

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS
DE GASOLINA COMERCIAL**

**Aline Schneider Teixeira
(Dissertação)**

**Porto Alegre
2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS
DE GASOLINA COMERCIAL**

Aline Schneider Teixeira
Bióloga (PUCRS)

Dissertação apresentada como
um dos requisitos à obtenção do
Grau de Mestre em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil

Julho de 2007

Aline Schneider Teixeira
Bióloga (PUCRS)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para a obtenção do Grau de

MESTRE EM CIÊNCIA DOS SOLOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência do solo
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em:

Pela banca examinadora

FÁTIMA MENEZES BENTO
Orientadora – PPG Ciência do
Solo/UFRGS

RODRIGO J. S. JACQUES
Co-orientador – Universidade Federal
Santa Maria/RS

PEDRO ALBERTO SELBACH
PPG Ciência do Solo/UFRGS

TANIA M. PIZZOLATO
Depto. de Química Inorgânica/UFRGS

Leandro F. Spinelli
Hospital São Vicente de Paulo – Passo
Fundo/RS

Homologado em:

Por

RENATO LEVIEN
Coordenador do Programa de Pós-
Graduação em Ciência do Solo

GILMAR A. B. MARODIN
Diretor da Faculdade de Agronomia

Aos meus pais, Diamarante e Glaci.

Aos meus irmãos, Denise e Fábio.

Aos meus cunhados André e Valquiria.

Ao meu namorado, Geraldo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus irmãos e cunhados, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao Geraldo, pela presença constante, mesmo estando longe.

Aos professores Fátima Bento e Rodrigo Jacques pela orientação imprescindível e confiança.

À professora Maria do Carmo Ruaro Peralba, pela grande amizade, confiança, paciência e sobre tudo orientação segura.

Às colegas do Laboratório de Química Analítica e Ambiental D110, Anaí, Carla, Denise, Isar, Simone, pela amizade e pelos favores.

Aos colegas do Laboratório de Biorremediação de Solos, Andréa, Daiana, Daniele, Kelly, Patrícia, Robson, pelas longas horas compartilhadas nas atividades de laboratório e pelos churrascos.

Ao Sr. Valdir, pela amizade, pela convivência e pelos favores.

Aos colegas Analu, Jeane, Leandro, Maurício, Osmar e Regilene, pelo agradável convívio durante estes dois anos.

A todos os professores do Departamento de Solos.

Aos vigias do turno da noite, pelo acompanhamento seguro.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Solos, pela oportunidade da realização do curso.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE GASOLINA COMERCIAL¹

Autor: Aline Schneider Teixeira
Orientadora: Fátima Menezes Bento
Co-Orientador: Rodrigo J. S. Jacques

RESUMO

Compostos monoaromáticos conhecidos como BTX (benzeno, tolueno e os isômeros do xileno) estão presentes na gasolina e apresentam características peculiares como uma maior solubilidade em água, alta volatilidade, difícil degradação e potencial de toxigenicidade. A gasolina comercial brasileira se diferencia das demais por conter 24 % de etanol em sua composição, aumentando a solubilidade do BTX em água, através do efeito de co-solvência. Para a remoção de gasolina de áreas contaminadas pode-se utilizar microrganismos com potencial de degradação bem como de produção de biossurfactantes, aumentando a disponibilidade da gasolina no solo ou na água. O presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias com potencial para degradar gasolina comercial, bem como produzir surfactantes. Desta forma, foram isoladas 37 bactérias de solos contaminados com gasolina, sendo que para cinco destes isolados foram determinados a cinética de crescimento, medidas de pH, degradação do etanol, do BTX e dos isômeros do C9 na gasolina comercial, bem como a degradação do etanol puro e a produção de biossurfactantes. Os isolados UFRGS02 e UFRGS04, UFRGS09 e UFRGS10 foram identificados como *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, através do seqüenciamento do gene do RNA ribossomal 16S. Na presença de gasolina comercial, após 24 horas, o isolado bacteriano UFRGS02 degradou 100 % o etanol; 39,9 % o tolueno; 67,0 % os isômeros do xileno e 0,6 % os isômeros do C9. O isolado UFRGS10 degradou 100 % o etanol; 14,5 % o benzeno; 67,0 % o tolueno e 5,9 % os isômeros do xileno. Estes isolados, após 24 horas, na presença do mesmo substrato, reduziram a tensão superficial do meio de 70,2 para 44,4 e 40,6 mN m⁻¹, respectivamente. O isolado UFRGS10 apresentou, após 18 horas, os maiores valores de índice de emulsificação (61,5 %) na gasolina comercial. Foi verificado que ocorreu a degradação preferencial do etanol frente aos hidrocarbonetos da gasolina comercial, em meio mineral. Dependendo do isolado, diferentes percentuais de degradação foram obtidos para os compostos BTX e isômeros do C9 em 24 horas. Também foi verificado que houve produção de biossurfactantes durante a biodegradação da gasolina, pelas bactérias selecionadas.

¹ Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (82p.) – Julho, 2007.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DEGRADING BACTERIA IN COMMERCIAL GASOLINE¹

Author: Aline Schneider Teixeira
Advisers: Fátima Menezes Bento
Rodrigo J. S. Jacques

ABSTRACT

Monoaromatic compounds known as BTX (benzene, toluene and xylems) are present in gasoline and present peculiar characteristics like higher solubility in water, high volatility, difficult degradation and potential genotoxicity. The Brazilian commercial gasoline differs from other gasolines by containing 24% of ethanol in its composition, increasing the BTX solubility in water through the co-solvency effect. In order to remove gasoline from contaminated areas microorganisms with degradation potential and production of biosurfactants, which increase the availability of gasoline in soil and water, can be used. The present work aimed to characterize bacteria with potential to degrade commercial gasoline as well as producing surfactants. A total of 37 bacteria from soil contaminated with gasoline were isolated and in five of these isolates the growth kinetics; the pH; the ethanol, BTX and commercial gasoline C9 isomers degradation; pure ethanol degradation and biosurfactants production were determined. The isolates UFRGS02, UFRGS04, UFRGS09 and UFRGS10 were identified as *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively, through the RNA ribosomal 16S gene sequencing. After 24 hours in the presence of commercial gasoline the bacterial isolate UFRGS02 degraded 100% of the ethanol; 39.9% of the toluene; 67.0% of the xylems and 0,6% of the C9 isomers. The isolate UFRGS10 degraded 100% of the ethanol; 14.5% of the benzene; 67.0% of the toluene and 5.9% of the xylems. After 24 hours, these isolates, in the presence of the same substrate, have reduced the surface tension from 70.2 to 44.4 and 40.6 mN.m⁻¹, respectively. After 18 hours, the isolate UFRGS10 presented the highest emulsification indexes (61.5%) in commercial gasoline. A preferential degradation of ethanol when compared to the gasoline hydrocarbons has been verified in mineral medium. Depending on the isolate, different degradation percentages for BTX and C9 isomers were observed over a 24 hour period. The production of biosurfactants by the selected bacteria was also observed during the gasoline biodegradation.

¹ M.Sc Dissertation in Soil Science. Soil Science Post-Graduation Program, Faculty of Agronomy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (82p.) – July, 2007.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 Gasolina comercial brasileira.....	04
2.1.1 Características físico-químicas.....	04
2.1.1.1 Densidade.....	05
2.1.1.2 Viscosidade.....	05
2.1.1.3 Pressão de vapor e solubilidade.....	05
2.1.2 Utilização de aditivos na gasolina.....	06
2.1.3 Toxicidade.....	07
2.2 Contaminação Ambiental por postos de combustíveis.....	08
2.2.1 Análise de Risco.....	11
2.2.2 Remediação de hidrocarbonetos.....	13
2.2.2.1 Técnicas de remediação.....	13
2.2.2.2 Biorremediação.....	14
2.2.3 Contaminação ambiental com gasolina.....	16
2.2.3.1 Efeitos da mistura etanol-gasolina e a co-solvência.....	18
2.2.3.2 Degradação de etanol pelos microrganismos.....	19
2.2.3.2.1 Degradação aeróbia do etanol.....	20
2.2.3.2.2 Degradação anaeróbia do etanol.....	20
2.2.3.2.3 Toxicidade do etanol.....	21
2.2.3.2.4 Degradação preferencial do etanol em relação aos BTEX.....	22
2.2.4 Degradação microbiana de hidrocarbonetos.....	23
2.2.4.1 Produção de biossurfactantes.....	25
2.2.4.2 Mecanismos de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.....	26
2.2.4.3 Avaliação da degradação.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Isolamento de microrganismos degradadores de gasolina.....	30
3.1.1 Amostragem.....	30
3.1.2 Combustíveis.....	31

3.1.3 Frascos.....	31
3.1.4 Seleção de meios minerais para o isolamento dos microrganismos.....	31
3.1.5 Investigação do poder tamponante do meio mineral selecionado.....	32
3.1.6 Isolamento dos microrganismos degradadores de etanol, BTX e C9.....	32
3.1.7 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados.....	32
3.1.8 Teste de detecção de ramnolipídio.....	33
3.1.9 Identificação dos isolados bacterianos.....	33
3.2 Avaliação da degradação da gasolina comercial pelos isolados obtidos.....	34
3.2.1 Obtenção do inóculo.....	34
3.2.2 Crescimento dos isolados.....	35
3.2.3 Medidas de pH.....	35
3.2.4 Detecção da produção de biossurfactantes/bioemulsificantes.....	36
3.2.5 Ensaio prévio de degradação do etanol em meio mineral ou da gasolina comercial em meio mineral.....	36
3.2.6 Análises cromatográficas.....	37
3.2.7 Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Isolamento de microrganismos degradadores de gasolina comercial.....	39
4.1.1 Seleção de meio mineral para o isolamento dos microrganismos.....	39
4.1.2 Efeito tamponante do meio mineral.....	39
4.1.3 Isolamento e caracterização dos microrganismos degradadores de etanol, BTX e C9.....	40
4.1.4 Análise molecular dos isolados bacterianos.....	42
4.2 Avaliação da degradação da gasolina comercial pelos isolados selecionados.....	42
4.2.1 Seleção da concentração de gasolina comercial no meio....	42
4.2.2 Padronização do inóculo.....	43
4.3 Caracterização do comportamento dos isolados pré-selecionados.....	43
4.3.1 Curvas de crescimento em meio mineral e etanol ou meio mineral e gasolina comercial.....	43
4.3.2 Medidas de pH em meio mineral e etanol ou meio mineral e gasolina comercial.....	46
4.3.3 Degradação de etanol puro em meio mineral ou meio mineral e gasolina comercial.....	49
4.3.4 Tensão superficial em meio mineral e etanol ou meio mineral e gasolina comercial.....	53
4.3.5 Índice de emulsificação em meio mineral e etanol ou meio mineral e gasolina comercial.....	57

