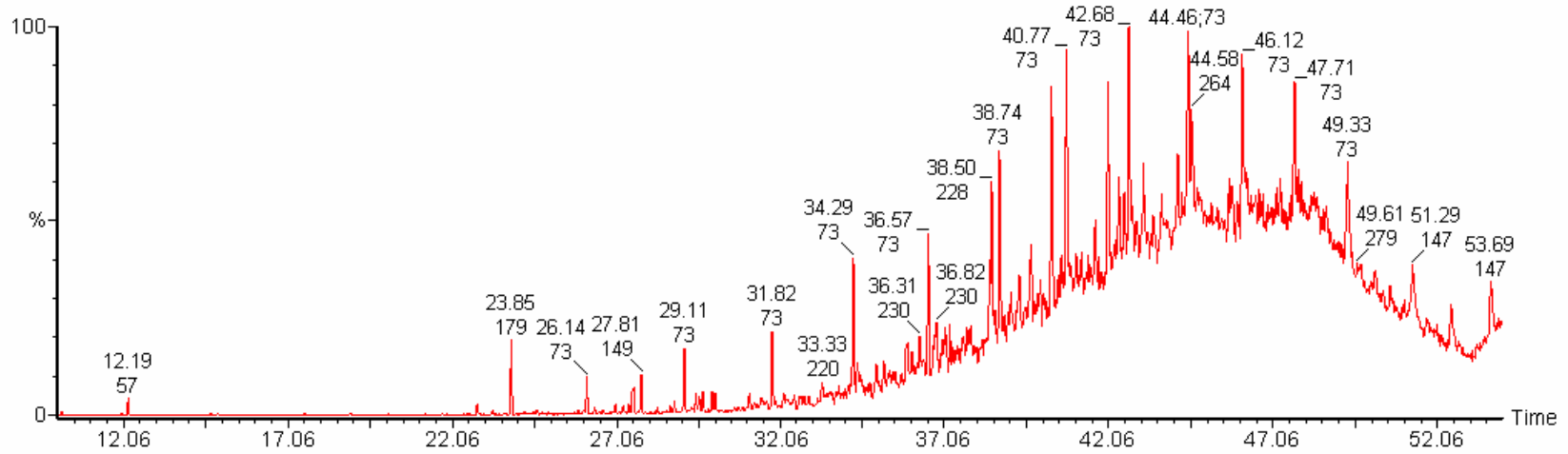
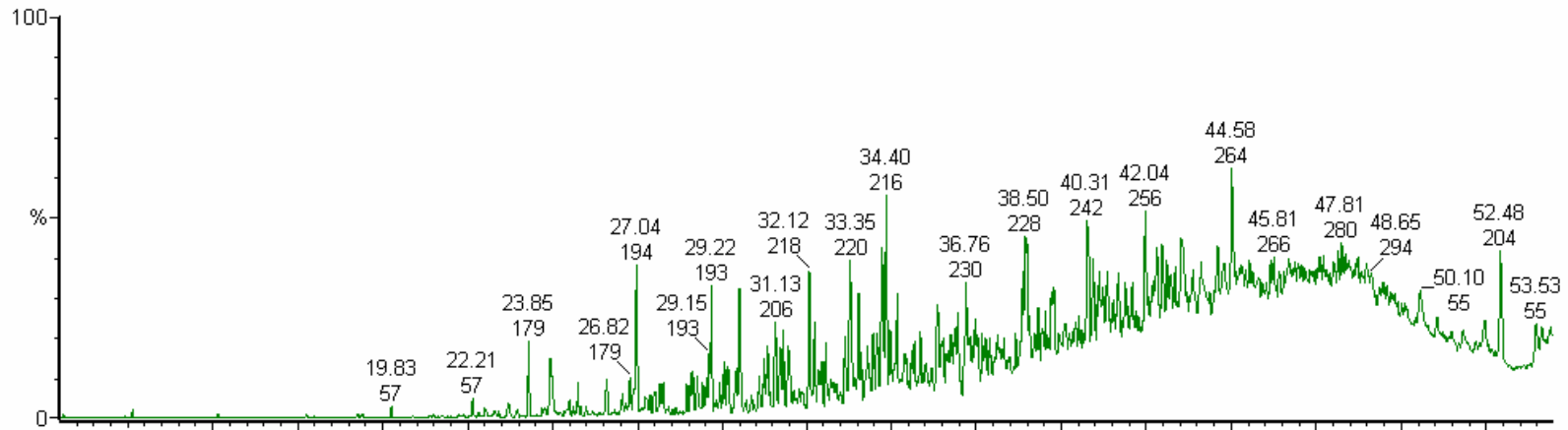
Caixa Nutrientes (C) 0 e 180