4.3.6 Detecção de ramnolipídio.....	61
5. CONCLUSÕES.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
7. APÊNDICES.....	74
Apêndice 1. Cromatograma padrão do etanol em meio mineral ou da gasolina comercial em meio mineral.....	74
Apêndice 2. Meios minerais utilizados, agar nutritivo e caldo nutritivo.....	79
Apêndice 3. Meio azul de metileno.....	80
Apêndice 4. Curva de linearidade da gasolina comercial.....	81
8. VITA.....	82

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Características dos compostos BTEX a 20 °C.....	06
TABELA 2. Algumas características dos isolados degradadores de gasolina.....	41
TABELA 3. Identificação dos microrganismos degradadores de gasolina pelo subseqüenciamento do gene do RNAr 16S.....	42
TABELA 4. Degradação (%) do etanol puro (0,24 %) em meio mineral MM1 e dos compostos etanol, benzeno, tolueno, isômeros do xileno e isômeros do C9 da gasolina comercial (1,0 %) em meio mineral MM1 pelos isolados UFRGS02 e UFRGS10 durante 48 horas e pelos isolados UFRGS04, UFRGS08 e UFRGS09 durante 72 horas, inoculados separadamente.....	50
TABELA 5. tensão superficial do meio mineral MM1 contendo 0,24 % de etanol durante o crescimento dos isolados UFRGS02, UFRGS04, UFRGS08, UFRGS09 e UFRGS10 por 72 horas (dados são médias de três repetições ± erro padrão).....	54
TABELA 6. tensão superficial do meio mineral MM1 contendo 1,0 % de gasolina comercial durante o crescimento dos isolados UFRGS02, UFRGS04, UFRGS08, UFRGS09 e UFRGS10 por 72 horas (dados são médias de três repetições ± erro padrão)....	56
TABELA 7. Medidas de índice de emulsificação do meio mineral MM1 contendo 0,24 % de etanol, durante 72 horas de crescimento os isolados UFRGS02, UFRGS04, UFRGS08, UFRGS09 e UFRGS10.....	58

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Medidas de pH do meio mineral MM1 em resposta a adição de quantidades crescentes de soluções de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ ou de HCl 0,1 mol L ⁻¹	40
FIGURA 2. Curva de crescimento do isolado bacteriano UFRGS02 em meio mineral MM1 contendo 1 % de gasolina comercial (dados são média de duas repetições; barras representam o erro padrão).....	43
FIGURA 3. Curvas de crescimento dos isolados UFRGS02, UFRGS04, UFRGS08, UFRGS09 e UFRGS10 em meio mineral MM1 contendo 0,24 % de etanol ou em meio mineral MM1 contendo 1,0 % de gasolina comercial durante 54 horas (dados são média de duas repetições; barras representam o erro padrão).....	44
FIGURA 4. Medidas de pH do meio mineral MM1 contendo 0,24 % de etanol e do meio mineral MM1 contendo 1,0 % de gasolina comercial durante 54 horas de crescimento dos isolados UFRGS02, UFRGS04, UFRGS08, FRGS09 e UFRGS10.....	47
FIGURA 5. Cromatograma padrão do etanol em meio mineral obtido por HS GC FID.....	74
FIGURA 6. Cromatograma padrão da gasolina comercial em meio mineral obtido por HS GC FID, indicando a faixa de tempo de retenção do etanol, benzeno, tolueno, isômeros do xileno e isômeros do C9.....	75
FIGURA 7. Cromatograma padrão da gasolina comercial em meio mineral obtido por HS GC FID com expansão em torno do tempo de retenção do etanol.....	75
FIGURA 8. Cromatograma padrão da gasolina comercial em meio mineral obtido por HS GC FID com expansão em torno do tempo de retenção do benzeno.....	76

FIGURA 9. Cromatograma padrão da gasolina comercial em meio mineral obtido por HS GC FID com expansão em torno do tempo de retenção do tolueno.....	77
FIGURA 10. Cromatograma padrão da gasolina comercial em meio mineral obtido por HS GC FID com expansão em torno do tempo de retenção dos isômeros do xileno.....	78
FIGURA 11. Cromatograma padrão da gasolina comercial em meio mineral obtido por HS GC FID com expansão em torno do tempo de retenção dos isômeros do C9.....	78
FIGURA 12. Curva de linearidade com soluções de meio mineral e gasolina comercial na faixa de concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2 % (v/v). Concentração padrão da gasolina comercial no tempo de retenção dos C9.....	81

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes decorrentes de vazamentos e derrames de petróleo ou de seus derivados têm preocupado a indústria, o Poder Público e a sociedade civil. Entre os derivados, a gasolina merece destaque, pela periculosidade no solo ao entrar em contato com a água subterrânea ou pela possibilidade de explosões.

No Brasil, a preocupação com o armazenamento subterrâneo de gasolina acentua-se com o passar dos anos, uma vez que a maioria destes tanques foram construídos na década de 70 e colocados em contato direto com o solo, sem nenhuma proteção. A vida útil média prevista foi de 25 anos, o que alerta para o aumento da ocorrência de vazamentos no país, resultando em graves problemas ambientais pela contaminação do solo, do subsolo e conseqüentemente da água subterrânea. O estado de São Paulo através da Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) divulgou um levantamento sobre atividades poluidoras, em novembro de 2006, mostrando que os postos de combustíveis contribuem com 74% (1.352 casos) no número total de áreas contaminadas registradas naquele estado por esta atividade. Este levantamento é resultado da ação rotineira de fiscalização e do desenvolvimento do programa de licenciamento para esta atividade.

A gasolina pode apresentar diferentes composições devido à procedência do petróleo, mas os hidrocarbonetos que causam maior preocupação são os compostos monoaromáticos chamados compostos BTEX, que são o benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três isômeros de posição do xileno. Estes contaminantes são considerados substâncias perigosas por serem depressores do sistema nervoso central e por causarem leucemia em exposições crônicas. Dentre os

BTEX, o benzeno é considerado o mais tóxico e é o mais solúvel em água, com solubilidade de $1,791 \text{ mg L}^{-1}$ sendo o limite de potabilidade exigido pelo Ministério da Saúde para este composto é de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Além disto, a gasolina brasileira tem a peculiaridade de conter 24% de etanol, o que a torna diferente da gasolina dos outros países. No caso de vazamentos em estágio avançado de tanques subterrâneos de gasolina, o etanol presente neste combustível, sendo ele completamente miscível em água, facilitará a extensão da contaminação (ou da pluma de contaminação), devido a migração preferencial à fase aquosa. É possível que uma concentração alta de etanol facilite a transferência de hidrocarbonetos aromáticos mais solúveis, como os BTEX, para a fase aquosa, aumentando as concentrações destes contaminantes na água subterrânea, processo denominado de co-solvência.

A grande maioria das pesquisas que dedicam-se ao estudo dos impactos ambientais da gasolina estão relacionadas às contaminações das águas subterrâneas. Para isto é necessário que a gasolina migre através do solo, que é o meio que suporta as instalações de armazenamento de combustíveis e que primeiramente recebe o vazamento. Neste sentido, os projetos de remediação de solos e águas subterrâneas devem sempre considerar os ecossistemas em que estão inseridos. Muitos projetos normalmente se baseiam em processos apenas de remoção física das fases contaminantes. Porém para o sucesso de um projeto de remediação de uma dada área é necessário iniciar avaliação com um extenso trabalho de levantamento hidrogeológico, geoquímico e microbiológico do local e conhecimento detalhado das propriedades físicas e químicas do contaminante. As condições devidamente estudadas irão nortear não apenas a melhor tecnologia de extração ou eliminação dos contaminantes a ser usada, como também determinarão se a biodegradação dos poluentes será possível, o que normalmente pode ocorrer com ou sem o estímulo da população microbiana do local. Para remediar as áreas impactadas por derrames de gasolina pode-se utilizar diversas tecnologias como a extração de vapores, injeção de ar, extração multifásica, todas com alto custo de implementação e operação.

A biorremediação conta com o processo de degradação dos compostos orgânicos constituintes dos combustíveis pelos microrganismos do local impactado e trata-se de uma alternativa viável, de baixo custo de operação e instalação. Entre as estratégias usadas para a biorremediação de gasolina, destacam a biorremediação passiva (atenuação natural monitorada) e a bioestimulação. O uso da atenuação natural monitorada, ao contrário do que se possa imaginar, não simboliza passividade: o combustível ou um dado contaminante é biodegradado pelos microrganismos nativos. Afora o fato de ser largamente empregada em países mais desenvolvidos, tem eficiência comprovada em vários casos, e ainda constitui-se em uma solução viável do ponto de vista ambiental e econômico. Na bioestimulação, a microbiota degradadora recebe nutrientes inorgânicos e ou receptores de elétrons (oxigênio, sulfato, nitrato) para estimular o seu crescimento.

Em determinados vazamentos, os compostos da gasolina podem associar-se com a fase sólida do solo (principalmente a matéria orgânica) ou alguns deles podem ser pouco solúveis (principalmente os de cadeia mais longa), o que resulta em baixa biodisponibilidade dos poluentes aos microrganismos, uma vez que estes somente absorvem compostos que estejam dissolvidos na água. Para superar esta limitação, os microrganismos podem produzir biossurfactantes, que são moléculas constituídas de uma fração polar e uma apolar, que aumentam a disponibilidade dos poluentes apolares na água por reduzirem a tensão interfacial entre os dois líquidos, facilitando a formação de microemulsões.

Neste sentido, os objetivos deste estudo foram isolar e caracterizar bactérias obtidas a partir de amostras de solos contaminados com hidrocarbonetos e gasolina; avaliar em meio líquido (meio mineral) se existe a degradação preferencial de etanol pelas bactérias bem como da fração BTX e C9, utilizando como fonte de carbono a gasolina comercial (que contém etanol) e o etanol puro e avaliar a produção de biossurfactantes pelos microrganismos durante a degradação destes combustíveis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gasolina comercial brasileira

A gasolina é um derivado do petróleo produzido na faixa de destilação que varia de 30 a 220 °C, formada por uma mistura de diversos tipos de hidrocarbonetos: parafínicos (cadeias lineares com ligações simples), naftalênicos (cadeias fechadas com ligações simples), aromáticos (cadeia fechada com ligações duplas alternadas $2n+2$) e mistos, com 4 a 10 átomos de carbono. No total a gasolina pode apresentar mais de 230 compostos (Cunha, 1996; Marchal et al., 2003). Nessa mistura complexa de hidrocarbonetos alguns compostos apresentam diferentes graus de volatilização e solubilidade, com cadeias carbônicas compreendidas na faixa de 5 a 10 carbonos por molécula (Morais & Tauk-Tornisielo, 2004).

No Brasil, é utilizada uma gasolina diferenciada, pois trata-se de uma mistura de 76% de gasolina e 24% de álcool etílico (etanol). O teor de álcool na gasolina é especificado pela Agência Nacional do Petróleo – ANP, e é objeto de lei federal. A gasolina que compõe essa mistura é produzida, em sua grande maioria, pelas refinarias da Petrobrás. A gasolina proveniente das refinarias é armazenada nos terminais de distribuição e recebe a adição de 20 a 24% de etanol, no momento que é colocada nos caminhões-tanque.

2.1.1 Características físico-químicas da gasolina

A gasolina apresenta uma composição química muito diversificada e algumas propriedades físicas importantes que sempre devem ser consideradas na avaliação durante um cenário de contaminação ambiental. Serão abordadas

alguns aspectos com relação a densidade, viscosidade, pressão de vapor e solubilidade.

2.1.1.1 Densidade: a densidade é definida como massa por unidade de volume. A densidade da gasolina é de $0,75 \text{ g mL}^{-1}$, seu valor é inferior a densidade da água que é de $0,998 \text{ g mL}^{-1}$ a 15°C , fazendo com que em um possível vazamento, esta flutue sobre a água. A gasolina é classificada como LNAPL (“light non-aqueous phase liquids”), isto é fase líquida imiscível leve ou menos densa que a água. A densidade da gasolina varia em função da sua composição e temperatura, já a densidade do etanol é de $0,79 \text{ g mL}^{-1}$, também inferior a da água.

2.1.1.2 Viscosidade: é a resistência que um gás ou líquido oferece ao fluxo. Um aumento na temperatura tende a baixar a viscosidade e pode causar uma mobilidade maior da gasolina no solo. Quando o etanol é adicionado a gasolina, também ocorre a diminuição de sua viscosidade, com conseqüente aumento da sua mobilidade.

2.1.1.3 Pressão de vapor e Solubilidade: a pressão de vapor p_i é a pressão do composto orgânico puro com seu próprio vapor a uma determinada temperatura. É o parâmetro que mede a volatilidade de um composto. A pressão de vapor de uma substância é menor em misturas do que o composto puro, este comportamento é dado pela Lei de Raoult. A solubilidade de um composto químico é a máxima concentração deste composto que vai se dissolver na água pura em uma temperatura específica. A solubilidade das misturas é uma das propriedades que afetam o transporte dos compostos químicos no meio ambiente. Os compostos químicos presentes na gasolina apresentam vários graus de solubilidade em água. Alguns aditivos como os álcoois são altamente solúveis, outros componentes como o benzeno, etilbenzeno e os isômeros do xileno são menos solúveis.

Tabela 1. Características dos compostos BTEX a 20 °C.

Composto	Fórmula	Peso molecular	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Densidade (g mL ⁻¹)
Benzeno	C ₆ H ₆	78	1780	0,87
Tolueno	C ₆ H ₅ CH ₃	92	515	0,87
Etil-benzeno	C ₆ H ₅ C ₂ H ₅	106	150	0,86
Xileno	C ₆ H ₄ (CH ₃) ₂	106	175	0,86

Fontes: Ferreira (2003) e FISPQ (2005)

2.1.2 Utilização de aditivos na gasolina

As necessidades mundiais de criar alternativas para a redução do consumo dos combustíveis derivados do petróleo levaram a adição de produtos oxigenados, como os álcoois e éteres, na gasolina automotiva (Silva Santos, 1998). Hoje esta adição se justifica ainda mais pelos problemas ambientais já constatados devido a emissão de enormes quantidades de CO₂ na atmosfera pelos combustíveis fósseis. Desde janeiro de 1992, a gasolina brasileira é isenta de chumbo. O chumbo era utilizado mundialmente para aumentar a octanagem da gasolina, mas por questões ambientais, foi sendo gradualmente eliminado. Para a caracterização de gasolinas, utiliza-se no mundo inteiro a octanagem. A octanagem mede a resistência da gasolina a detonação, que se for baixa, pode perder a potência e causar danos ao motor (Ferreira, 2003).

Em agosto de 1999, a Agência de Proteção Ambiental Americana recomendou a eliminação gradual, porém em curto prazo (até 4 anos), do uso de MTBE (éter metílico terc-butílico) na gasolina em todo o país. Estas medidas foram reforçadas, em janeiro de 2000, quando o presidente norte-americano declarou apoio para a produção de combustíveis limpos e renováveis. Enfatizando a importância do álcool etílico como o mais correto oxigenado a ser adicionado à gasolina, para reduzir a poluição do ar, combater o efeito estufa e desenvolver a agroindústria (Szwarc, 2000).

2.1.3 Toxicidade

Os hidrocarbonetos monoaromáticos presentes na gasolina como o benzeno, tolueno, os isômeros do xileno e etilbenzeno (fração aromática), chamados compostos BTEX, são considerados agentes carcinogênicos. No caso de um derrame, estes serão os componentes que primeiro irão atingir o lençol freático, pois apresentam a maior solubilidade em água. Devido a sua toxicidade, os BTEX são citados na maioria das listas de referência para água potável. Neste sentido, o benzeno é considerado o mais tóxico, com o padrão de potabilidade de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, definido pelas normas do Ministério da Saúde (Corseuil & Marins, 1997; Morais & Tauk-Tornisielo, 2004; Corseuil *et al.*; 2004; Tiburtius & Peralta-Zamora, 2004).

As intoxicações causadas pela ingestão de gasolina provocam sinais e sintomas que incluem falta de coordenação, agitação, excitação, confusão, desorientação, ataxia, delírio e finalmente coma, que pode estender-se por algumas horas ou vários dias. A inalação de concentrações altas de vapores da gasolina como, por exemplo, por trabalhadores que limpam tanques de armazenamento e/ou que trabalham como frentistas, pode causar morte imediata ou em algumas horas. Os vapores da gasolina sensibilizam o miocárdio, de forma que quantidades pequenas de epinefrina circulante podem desencadear fibrilação ventricular (muitos hidrocarbonetos exercem essa ação). As concentrações altas do vapor da gasolina também podem causar depressão rápida do sistema nervoso central e óbito devido à insuficiência respiratória (Klaassen, 2003). Segundo Spinelli (2005), estudos em cobaias mostraram que a inalação de concentrações altas por algumas horas, podem desenvolver pneumonite.

Depois de uma exposição aguda a uma grande quantidade de benzeno, por ingestão ou inalação dos vapores concentrados, o efeito tóxico principal ocorre no sistema nervoso central (Cairney *et al.*, 2002). As células da medula óssea que se encontram nas fases iniciais do desenvolvimento são as mais sensíveis ao benzeno e a parada da maturação acarreta depleção gradativa das células circulantes. O tolueno é depressor do sistema nervoso central e concentrações

baixas causam fadiga, fraqueza e confusão, podendo levar a arritmias ventriculares, inibição do reflexo vagal, depressão respiratória e anoxia.

Spinelli (2005) estudando os efeitos da exposição de ratos a gasolina evidencia que a toxicidade do benzeno está relacionada ao seu metabolismo. Os metabólitos envolvidos são o fenol, a hidroquinona, o catecol e provavelmente o óxido de benzeno. Inicialmente ocorre a formação do dióxido de benzeno, com meia-vida de 8 minutos no sangue de ratos, sugerindo que transloque-se do fígado para a medula óssea. Uma vez que este óxido é um composto eletrolítico estável, pode contribuir diretamente para a toxicidade do benzeno. Um outro mecanismo de toxicidade proposto é a metabolização da hidroquinona na medula óssea, produzindo a p-benzoquinona, que seria a responsável pelos efeitos leucemogênicos. Experimentos *in vivo*, entretanto, mostraram que o fenol ou a hidroquinona sozinhos não causam lesões significativas à medula óssea em ratos, apenas quando em conjunto.

De acordo com as informações científicas obtidas de estudos realizados com cobaias (ratos) após exposição à gasolina por um determinado tempo, foram detectados tumores nos rins e pulmões. Por isso, estes compostos são utilizados como indicadores de poluição em ambientes contaminados (Cunha, 1996).

2.2 Contaminação ambiental por postos de combustíveis

Os problemas com o armazenamento subterrâneo de combustíveis (gasolina e óleo diesel) tem alertado aos que estocam incorretamente o combustível e aos órgãos ambientais, pois as conseqüências ao longo do tempo podem comprometer o solo, o subsolo e os aquíferos naturais. No Brasil, os impactos ambientais envolvendo derrames acidentais, provocados especialmente por gasolina, durante o armazenamento, ocorre com os tanques de estocagem subterrâneos que apresentam problemas de corrosão e vazamento nos primeiros 20 anos após a instalação, o que aumenta a ocorrência de áreas contaminadas devido a vazamentos (Corseuil & Martins, 1997).

Neste sentido, o Estado de São Paulo através da CETESB (Companhia de Tecnologia Ambiental do Estado de São Paulo) foi pioneiro em disponibilizar o

levantamento sobre atividades poluidoras, destacando-se os postos de combustíveis com o registro de 1.352 casos. O conhecimento sobre o número de casos é resultado da ação rotineira de fiscalização e do desenvolvimento do programa de licenciamento. O preocupante número de ocorrências nesta atividade deve-se a vazamentos causados pela falta de manutenção de equipamentos, pela deterioração de tanques e tubulações e, também, por falhas operacionais decorrentes do despreparo dos profissionais que atuam nesses estabelecimentos (CETESB, 2006). Desta forma, os postos de gasolina, em sua maioria, estão sendo obrigados a adotar tecnologias de remediação, além de precisarem substituir os tanques antigos por outros de parede dupla.

A Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Porto Alegre, RS (SMAM) possui um programa implantado na década de 90 que recebe denúncias de vazamento de combustível em postos de serviços. Os fiscais da Secretaria Municipal do Meio Ambiente (SMAM), após a notificação, são orientados a interditar o posto de combustível que funciona sem licença ambiental e exigir a apresentação da análise da água subterrânea e do solo para verificar a existência de contaminação. Para retomar a venda de combustível é necessário apresentar um projeto prevendo medidas para cessar os danos causados. Esta ação é resultado de um estudo desenvolvido em 2005 para regularização dos Sistemas de Armazenamento Subterrâneo de Combustíveis, basicamente dos tanques de combustível. O trabalho foi realizado pela Equipe de Controle da Poluição do Solo da SMAM e visa exigir o cumprimento da legislação em vigor, relativa ao licenciamento ambiental, controlando essas atividades ininterruptamente.

Os estabelecimentos que incorreram em infrações tais como: a contaminação do solo e das águas, paralisação das medidas de remediação de danos exigidas pela SMAM, sem aviso prévio à secretaria e operação sem licença ambiental, serão interditados. Atualmente existem em Porto Alegre 318 Sistemas de Abastecimento Subterrâneo de Combustíveis, dos quais 90% (287) localizam-se em postos de abastecimento e os demais em empresas de ônibus, garagens, transportadoras e clubes. Desse total, 23% possui licença ambiental em vigor e

9,5% nunca encaminharam pedidos de licenciamento à SMAM, sendo que os demais possuem processo em andamento. (Comunicação Social, SMAM, 2006).