## Caixa Biosurfactante (D) 0 e 180



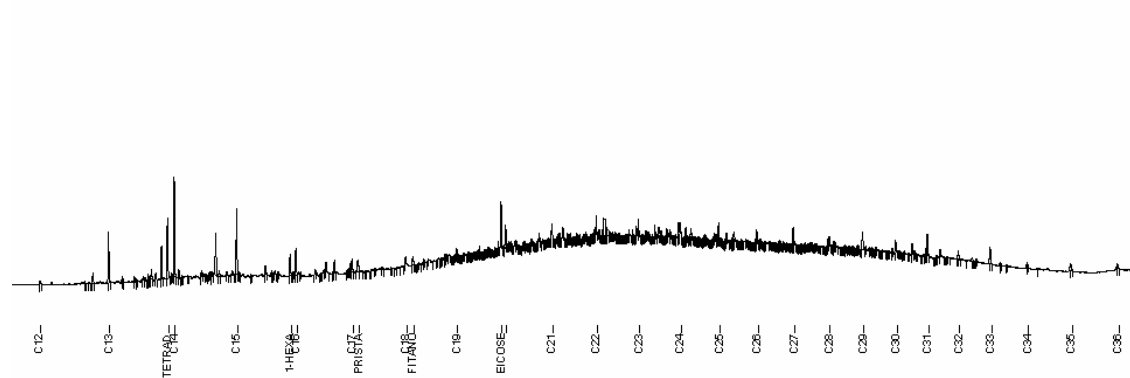
Caixa Biosurfactante/Nutriente (E) 0 e 180



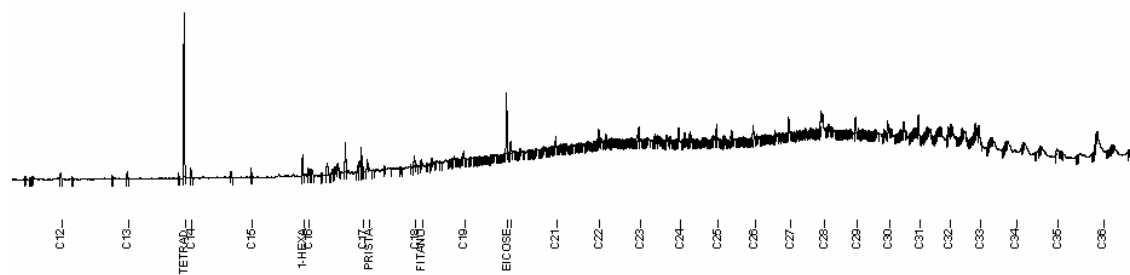
## 8.7. Cromatogramas Experimento II

### 8.7.1. Hidrocarbonetos Alifáticos

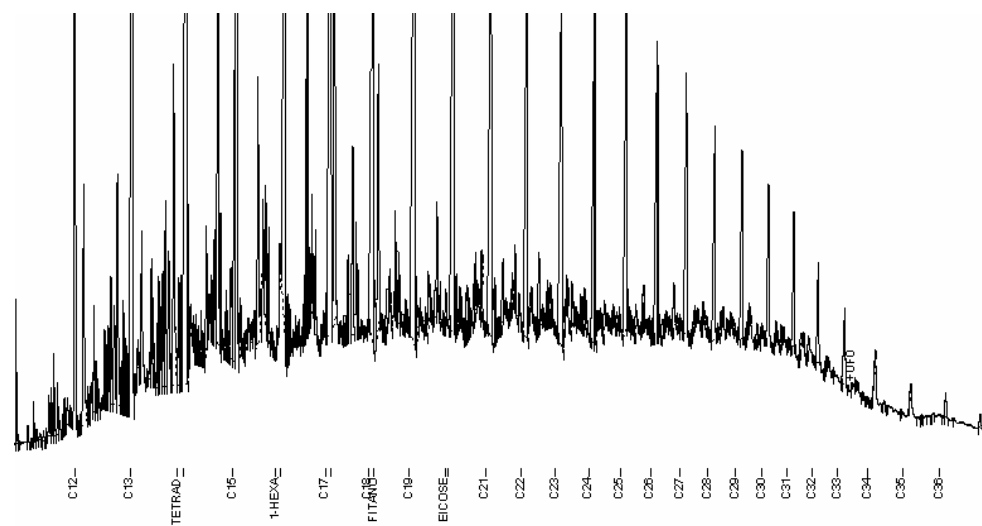
Caixa Branco (F) 0



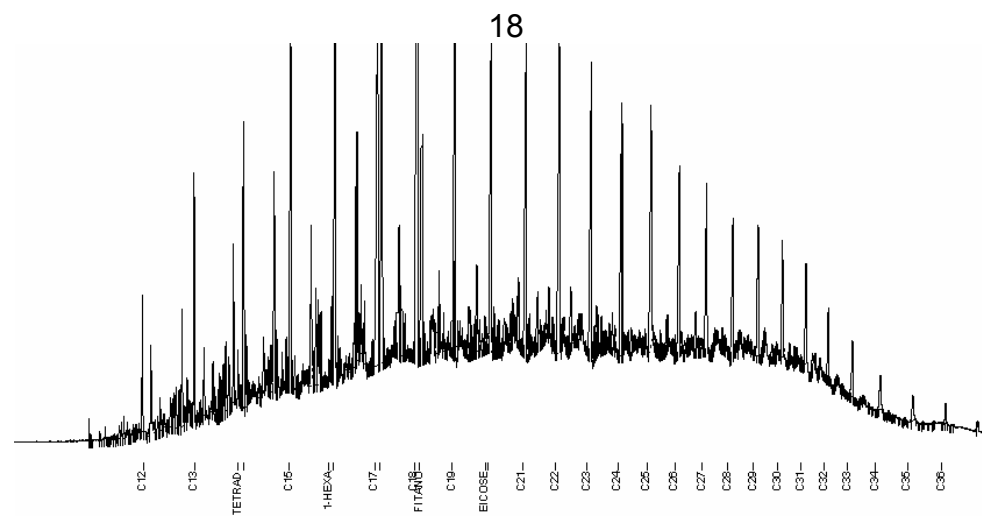
Caixa Branco (F) 180



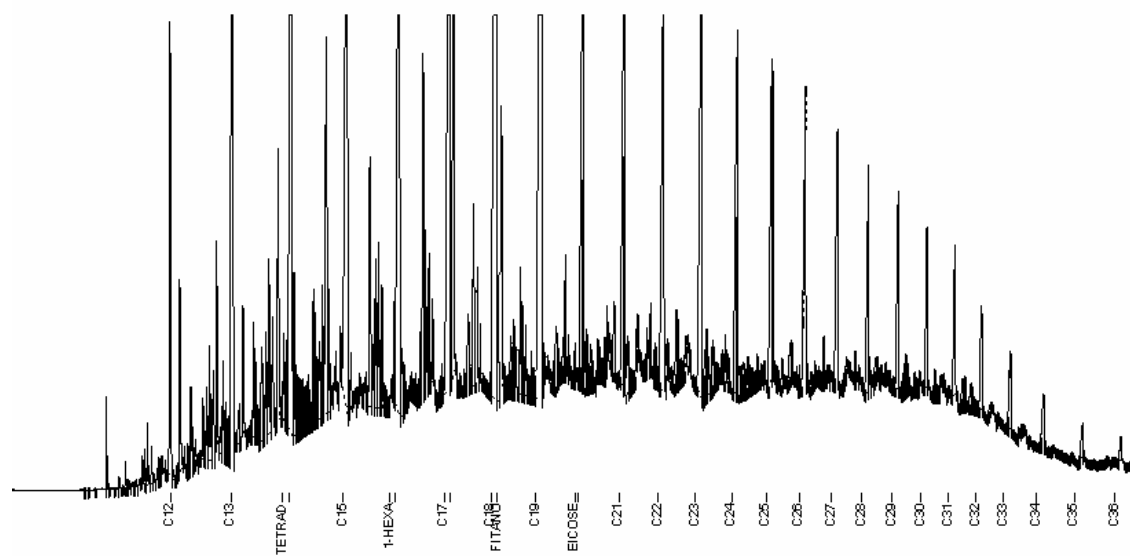