Um vazamento expõe a população a iminente risco de segurança, gera danos ambientais, como a contaminação do solo, subsolo, águas subterrâneas e poluição atmosférica. Desde maio de 1992, a SMAM também condicionou o licenciamento de novos postos de abastecimento e de empresas que utilizam tanques subterrâneos de combustível a implantação de sistemas de proteção e detecção de vazamentos. Em 1996 todos estes condicionantes foram incorporados ao Decreto Municipal Nº 11.423-96 que institui a obrigatoriedade do atendimento dos seguintes itens: caracterização do solo e subsolo; comportamento hidrológico do empreendimento; descrição das condições de assentamento dos tanques; discriminação dos equipamentos de monitoramento para a detecção de vazamentos; tanques subterrâneos de paredes duplas e de tubulações flexíveis e encamisadas. Somente após o atendimento dos dispositivos do decreto, ocorre a aprovação dos projetos de viabilidade para a implantação das atividades.

Os problemas com infiltrações de combustíveis no solo, devido a corrosão dos tanques, em geral, são detectados em estágios avançados. A legislação americana, através de órgãos como a Agência de Proteção Ambiental (EPA), tem proposto algumas medidas como:

- a) o uso de tanques de paredes duplas, visando conter o depósito propriamente dito;
- b) proteção catódica;
- c) utilização na confecção dos tanques, de material resistente à corrosão e de conhecida compatibilidade com a substância estocada e, principalmente, medidas preventivas contra vazamentos resultantes de corrosão ou de falhas estruturais e operacionais durante a vida do tanque (Uller, 1996).

Com relação às medidas de proteção contra a corrosão dos tanques, estão envolvidas tecnologias diversas, que incluem o emprego de revestimentos convencionais a base de tintas, revestimentos espessos a base de fibra de vidro, proteção catódica e a própria construção do tanque inteiramente em fibra de vidro

(Uller, 1996). O aparecimento de vazamentos é, principalmente, causado por perfurações das paredes dos tanques, pelo fato de estes possuírem maior exposição da superfície metálica no solo. Alguns fatores como os procedimentos de fabricação, aplicação de revestimentos, transporte e instalação dos tanques, são fundamentais para o perfeito funcionamento dos equipamentos durante o armazenamento (Uller,1996).

2.2.1 Análise de Risco:

A recuperação de solos e águas subterrâneas impactadas por acidentes envolvendo petróleo e seus derivados, geralmente envolve altos custos e longos períodos de tempo. Neste caso, a adoção de critérios como o seguido para a exigência de potabilidade de água não é adequada, uma vez que grandes gastos podem ser feitos em locais de poucos riscos ao ambiente (Corseuil & Marins, 1998). Frente a necessidade de implantação de regras específicas para a avaliação da contaminação principalmente de solos, países como os Estados Unidos e a Holanda, desenvolveram metodologias de avaliação de áreas impactadas. Neste sentido, é levado em consideração a análise de risco, como ferramenta na tomada de decisões, onde os padrões são estabelecidos, considerando-se as condições e os riscos do local contaminado. Segundo Schneider (2005) devido aos altos custos envolvidos nos processos de recuperação de uma área impactada a tomada de decisões sobre as metas de remediação geralmente é baseada nos resultados obtidos em Avaliações de Riscos à Saúde Humana e ao Meio Ambiente. Neste sentido, a avaliação de riscos fornece o embasamento científico necessário para a tomada de decisões que priorizem as áreas a serem remediadas em função do risco admissível para o local, como a concentração de um dado poluente.

No Brasil o custo de remediação de uma área contaminada em uma região central de uma cidade custa em média 20% do valor do terreno recuperado. Com exceção do Estado de São Paulo que possui uma proposta de metodologia de avaliação de risco em caráter preliminar, os outros Estados não possuem metodologias regulamentadas. Os órgãos de controle ambiental no Brasil têm

aceitado e recomendado a avaliação de riscos baseada nas metodologias de outros países como os Estados Unidos, Canadá, Alemanha e Holanda. Neste sentido, a Norma Americana ASTM E 1739-95 (“Standard Guide for Risk-based Corrective Action for Petroleum Releases”) conhecida também por RBCA (Ação Corretiva Baseada no Risco) é uma das principais referências metodológicas utilizadas no Brasil, para derramamentos de petróleo e derivados. Segundo esta metodologia, o risco é definido como sendo a probabilidade de um indivíduo em uma população sofrer efeitos em função da exposição a um contaminante, considerando as principais vias de exposição como o contato dérmico, a ingestão ou a inalação de vapores ou a poeira (Schneider, 2005). As atividades básicas de avaliação dos riscos são a identificação dos principais contaminantes e dos receptores, análise de exposição, análise dose-resposta, quantificação e gerenciamento dos riscos.

Na avaliação do risco de uma área impactada por derramamento de petróleo e derivados são necessárias informações sobre a distribuição dos contaminantes, no solo e águas subterrâneas, dados sobre os níveis de exposição dos receptores e toxicidade dos compostos químicos de interesse. Através de análises químicas do solo e da água subterrânea são determinadas as concentrações dos contaminantes, sendo que a detecção geralmente é conduzida para os compostos de maior toxicidade e mobilidade.

No caso de um vazamento com gasolina no solo, os principais compostos investigados são os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno). Desta forma, se ocorrer um derramamento de gasolina é preciso saber se existe o risco de a contaminação atingir uma fonte receptora, como por exemplo, um poço de abastecimento de água. Neste caso, tecnologias de remediação deverão ser conduzidas, tendo como critérios a definição de locais prioritários tanto para o setor (indústrias e empresas) potencialmente poluidor como para os órgãos de controle ambiental (Corseuil & Marins, 1998). Além da importância para definir a tecnologia a ser empregada, a fase de diagnóstico permite que os responsáveis pela remediação cogitem ou não empregar processos para acelerar a biodegradação (biorremediação) ou até para deixar, em alguns casos possíveis,

que ocorra a atenuação natural monitorada, quando o próprio meio, sem interferência humana, se encarrega de degradar os poluentes ao longo dos anos. O último caso é possível principalmente quando uma análise consegue definir que a contaminação não representa riscos à sociedade a curto ou médio prazo (Schneider, 2005).

2.2.2 Remediação de hidrocarbonetos

A remediação de ambientes contaminados tem como objetivo a recuperação de uma dada área contaminada aos níveis originais com a eliminação de possíveis fontes subterrâneas e dos riscos toxicológicos. Qualquer projeto de remediação deve iniciar por caracterizar a natureza e a extensão do risco de contaminação e avaliar as opções de remediação, através de um estudo investigatório e de viabilidade das técnicas disponíveis de remediação. Neste sentido, a opção por uma técnica de remediação seja ela física, química ou biológica deve atender as concentrações a serem alcançadas no menor tempo possível e que seja viável do ponto de vista ambiental e econômico.

2.2.2.1 Técnicas de remediação

Uma grande variedade de processos físico-químicos e biológicos têm sido utilizados na remoção de hidrocarbonetos de petróleo puros e dissolvidos na água subterrânea. Além da importância para definir a tecnologia a ser empregada, a fase de diagnóstico também permite que os responsáveis pela remediação cogitem ou não empregar processos para acelerar a biodegradação (biorremediação) ou até para deixar, em alguns casos possíveis, que ocorra a atenuação natural monitorada, quando o próprio meio, sem interferência humana, se encarrega de degradar os poluentes ao longo dos anos. O último caso é possível principalmente quando uma análise consegue definir que a contaminação não representa riscos à sociedade a curto ou médio prazo.

Os tratamentos físicos separam o material, tratando sem destruí-lo ou modifica-lo quimicamente. Dentre eles podemos citar aspersão de ar e adsorção em carvão ativado. Os métodos físicos possuem várias limitações, entre elas

pode-se destacar a alta porcentagem dos hidrocarbonetos que permanecem retidos no solo (cerca de 50%), além do alto custo. Os métodos químicos mais utilizados são a extração de vapores do solo (SVE), recuperação do produto livre, extração com solventes e extração multifásica. Estes métodos têm várias desvantagens, entre elas, o alto custo e o grande impacto na paisagem. Segundo Corseuil *et al.* (1998), todos estes processos podem ser implementados para controlar o movimento de plumas (contaminantes) tratando águas subterrâneas e/ou solos. Porém, longos períodos de tempo e alto custos estão associados a maioria dos processos utilizados para a remediação de áreas contaminadas. A biorremediação pode ser um processo de baixo custo e de tratamento *in situ*, mas pode apresentar limitações devido às dificuldades no transporte de nutrientes ou de receptores de elétrons e da degradação propriamente dita dos contaminantes.

2.2.2.2 Biorremediação

A biorremediação está se tornando a tecnologia de escolha para a remediação de muitos ambientes contaminados, especialmente áreas contaminadas com hidrocarbonetos oriundos de petróleo. O processo de biorremediação pode ser simples em termos de manutenção, aplicável em grandes áreas e com grande vantagem de conduzir a diminuição ou completa destruição do contaminante (Cunha & Leite, 2000; Nyer, 1992; Malina *et al.*, 2002). Após um derramamento acidental no solo de gasolina a microbiota autóctona responde as mudanças ocorridas, adaptando-se com a função de restabelecer as condições naturais do ambiente. Esta resposta pode ser lenta, sendo necessário a otimização das condições ambientais para agilizar o processo. O balanceamento ou compensação de certos nutrientes importantes ao metabolismo celular como nitrogênio e fósforo, e o adequado fornecimento de oxigênio, estimulando a degradação aeróbia, são condições fundamentais para aplicação da biorremediação (Cunha, 1996). Dependendo das condições hidrogeológicas do local contaminado, a taxa de reação da biodegradação será mais rápida ou mais lenta.

A biorremediação é por definição a utilização de processo ou de atividade biológica para a transformação de contaminantes em substâncias inertes (Hollinger *et al.*, 1997). Porém, para haver a degradação destes compostos através de processos biológicos, é necessário o atendimento de alguns critérios como:

a) existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante;

b) disponibilidade e acessibilidade do composto ao ataque microbiano ou enzimático;

c) condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador (Bewley, 1996).

Quanto ao local, a biorremediação pode ser realizada *in situ* e *ex situ*, onde as técnicas *in situ* envolvem tratamento no local onde ocorreu a contaminação, enquanto que as técnicas *ex situ* envolvem a remoção física do material contaminado para realização do processo de biorremediação (Skipper, 1999). Depois de atendido os critérios e definido o local, são estabelecidas as estratégias para a biorremediação.