Caixa Petróleo (G) 0



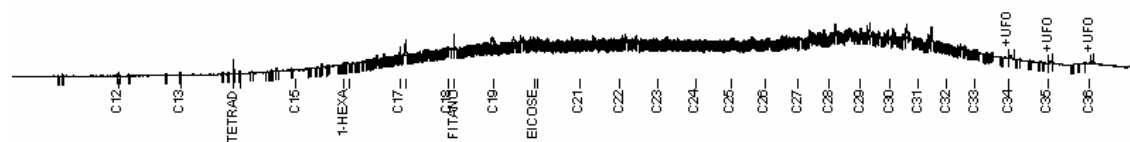
Caixa Petróleo (G) 180



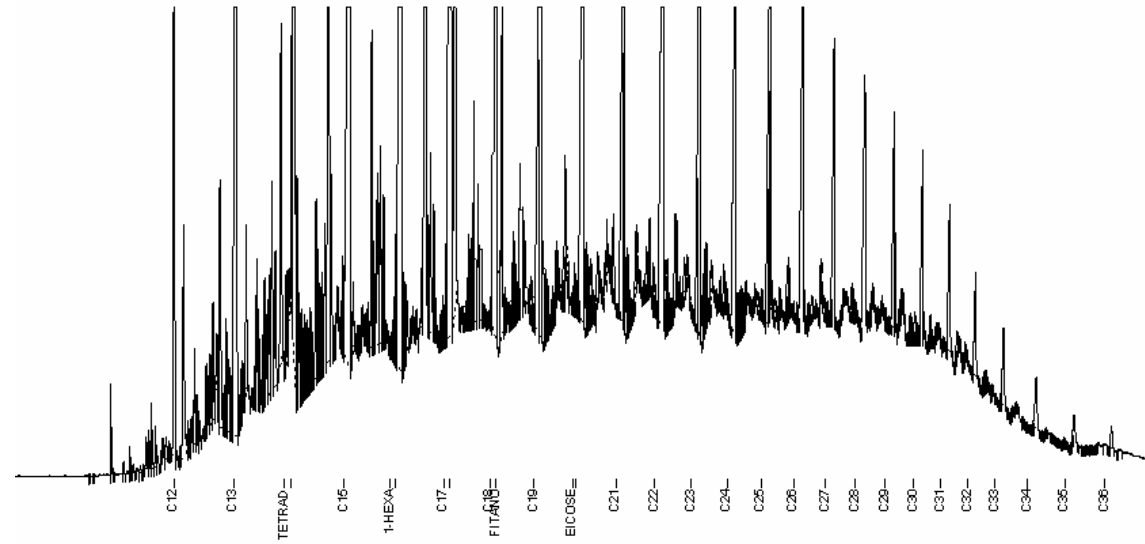
## Caixa Biossurfactante/Nutrientes (H) 0



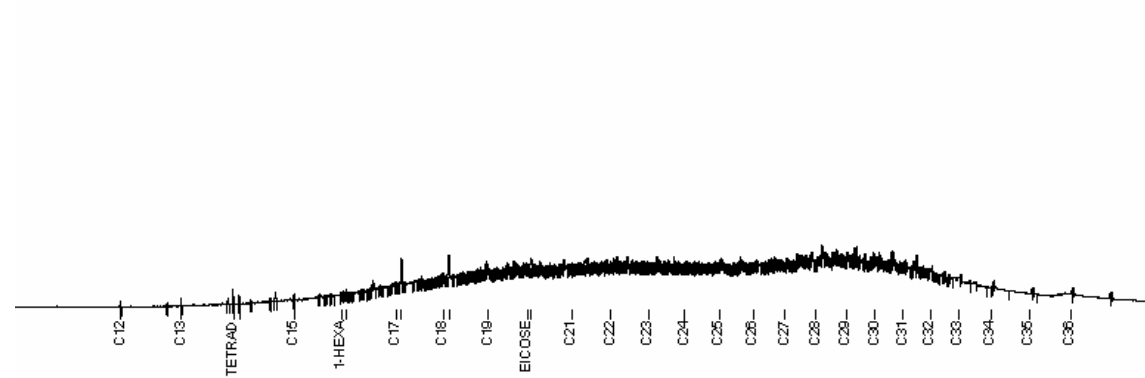
## Caixa Biossurfactante/Nutrientes (H) 180



Caixa Biossurfactante Estéril/Nutrientes (I) 0

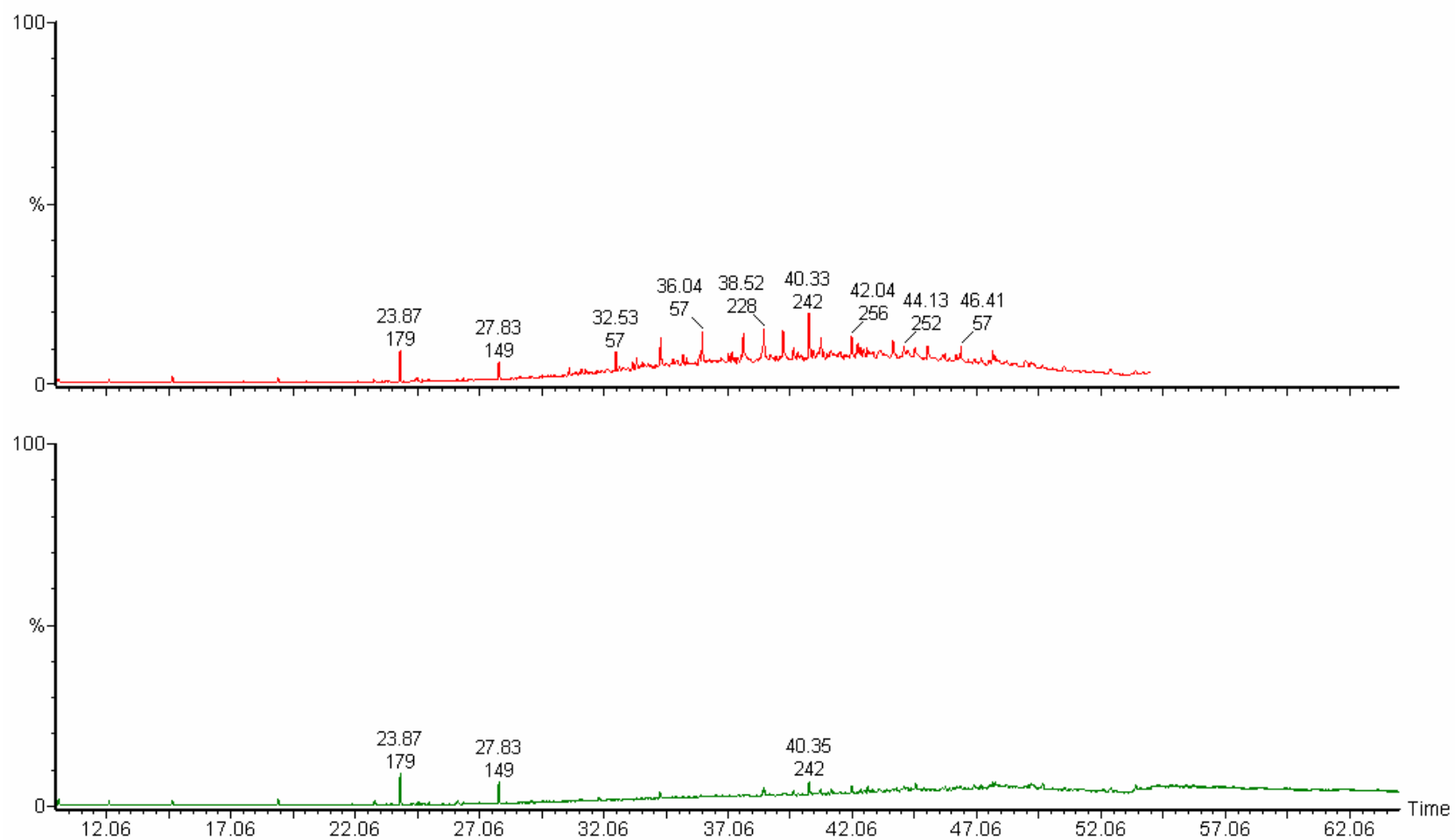


Caixa Biossurfactante Estéril/Nutrientes (I) 180