Entre as estratégias usadas para a biorremediação de combustíveis no ambiente, destaca-se a biorremediação passiva, a bioestimulação, a bioaumentação. Na biorremediação passiva ou intrínseca as frações de hidrocarbonetos presentes nos combustíveis são biodegradadas pelos microrganismos nativos do solo, ao passo que na bioestimulação a biota degradadora recebe aporte de nutrientes entre outros, para estimular o seu crescimento. A bioaumentação envolve a inoculação de culturas puras e ou de consórcios microbianos, contendo microrganismos pré-selecionados, com comprovada capacidade de degradação e competição, para degradar compostos específicos (Struthers, 1998. Bento *et al.*, 2005). A seleção dos microrganismos usados na bioaumentação ocorre em estudos *in vitro*, nos quais são avaliados os potenciais metabólicos para a máxima degradação (Kastner *et al.*, 1998). Em geral, a bioaumentação é mais apropriada para eliminar contaminantes muito recalcitrantes, em contaminações recentes e onde se pretende acelerar a

degradação (Pradhan *et al.*, 1998). Para seleção de microrganismos degradadores de determinados compostos, é necessário o crescimento em meio seletivo, contendo o composto desejado.

2.2.3 Contaminação ambiental com gasolina:

A grande maioria das pesquisas que estudam os impactos ambientais da gasolina estão relacionadas às contaminações das águas subterrâneas. No entanto, para este combustível atingir estas águas é necessário que ele passe através do solo, que é o meio que suporta as instalações de armazenamento de combustíveis e que primeiramente recebe o vazamento.

Neste sentido, a recuperação natural (atenuação ou intemperismo) das áreas que recebem o poluente é um processo que envolve a interação de processos físicos, químicos e biológicos de uma determinada área com o contaminante. O simples monitoramento da extensão (pluma) de uma contaminação, baseada no processo de atenuação natural pode ser suficiente para indicar se fontes receptoras serão atingidas. Segundo Corseuil & Marins (1998), dados de campo de vários pesquisadores, tem demonstrado que o processo de remediação natural limita bastante o deslocamento dos contaminantes. A extensão (pluma) da contaminação se deslocará em função de diversos processos como os de diluição, dispersão, adsorção, volatilização e biodegradação que podem ocorrer isoladamente ou concomitantemente.

Apesar de a atenuação natural sempre ocorrer nas áreas contaminadas, seja por diluição, degradação ou retardamento das plumas de contaminação, muitas vezes há como ajudar as bactérias a degradarem os poluentes de forma mais rápida e eficaz. Normalmente, porém, trata-se de melhoramentos que funcionam de maneira complementar a tecnologias de extração física, como as de bombeamento ou de volatilização de compostos. Será muito difícil encontrar um sítio, sobretudo quando há fase livre de contaminantes no subterrâneo (o que ocorre em quase todas as áreas contaminadas), com potencial de ser “limpo” apenas pela chamada biorremediação. Mesmo com as limitações, a técnica é muito estudada e deve sempre ser cogitada. E é isso o que ocorre em alguns

projetos no Brasil, em vários no exterior, tornando-se tema recorrente de estudos acadêmicos e gerando literatura técnica abundante. Já se tornou de “domínio público”, por exemplo, que a biorremediação pode ocorrer em três formas distintas: aeróbia, anaeróbia ou co-metabólica.

A ocorrência de um determinado processo está na dependência das condições hidrogeológicas da área impactada, repercutindo principalmente no processo de biodegradação. A biodegradação é a principal via de transformação dos hidrocarbonetos de petróleo e a efetividade deste processo informará sobre o deslocamento do contaminante na área impactada. Para que ocorra a biodegradação é necessário que ocorra a síntese de enzimas pela microbiota do ambiente poluído (Leahy & Colwell, 1990). Desta forma, existem mecanismos inter-relacionados que podem contribuir para esta adaptação, como a indução e/ou repressão de enzimas específicas, as alterações genéticas que resultam em novas atividades metabólicas e o enriquecimento seletivo de organismos capazes de transformar os compostos (Cerniglia, 1993).

A degradação de vários compostos aromáticos do tipo benzeno, os isômeros do xileno e tolueno são codificados por plasmídeos, que podem ser transferidos para microrganismos com ou sem capacidade limitada de utilização de alguns destes compostos. Desta forma, a exposição de populações microbianas aos hidrocarbonetos pode conferir uma vantagem seletiva aos microrganismos, que possuem plasmídeos contendo genes catabólicos, resultando no aumento populacional destas espécies em relação aos demais.

O sucesso da biodegradação durante a biorremediação está relacionado a diversidade metabólica dos microrganismos e as limitações intrínsecas, do local, como depleção de aceptores de elétrons, nutrientes, pH, temperatura, além da concentração de combustíveis. Para a degradação das frações de hidrocarbonetos neste combustível é necessário a bioestimulação com nutrientes, onde se destacam o nitrogênio e fósforo como os mais exigidos. Uma relação C:N:P de 70:5:1 é considerado uma condição ótima de nutrientes para que ocorra a biodegradação de combustíveis (Bento *et al.*, 2005).

A biodegradação pode envolver muitos processos, diferindo drasticamente na rota de degradação que pode ser seguida bem como das conseqüências. Por exemplo, um combustível pode ser mineralizado, e desta forma convertido completamente a produtos oxidados como o dióxido de carbono. Porém, pode ser transformado em outro composto tóxico ou não; pode se acumular dentro de um organismo; ser polimerizado ou ainda pode se ligar a materiais no solo, sedimentos ou águas. Mais de um destes processos pode ocorrer ao mesmo tempo para um único poluente.

2.2.3.1 Efeito da mistura etanol-gasolina e a co-solvência

Quando ocorre um derramamento e a gasolina entra em contato com a água, o álcool existente neste combustível, sendo completamente miscível em água, formará uma pluma de contaminação na água subterrânea. Portanto, uma alta concentração de etanol na água pode facilitar a transferência dos BTEXs presentes na gasolina para a fase aquosa, aumentando a solubilidade destes, processo este denominado efeito de co-solvência (Cordazzo, 2000). Segundo Corseuil & Fernandes (1999), a co-solvência aumenta de acordo com a maior hidrofobicidade dos BTEX. Assim, quanto mais hidrofóbico o contaminante e quanto menor a solubilidade dos contaminantes da gasolina em água, maior será o efeito do etanol no aumento da solubilização destes compostos.

A principal conseqüência do efeito co-solvência é o aumento da magnitude da contaminação pelo aumento da concentração de contaminantes na água, no caso da gasolina comercial que através de um vazamento no solo pode entrar em contato com a água subterrânea, mais rapidamente. O aumento da massa de contaminantes na fase aquosa poderia onerar sensivelmente os custos de remediação dos locais contaminados. Devido a degradação preferencial do etanol por parte dos microrganismos, ocorre o retardo da degradação do composto BTEX (Corseuil & Fernandes, 1999).

Em alguns casos, a gasolina se espalha horizontalmente em função da composição do solo e do volume de combustível derramado, em outros o vazamento provoca infiltração vertical do combustível, através do qual atinge o

lençol freático. Uma boa parte da gasolina fica adsorvida a matéria orgânica do solo, especialmente a fração aromática hidrofóbica, dificultando a extração física. Estes compostos desorvem vagarosamente e atingem o lençol freático, promovendo, ao longo do tempo, níveis consideráveis de contaminação (Cunha, 1996).

2.2.3.2 Degradação de etanol pelos microrganismos:

O etanol pode representar uma fonte de carbono e energia para uma variedade de populações microbianas, inclusive espécies que podem degradar combinações de BTEX. O etanol pode ser degradado por enzimas constitutivas associadas a rotas metabólicas, e os microrganismos que podem degradar os álcoois simples são mais comuns na natureza do que os microrganismos que degradam combinações de BTEX. Então, é provável que muitas espécies que não podem degradar BTEX, cresçam quando o etanol estiver presente e na realidade, o crescimento microbiano é mais rápido em etanol do que em BTEX (Corseuil *et al.*, 1998; Powers *et al.*, 2001; Alvarez & Hunt, 2002; Dakhel *et al.*, 2003).

Neste sentido, a diversidade de transformações aeróbias e anaeróbias para o etanol será apresentada a seguir. A biodegradação do etanol pode demandar grande quantidade de oxigênio ou de outros aceptores de elétrons e de nutrientes que estariam disponíveis para a degradação dos BTEX, isto tem sido relatado principalmente para o caso da biorremediação de águas subterrâneas contaminadas com gasolina comercial.

Grandes concentrações ($> 100.000 \text{ mg L}^{-1}$) de álcoois não são biodegradáveis devido a toxicidade apresentada a maioria dos microrganismos (Powers *et al.*, 2001). No caso de contaminações de águas subterrâneas por combustíveis, as concentrações elevadas de etanol deveriam se tornar mais exponencialmente diluídas a medida que aumentasse a distância da fonte, mas isso poderia inibir a atividade microbiana perto da fonte, devido a alta concentração do etanol. Assim, a pluma de contaminação do etanol deveria ser degradada por microrganismos localizados a uma distancia suficiente da fonte de

contaminação, para evitar sua morte (Corseuil *et al.*, 1998; Powers *et al.*, 2001; Alvarez & Hunt, 2002; Dakhel *et al.*, 2003).

A biodegradação do etanol sob várias condições redox foi investigada em microcosmos de aquífero com temperatura entre 20 e 25°C por Corseuil *et al.* (1998). As taxas de biodegradação foram baixas pois contava-se com uma baixa população microbiana, temperaturas frias e limitações de transferência de massa, o que resultou em uma meia-vida mais longa do etanol.

2.2.3.2.1 Degradação aeróbia do etanol:

As bactérias aeróbias podem oxidar o etanol a CO₂ e H₂O pelo ciclo de Krebs. Neste processo, o etanol é oxidado primeiro a acetaldeído por uma enzima álcool desidrogenase. O acetil-CoA é oxidado por enzimas constitutivas através do seu metabolismo a CO₂ no ciclo de Krebs. Muitas bactérias também são capazes de operar um ciclo de Krebs modificado, conhecido como o desvio de glioxalato. Este desvio permite que as bactérias cresçam em compostos com dois átomos de carbono, como o etanol (Madigan *et al.*, 1997).

2.2.3.2.2 Degradação anaeróbia do etanol:

O etanol é um intermediário comum do metabolismo anaeróbio das bactérias, que fermentam compostos orgânicos a produtos como o acetato, CO₂, CH₄ e H₂ (Powers *et al.*, 2001; Alvarez & Hunt, 2002). As transformações dos compostos orgânicos nos microrganismos anaeróbios podem consistir de três fases. Na primeira fase, os fermentadores produzem ácidos orgânicos simples, álcoois, gás de hidrogênio, e gás carbônico. Na segunda fase, redutores de sulfato e outras bactérias oxidam estes produtos da fermentação para CO₂, H₂, e acetato. (Madigan *et al.*, 1997). A mineralização acontece na terceira fase por metanogênese acetoclástica, que transforma o acetato em CO₂ e CH₄ e por metanogênese hidrogenotrófica que reduz o CO₂ com H₂ para formar CH₄ (Powers *et al.*, 2001; Alvarez & Hunt, 2002). Alguns redutores de sulfato e outros microrganismos anaeróbios também podem oxidar acetato e podem participar na fase de mineralização final (Atlas & Bartha, 1997). O etanol também é usado como

a fonte de carbono e energia em processos de desnitrificação, para a remoção de nitrato das águas subterrâneas (Powers *et al.*, 2001).