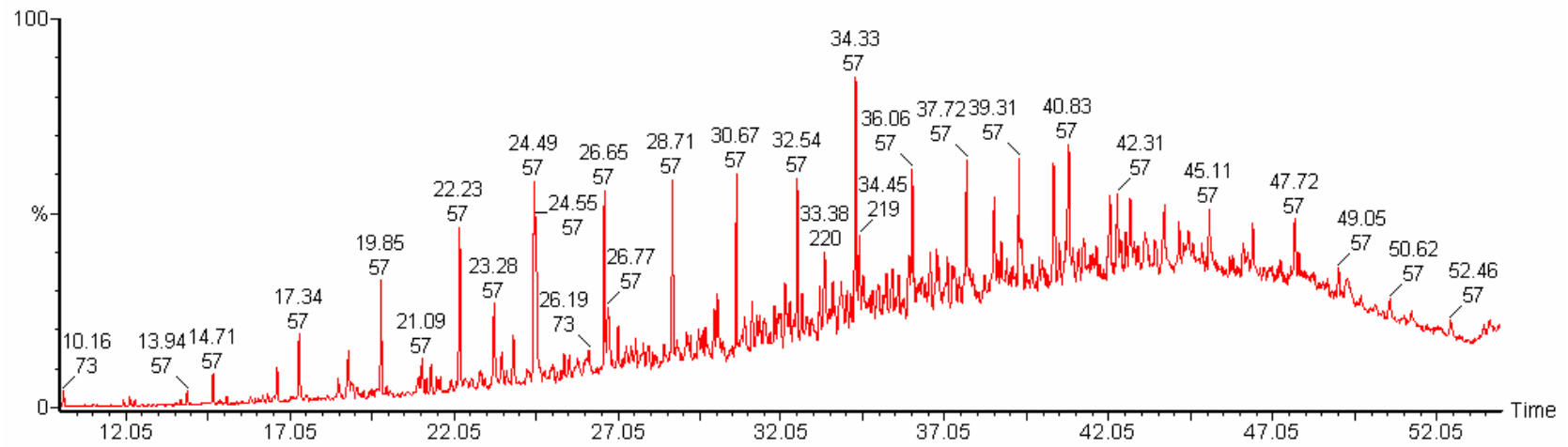
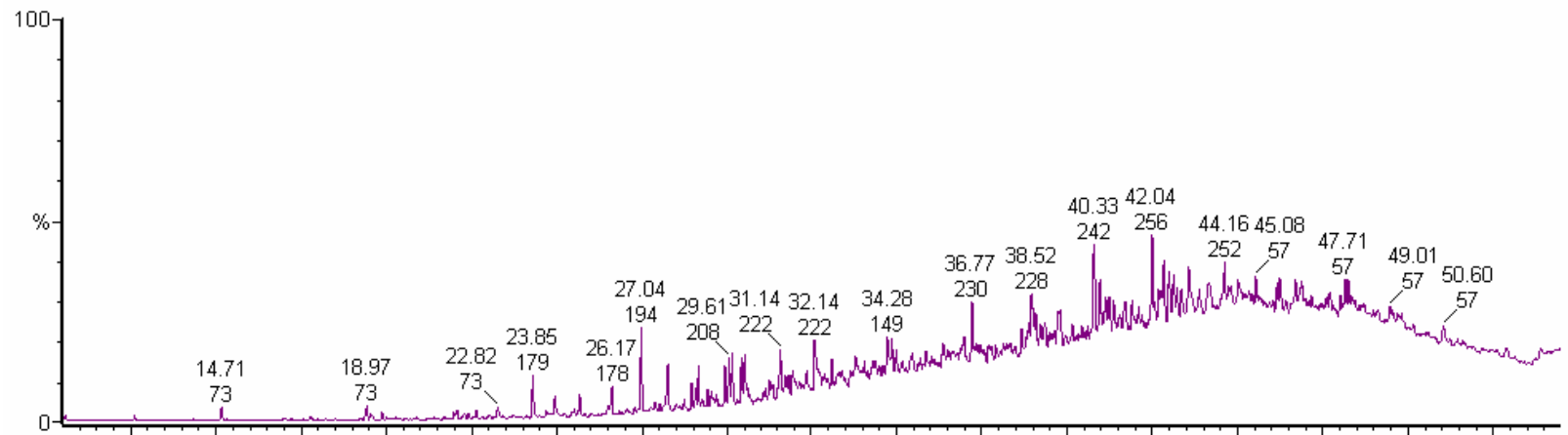
### 8.7.2. Hidrocarbonetos Poliarmáticos (HPAs)

Caixa Branco (F) 0 e 180

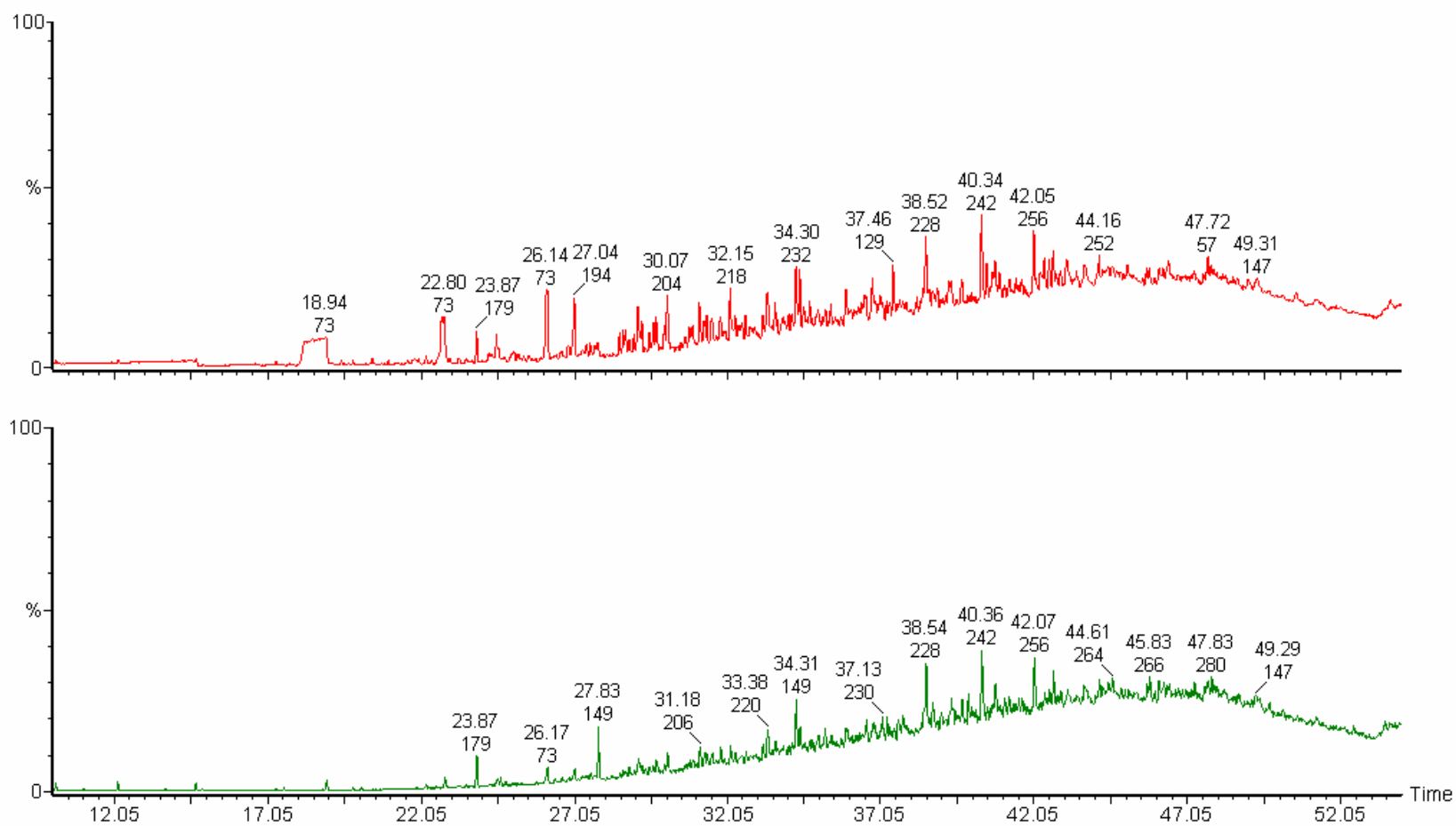




Caixa Petróleo (G) 0 e 180



## Caixa Nutrientes (H) 0 e 180



## Caixa Biosurfactante (I) 0 e 180