Corseuil *et al.* (1998) relatou que pode haver algumas exceções ao efeito prejudicial do etanol na degradação dos BTEX. Segundo este autor, a presença de etanol pode fazer com que aumente a degradação do tolueno, conforme demonstrado em todos os três microcosmos sulfatos reduzidos testados. Em resumo, pouco é conhecido sobre o efeito do etanol no metabolismo das populações microbianas. Considerando que a eficiência da biorremediação depende, em parte, da presença e expressão de enzimas de degradação, estudos de ecologia microbiana tanto de aquíferos contaminados como solo com misturas de gasolina e álcool deveria ser o objetivo de mais pesquisas (Corseuil *et al.*, 1998; Powers *et al.*, 2001; Alvarez & Hunt, 2002; Dakhel *et al.*, 2003).

2.2.3.2.3 Toxicidade do etanol

A toxicidade dos álcoois para os microrganismos recebeu atenção considerável na literatura, embora só alguns estudos avaliaram o efeito do etanol nas populações microbianas de subsuperfície (Powers *et al.*, 2001; Alvarez & Hunt, 2002). O modo de ação de álcoois envolve a desnaturação de proteínas, que comprometem a permeabilidade celular. A toxicidade dos álcoois está relacionada ao comprimento da cadeia hidrofóbica (Powers *et al.*, 2001). Os álcoois de cadeia mais longas apresentam na sua estrutura mais de 10 átomos de carbono, eles são inibidores muito potentes do crescimento microbiano se comparados aos álcoois de cadeia curta.

O etanol pode mostrar uma variedade de efeitos em microrganismos. As ações dos álcoois em organismos procarióticos parecem ser relacionadas a dano nas membranas celulares, conformação de enzimas e macromoléculas e pH intracelular (Powers *et al.*, 2001). As altas concentrações do etanol também podem inibir a síntese de várias organelas, inclusive a parede celular, o RNA, o DNA e proteínas (Powers *et al.*, 2001).

2.2.3.2.4 Degradação preferencial do etanol em relação aos BTEX

As enzimas que iniciam a degradação da fração BTEX são geralmente induzidas (Powers *et al.*, 2001; Alvarez & Hunt, 2002). Estas enzimas são apenas produzidas quando um indutor (por exemplo, o tolueno) está presente em altas concentrações ou em um nível mínimo para a indução. Em geral, este nível mínimo é muito baixo, na ordem de poucos microgramas por litro (Alvarez & Hunt, 2002).

Segundo Dakhel *et al.*, (2003) não existem dados de campo sobre acidentes envolvendo a gasolina comercial, com destaque para o etanol, talvez por que não seja tratado como um poluente em potencial. Só existem evidências indiretas na literatura sobre os efeitos potenciais do etanol na expressão de enzimas envolvida na degradação dos BTEX. Powers *et al.* (2001) informou que o etanol foi preferencialmente degradado se comparado ao benzeno sob uma concentração de 20 mg L⁻¹ em condições aeróbias, devido a repressão da síntese de enzimas utilizadas na degradação do benzeno. Especificamente, pequena ou nenhuma degradação dos BTEX aconteceu em condições aeróbias, desnitrificantes, redutoras de ferro, redutoras de sulfato e microcosmos metanogênico enquanto o etanol estava presente (Corseuil *et al.*, 1998). Neste caso, a degradação preferencial do etanol sob os BTEX pode refletir no fato de que o etanol é considerado um substrato prontamente degradado, que pode ser oxidado por enzimas constitutivas através de seu metabolismo central.

Por outro lado, a fração BTEX é tipicamente degradada por enzimas oxigenases e dioxigenases indizíveis, cuja síntese pode ser reprimida na presença de outros substratos facilmente degradados, quando em altas concentrações. Desta forma, o etanol poderia impedir a população de bactérias capazes de degradar os BTEX de expressar seu potencial de catabolismo, atrasando ou impossibilitando a degradação dos BTEX completamente.

Em um experimento com condições controladas, simulando um derrame acidental de gasolina com 5% de etanol e MTBE em uma profundidade definida, verificou-se que em 30 dias, tanto o etanol como o benzeno desapareceram concomitantemente (Dakhel *et al.*, 2003). Estes dados de laboratório mostraram

que não ocorreu a degradação preferencial do etanol quando comparado ao benzeno. Numerosos estudos têm sido conduzidos limitando a quantidade de carbono e disponibilizando substratos múltiplos, sugerindo que o etanol e os BTEX são degradados simultaneamente quando estiverem presentes em combinações de baixas concentrações. Uma cultura de *Pseudomonas putida* foi inoculada para degradar etanol a uma concentração de até 500 mg L⁻¹, e tolueno simultaneamente, não havendo inibição aparente (Powers *et al.*, 2001). Isto sugere que concentrações altas de etanol mostram um efeito de inibição *in situ* a degradação dos BTEX no ambiente. Entretanto, a diversidade genética dos microrganismos impede generalizações sobre a concentração de etanol que reprime a expressão das enzimas de degradação dos BTEX.

Assim, o etanol pode afetar a disponibilidade de nutrientes essenciais e substratos necessário para a biorremediação dos BTEX através do consumo preferencial de nutrientes e aceptores de elétrons (Corseuil *et al.*, 1998; Powers *et al.*, 2001; Alvarez & Hunt, 2002; Dakhel *et al.*, 2003). É sabido que os processos anaeróbios tem um papel principal na remediação de água subterrânea, removendo os compostos derivados de petróleo onde a presença de oxigênio é incomum (Rifai *et al.*, 1995; Corseuil *et al.*, 1998). O etanol pode ser degradado na presença de qualquerceptor de elétrons contribuindo para o consumo dos aceptores de elétrons dissolvidos que são necessários para a biodegradação anaeróbia dos BTEX (por exemplo, nitrato, ferro férrico e sulfato). Dependendo das reações químicas no aquífero e da taxa de reabastecimento natural dos aceptores de elétrons, o etanol poderia impedir a degradação dos BTEX através da depleção dos aceptores de elétrons presentes.

2.2.4 Degradação microbiana de hidrocarbonetos

As moléculas de hidrocarbonetos suscetíveis à oxidação microbiana podem estar sob a forma de cadeias alifáticas, aromáticas, longas, curtas, lineares, ou ramificadas, que são modificadas para a obtenção de compostos usados no metabolismo celular. Dentre os hidrocarbonetos acima citados, os de cadeia alifática são considerados um grande potencial em termos de substrato para o crescimento

de algumas espécies de microrganismos (Watkinson & Morgan, 1990). Na realidade, o crescimento microbiano as expensas de substratos oleosos encontra seu maior impedimento devido ao caráter hidrofóbico dessas substâncias. A solubilidade dos componentes alifáticos decresce rapidamente com o aumento do peso molecular (Watkinson & Morgan, 1990). Como consequência, os microrganismos precisam desenvolver adaptações específicas que os habilitem a utilizar a maioria dos substratos insolúveis. Existem três rotas possíveis para a absorção de hidrocarbonetos: a absorção de materiais solúveis; via micro gotículas (quando essas gotículas são muito menores que a célula microbiana) ou pseudo-solubilização e a via macrogotícula. O primeiro mecanismo é geralmente descartado, devido à baixa solubilidade dos alcanos (acima de C₁₂). Os outros dois mecanismos, provavelmente, podem operar sozinhos ou simultaneamente. A absorção do hidrocarboneto na forma de gotícula é considerada muito comum e freqüentemente envolve a produção de moléculas biológicas surfactantes. Essas moléculas são agentes emulsificantes que promovem a formação de gotículas do hidrocarboneto, reduzindo a tensão interfacial água/hidrocarboneto e a superficial do meio aquoso. Devido à variabilidade no tamanho das gotículas, os microrganismos apresentam uma variedade de adaptações à captação dos mesmos, assim como a produção de uma variedade de tipos de moléculas surfactantes intracelulares (Watkinson & Morgan, 1990).

2.2.4.1 Produção de biosurfactantes:

Os biosurfactantes são sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos durante o crescimento em diferentes fontes de carbono desde substâncias hidrófilas como a glicose até substratos hidrófobos como os hidrocarbonetos (Bento *et al.*, 2007). Neste caso, podemos encontrar dois tipos possíveis de produção: quando os surfactantes são extracelulares, eles causam emulsificação do hidrocarboneto e quando estão associados à parede celular podem facilitar a penetração do hidrocarboneto no espaço periplásmico (Koch *et al.*, 1991). Os biosurfactantes são moléculas anfipáticas que conferem o caráter de bipolaridade, eles são detergentes biológicos. A molécula se posiciona,

preferencialmente, sempre na interface de compostos com diferentes polaridades. Assim estas substâncias são capazes de diminuir a tensão superficial e formar microemulsões, nas quais os hidrocarbonetos podem ser solubilizados na água e vice-versa (Cameotra & Bollag, 2003; Mulligan, 2005; Bento *et al.*, 2007).

Muitos dos surfactantes produzidos por microrganismos degradadores de combustível não são constitutivos, requerendo a presença de alcanos para induzirem sua síntese. A síntese de biossurfactante também pode ser constatada na presença de substratos insolúveis em água como ácidos graxos ou óleos triglicéridos (Ratledge, 1988). A produção de biossurfactantes por microrganismos requer a presença de enzimas induzidas, que são sintetizadas apenas quando o microrganismo estiver se desenvolvendo na presença de um determinado hidrocarboneto. Segundo Zhang & Miller (1992) a propriedade de todo o surfactante é sua habilidade em reduzir a tensão superficial de um meio líquido. Por exemplo, a água destilada apresenta uma tensão superficial de 73 mN m^{-1} . Um surfactante efetivo produzido por microrganismos (biossurfactante), pode reduzir este valor para menos que 30 mN m^{-1} (Bento *et al.*, 2007).

Em ambientes como o solo, onde ocorrem muitas interações químicas, entre os hidrocarbonetos, o solo e a matéria orgânica, a bioindisponibilidade é ainda mais acentuada pelo efeito da sorção (Edwards *et al.*, 1994). No solo, os biossurfactantes aumentam a solubilidade e liberam os contaminantes adsorvidos nos minerais e na matéria orgânica (Karami-Lotfabad *et al.*, 1996).

Os microrganismos podem produzir duas classes de biossurfactantes em função do peso molecular. Os surfactantes de alto peso molecular (polímeros), formados por polissacarídeos ou por uma mistura, são extracelulares, eles causam emulsificação do hidrocarboneto dentro da célula, são responsáveis pela estabilidade da emulsificação, porém não causam necessariamente a redução da tensão superficial. Os surfactantes de baixo peso molecular (glicolipídios, ácidos graxos e fosfolipídios) quando estão associados à parede celular podem facilitar a penetração do hidrocarboneto no espaço periplásmico (Koch *et al.*, 1991), diminuindo a tensão superficial do meio (Bento *et al.*, 2005). Os surfactantes microbianos são moléculas complexas com uma grande diversidade de estruturas

químicas. Embora a produção de biossurfactantes ocorra entre os diferentes grupos microbianos, muitas vezes o tipo de biossurfactante produzido é específico do gênero e às vezes da espécie. As espécies predominantes de bactérias que produzem biossurfactante são *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1, *Rhodococcus erythropolis*, e *Bacillus subtilis* (Bodour & Maier, 2002; Maier, 2003; Bento *et al.*, 2005). Entretanto, entre os surfactantes microbianos, os mais estudados são os glicolipídios, incluem-se os ramnolipídios. A espécie mais estudada que produz ramnolipídio é *P. aeruginosa* isolada e caracterizada em 1949 (Maier & Soberón-Chaves, 2000; Rahman *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2004).

A produção de biossurfactantes e bioemulsificantes tem sido associada com o crescimento celular em meios de cultura ou em meios mínimos (mineral) com a fonte de carbono (solúvel ou insolúvel) a ser investigada (Bento *et al.*, 2005). Por esta razão, esta técnica tem sido muito utilizada em estudos que envolvem a detecção de biossurfactantes (Reisfeld *et al.*, 1972; Reiling *et al.*, 1986; Muriel *et al.*, 1996; Bardi *et al.*, 2000).

2.2.4.2 Mecanismos de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos

Além da degradação química (fotodegradação) e volatilização, a biodegradação é uma das principais vias de eliminação de hidrocarbonetos aromáticos no solo (Sims *et al.*, 1990).

Várias rotas metabólicas responsáveis pela degradação de grande variedade de hidrocarbonetos têm sido registradas (Watkison & Morgan, 1990; Ratledge, 1992; Botton & Parsons, 2007). Muitos hidrocarbonetos que não podem ser utilizados para o crescimento precisam ser oxidados até um substrato intermediário (co-substrato), capaz de suportar o crescimento inicial para que ocorra a oxidação completa do hidrocarboneto.

Uma característica comum dessas rotas metabólicas é a incorporação inicial do oxigênio no substrato. Geralmente, a degradação só pode ser iniciada, sob condições aeróbias, uma vez que a fonte de oxigênio utilizada é a molecular e

o sistema enzimático responsável pela ativação metabólica inicial é a oxigenase (Watkinson & Morgan, 1990). Existem duas categorias de oxigenases envolvidas no processo. As mono-oxigenases incorporam um átomo de oxigênio no substrato e o outro átomo é reduzido para a água. As dioxigenases catalizam a incorporação de ambos os átomos de oxigênio para o substrato, esquematizando as rotas metabólicas básicas para a degradação de alcanos (grupo estrutural mais biodegradável), tem-se:

* Oxidação terminal: a oxidação inicial de um alcano é feita em um dos grupos metil terminal, ao qual é hidroxilado ao álcool correspondente (álcool primário), via sistema mono-oxigenase:



Reações de hidroxilação desse tipo podem estar ligadas a vários tipos de sistemas carreadores de elétrons ou cofatores para completar a seqüência de oxidação. Em muitas bactérias (*Pseudomonas putida*), a mono-oxigenase está ligada à rubrodonina e em leveduras (*Candida spp.*) ao citocromo P-450.

A oxidação inicial também pode ser via sistema de dioxigenases que parece menos comum. Nesse sistema, os alcanos são transformados no hidroperóxido correspondente e, subseqüentemente este é reduzido ao álcool correspondente.

* Oxidação subterminal: As oxidações subterminais de alcanos resultam em álcool secundário, sendo de rara ocorrência. Apesar de uma variedade de bactérias e fungos utilizarem preferencialmente a via de oxidação terminal de hidrocarbonetos com cadeia C₈ a C₁₈, algumas espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Bacillus spp.* utilizam a via oxidação subterminal (Rehm & Reiff, 1982, citado por Watkinson & Morgan, 1990).

b) Oxidação do álcool a aldeído.

c) Oxidação do aldeído a ácido graxo

d) Oxidação do ácido graxo via β -oxidação

* Oxidação diterminal (ω -oxidação): Ocasionalmente ambos grupos metil terminal são oxidados, resultando na formação de um ácido dicarboxílico, sendo degradados via β -oxidação (Watkinson & Morgan, 1990).

Na oxidação de hidrocarbonetos aromáticos o passo inicial do catabolismo microbiano envolve a modificação da molécula pela oxidação a compostos dihidroxilados, como o catecol, como um primeiro passo à fissão do anel e assimilação dos produtos via ciclo de Krebs. O processo metabólico segue uma seqüência de reações e produtos intermediários que apresentam variações quanto à complexidade do hidrocarboneto aromático. Porém, de um modo geral, forma-se cis-dihidrodiol, catecóis, ácido cis-mucônico ou 2-hidroxi-mucônico semialdeído, que são encaminhados para o ciclo de Krebs. O sistema enzimático envolvido é a dioxigenase, onde dois átomos de oxigênios são incorporados ao núcleo aromático (Van Hamme *et al.*, 2003).

2.2.4.3 Avaliação da degradação

O princípio de qualquer método de preparação de amostra é o da partição dos analitos entre a matriz da amostra e a fase extratora. Um sistema ideal em química analítica é aquele em que todas as etapas analíticas são realizadas sem a intervenção do analista. Têm-se atualmente instrumentos de grande sofisticação, tais como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) e ionização de chama (FID) para o caso de compostos orgânicos, que permite separar e quantificar misturas complexas através das áreas dos picos individuais.

As técnicas de preparação de amostra que usam pouco ou nenhum solvente tem despertado grande interesse. Podem ser classificadas em função da fase extratora, como gasosa ou *headspace*, ou com sorvente. A extração no *headspace* pode ser entendida como a análise do material presente na fase vapor, que está em equilíbrio com a solução contendo a amostra.

A amostragem usando *headspace*, é bastante utilizada para análise de compostos orgânicos voláteis (VOCs), na determinação das frações de hidrocarbonetos que são consumidas pelos microrganismos durante o seu crescimento em combustíveis (Yerushalmi *et al.*, 1999; Solano-serena, 2000a; Deeb *et al.*, 2002; Botton & Parsons, 2007), devido principalmente, a compatibilidade da fase extrativa com vários equipamentos tais como Cromatógrafo Gasoso (Alcalde, 2000).

Na técnica de *headspace*, é utilizado um frasco de vidro fechado hermeticamente com uma tampa de *teflon* e um lacre de alumínio, para que a fase líquida esteja em equilíbrio com o vapor. O analito é, necessariamente, mais volátil que a matriz, este volatiliza preferencialmente, podendo ser determinado sem os interferentes dos outros componentes da amostra, através da análise do vapor desprendido do analito. Para isso, um volume bem definido do *headspace* é injetado diretamente no GC, um gás carreador irá mover a fase vaporizada através de uma coluna coberta com uma fase estacionária. Após esta etapa da separação, um detector converte as informações após a ionização e separação das cargas em um sinal elétrico que é medido e registrado. Os dados obtidos são graficados na forma do sinal do detector (abundância) com o tempo, que formarão os chamados picos cromatográficos. Os picos cromatográficos podem ser identificados pelos seus tempos de retenção, medidos a partir do tempo de injeção da amostra até o tempo do máximo do pico. O tempo de retenção de qualquer pico de algum componente não é afetado pela presença de outras amostras de outros componentes. Na análise quantitativa, mede-se a área do pico de interesse para gerar a concentração do analito na amostra. A quantidade de analito transferida para o equipamento de análise é proporcional ao volume de fase gasosa. Os cromatógrafos modernos estão acoplados a um computador que calculam as áreas automaticamente, através de métodos padrões de integração (Lanças, 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento de microrganismos degradadores de gasolina

3.1.1 Amostragem

Foram coletadas amostras de dois locais contendo solo contaminado com hidrocarbonetos. Uma área de disposição de resíduo petroquímico (*landfarming*) do Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes (SITEL) do Pólo Petroquímico do Sul em Triunfo, RS. Esta área apresenta um histórico de 16 anos de disposição de resíduos sólidos do Pólo Petroquímico do Sul e da Refinaria Alberto Pasqualini (REFAP) em Canoas, RS, ambos com elevada carga de derivados de petróleo. Foram selecionadas três células, sendo que duas células recebiam resíduos provenientes do Pólo e uma célula recebia resíduos da REFAP. Dentro de cada célula foram escolhidos aleatoriamente dois pontos, onde foram realizadas as coletas de solo a uma profundidade de 0 a 30 cm, resultando em duas subamostras de solo por célula.

Outra amostra avaliada foi a de uma área de abastecimento de gasolina, em um posto de combustíveis, próximo a bomba de abastecimento. A amostra de solo também foi coletada na profundidade de 0 a 30 cm da área contaminada com gasolina, de uma cidade do interior do Estado do RS. O volume final foi de 200g, que foram divididas em duas sub-amostras.

Todas as amostras foram trazidas para o laboratório de Biorremediação de Solos do Departamento de Solos da UFRGS em sacos plásticos e em caixas de isopor, sem a preocupação de perda por volatilização dos hidrocarbonetos. Estas foram armazenadas à 4°C por uma noite. No dia seguinte, cada subamostra foi peneirada em malha de 2 mm e homogeneizada, retirando-se uma alíquota de 10

g. As alíquotas foram misturadas para então formar uma amostra composta de cada local a fim de que se tivesse uma amostra representativa dos microrganismos do solo.

3.1.2 Combustíveis

A composição química da gasolina sob as condições descritas foram preservadas durante todo o período de execução dos testes, sendo confirmadas por análises cromatográficas regulares. Foram utilizados etanol e gasolina comercial (24 % de etanol), coletados diretamente na distribuidora de combustíveis e em quantidade suficiente para a execução de todos os experimentos deste trabalho. A esterilização dos combustíveis foi realizado por filtração à vácuo, com um frasco kitassato esterilizado e um filtro adaptado para a colocação de membranas filtrantes com porosidade de 0,22 μm e armazenado em frascos esterilizados, fechados hermeticamente com tampa de borracha e lacre de alumínio, com o objetivo de evitar ao máximo a perda de alguns compostos por volatilização. Os frascos foram cobertos com papel alumínio para evitar a fotoxidação e acondicionados a temperatura de 4°C.

3.1.3 Frascos

Para evitar a perda da fração volátil de interesse como o etanol, benzeno, tolueno, isômeros do xileno e isômeros do C9 presentes na gasolina, os ensaios de isolamento, crescimento de microrganismos e avaliação da degradação foram conduzidos em frascos de vidro (do tipo penicilina) com tampa de borracha e anel de alumínio. O anel de alumínio foi lacrado após a inoculação dos microrganismos. Utilizaram-se frascos de 50 mL, sendo que 20 % do volume dos frascos foi ocupado com meio mineral e os outros 80 % foram ocupados com ar atmosférico, a fim de possibilitar condições aeróbias de crescimento microbiano.

3.1.4 Seleção de meios minerais para o isolamento dos microrganismos

Adicionaram-se 50 mL de dois meios minerais (MM1 e BH; Apêndice 2), com pH 7,0 em frascos de 125 mL. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos, sendo posteriormente inoculados com 1 g de solo úmido (amostra composta), provenientes das células do *landfarming* e áreas com vazamentos de combustíveis. As amostras foram incubadas sob agitação orbital à 150 rpm, em temperatura de 30 °C, por um período de 8 dias. Após este período de incubação, uma alíquota de 100 µL foi plaqueada em agar nutritivo (Apêndice 2) e incubadas a 30 °C por 24 horas. Após verificar-se o número de colônias visualmente diferentes em cada meio, o MM1 foi selecionado.

3.1.5 Investigação do poder tamponante do meio mineral selecionado

A avaliação do efeito tampão do meio mineral MM1, devido a presença de fosfato na concentração de 2 g L⁻¹, foi realizada pela adição de quantidades crescentes de NaOH 0,1 N e HCl 0,1 N, em 50 mL do meio MM1.

3.1.6 Isolamento dos microrganismos degradadores de etanol, BTX e C9

Os frascos com 9,9 mL do meio, mais um grama de solo úmido, e mais 1 % (v/v) de gasolina comercial e gasolina sem etanol foram fechados hermeticamente e incubados sob agitação orbital à 150 rpm, em temperatura de 30 °C. A cada 7 dias, uma alíquota de 1 mL da cultura crescida era transferida para outro frasco contendo o mesmo meio estéril e gasolina com e sem etanol, durante 21 dias. Antes de se retirar a alíquota, o frasco foi resfriado a 15 °C por 15 minutos.

3.1.7 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados

Após 3 transferências, a cultura crescida foi diluída em solução salina (NaCl 0,85 %) e plaqueada em meio agar nutritivo, sendo as placas incubadas a 30 °C por 24 horas. As colônias de bactérias crescidas nas placas que apresentaram diferenças morfológicas visuais tais como: aspecto, tamanho, coloração, forma e

borda da colônia, foram purificadas e armazenadas sob refrigeração a 4 °C em tubos de ensaio contendo o mesmo meio inclinado, com repicagens quinzenais.

3.1.8 Teste de detecção de ramnolipídio

O teste colorimétrico foi realizado pela observação do crescimento dos isolados em placas de Petri com meio azul de metileno (Apêndice 03), específico para biossurfactantes aniônicos que consiste na detecção de ramnolipídios extracelulares. Estes biossurfactantes formam um par iônico insolúvel com o surfactante catiônico brometo de cetilmetilamônio e o corante básico azul de metileno que são adicionados no meio mineral com agar em placas de Petri (Siegmund & Wagner, 1991). Este método indica a produção de ramnolipídios pelas colônias inoculadas, através da presença de halos no meio com o azul de metileno em torno das colônias (Tuleva *et al.*, 2002; Bento *et al.*, 2007). As placas foram inoculadas em superfície com alça de platina, utilizando-se como inóculo culturas de 24 horas dos isolados em agar nutritivo. Foram incubadas a 30°C por 24 horas.

3.1.9 Identificação dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram identificados pelo seqüenciamento de uma região do gene do rRNA 16S, como descrito por Camargo *et al.* (2003) e Jacques (2005). As células foram crescidas em meio caldo nutriente, durante 12 horas, posteriormente centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O DNA total foi extraído de acordo com o método descrito por Asubel *et al.* (1997). O precipitado foi suspenso em tampão TE, SDS (10 %) e proteinase K, e incubadas por 1 hora a 37°C. Soluções de NaCl (5 M) e CTAB/NaCl (4.1g NaCl e 10 g N-cetyl-N.N.N.-trimethylammoniumbromide (CTAB) em 100 ml de água destilada) foram adicionados, incubando-se por 10 min a 65°C. A solução foi extraída com 780 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), centrifugado por 5 minutos, sendo a fase aquosa novamente extraída com igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Após centrifugado por 5 min, o DNA presente na fase aquosa foi precipitado com 0,6 na proporção de volume de isopropanol e o precipitado

lavado com etanol 70 %. O precipitado de DNA foi seco usando concentrador e ressuspendido em água livre de nucleases. Nucleotídeos iniciadores universais correspondentes as posições 27F e 519R, de *E. coli*, foram usados para a amplificação do gene 16S rRNA por PCR. A mistura de PCR (Cat. N° M7502, Promega, Madison, Wisconsin) foi usada de acordo com instruções do fabricante. O DNA foi amplificado usando PCR com 35 ciclos (desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, demais desnaturações de 95°C por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto e extensão final a 71°C por 5 minutos). Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 2% e purificados usando o kit de extração de gel QIAEX II (QIAGEN, Valência, Califórnia), de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, um pedaço do gel foi suspenso em tampão QXI, posteriormente adicionado a suspensão QIAEX II, seguido de mistura em vortex. A suspensão foi incubada a 50°C por 10 minutos, centrifugada por 30 segundos e o precipitado foi lavado duas vezes com tampão QXI e uma vez com tampão PE. Após secagem ao ar por 15 minutos, o DNA foi eluído em água livre de nuclease. O seqüenciamento do DNA foi realizado usando um kit terminador BigDye (Applied Biosystems, Foster Cty, Califórnia) e um analisador genético Applied Biosystems ABI 3100. Os fragmentos amplificados foram purificados e submetidos diretamente ao seqüenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences, Piscatawai, New Jersey). A homologia das seqüências bacterianas foi obtida através do MEGABLAST (Altschul *et al.*, 1997).

3.2 Avaliação da degradação da gasolina comercial pelos isolados obtidos

A densidade ótica, pH, produção dos biossurfactantes, atividade metabólica pela redução do TTC (cloreto de trifeniltetrazólio), TPF (trifenil formazan) e a degradação do etanol e da gasolina comercial por cromatografia gasosa, foram avaliados durante a curva de crescimento de cada isolado bacteriano.

3.2.1 Obtenção do inóculo

Para o preparo do inóculo individual dos cinco isolados selecionados, as células bacterianas foram transferidas, com auxílio de uma alça de platina, da cultura estoque para um frasco erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de caldo nutritivo. Foi feita a incubação sob agitação de 150 rpm e 30°C por 15 horas. Após este tempo, as células foram centrifugadas à 5000 rpm por 15 minutos e lavadas com MM1 estéril. Este procedimento foi executado duas vezes. Ao fim do processo, o *pellet* era ressuspenso em MM1 para efetuar a inoculação. O volume de suspensão bacteriana utilizada para a inoculação dos frascos de vidro foi suficiente para atingir a densidade ótica de 0,07, de acordo com a leitura em espectrofotômetro (Spectrumlab, 22PC, Brasil), em comprimento de onda 600 nm.

3.2.2 Crescimento dos isolados

O crescimento bacteriano em meio mineral mais 0,24 % de etanol ou 1 % de gasolina comercial foi realizado através de curvas de crescimento, quantificando-se as unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹) e a densidade ótica. Os frascos de vidro do tipo penicilina com 12,87 mL do meio, mais 1 % de gasolina com e sem etanol, foram inoculados com suspensões de células dos isolados, fechados hermeticamente e incubados sob agitação orbital à 150 rpm, em temperatura de 30 °C. Para a contagem das UFC foi retirada uma alíquota de 100 µL da suspensão de células que crescia no frasco de vidro, sendo esta submetida à diluição seriada em 900 µL de solução salina (0,85 %) e posteriormente plaqueada em meio agar nutritivo, usando as três maiores diluições em intervalos regulares de 6 horas. As placas inoculadas eram incubadas a 30 °C por 24 horas e após este período, as colônias eram contadas.

Para determinação da densidade ótica, foram retiradas alíquotas de 2 mL do meio, em intervalos regulares de 6 horas, sendo realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro. Em cada leitura, nos tempos determinados, o frasco utilizado para retirada das amostras era descartado, foi feito um frasco para cada ponto, para que fosse mantidas as condições de concentração dos compostos

voláteis. Cada análise foi feita em duplicata sendo que as amostras eram retiradas do mesmo frasco.

3.2.3 Medidas de pH

Além do crescimento dos isolados em meio mineral mais gasolina, avaliou-se também a alteração do pH do meio de cultura durante o crescimento. O pH foi avaliado na ausência de células microbianas, removidas através de centrifugação de 5.000 rpm por 10 minutos a 15 °C. As amostras permaneceram por 30 minutos a 25 °C.

3.2.4 Detecção da produção de biossurfactantes/ bioemulsificantes

A detecção da produção de biossurfactantes foi realizada pela medida do índice de emulsificação e da tensão superficial no meio de cultura. Para isto os isolados foram individualmente inoculados em 9,9 mL de meio mineral mais 24 µL de etanol ou 100 µL de gasolina comercial e incubados com duas repetições a 30 °C por 72 horas. De 6 em 6 horas, retirava-se amostras do meio de cultura para as duas avaliações. A tensão superficial foi avaliada na ausência de células microbianas, removidas através de centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos a 15 °C. As amostras permaneceram por 30 minutos a 25 °C e a tensão superficial foi determinada em um tensiômetro digital (Gibertini, Milão, Itália), utilizando o método da placa de Wilhelmy. Como padrões utilizou-se a água destilada (69 mN m⁻¹) e etanol (24 mN m⁻¹).

A avaliação do índice de emulsificação foi realizada na presença das células microbianas. Para isto, 2 mL do meio de cultura foram misturados a 2 mL de gasolina em tubos de ensaio com fundo chato (100 mm x 15 mm), sendo a mistura agitada em vortex por 2 minutos e os frascos deixados em repouso por 24 horas. Após este período, foi avaliada a presença de emulsão. O índice de emulsificação é obtido pela medida da coluna emulsificada de gasolina dividido pela altura total e multiplicado por 100.

3.2.5 Ensaio prévio de degradação do etanol em meio mineral ou da gasolina comercial em meio mineral

Os isolados foram individualmente inoculados em 9,9 mL de meio mineral mais 24 μL de etanol ou 100 μL de gasolina comercial. Neste meio, foi adicionado ainda 50 mg L^{-1} de TTC (cloreto de trifeniltetrazólio). A redução do TTC a TPF (trifenil formazan) foi avaliada visualmente pela mudança na coloração do meio de incolor para rosa e roxo. Os sais de tetrazolium competem com outros aceptores de elétrons pelo poder de redução da cadeia de transporte de elétrons. Desta forma, a redução do TTC para trifenil formazan refletem a atividade da cadeia de transporte de elétrons, informando sobre a atividade de uma dada população microbiana. O TTC tem sido utilizado para a avaliação da atividade de enzimas desidrogenases do solo (Alef, 1995; Bento *et al.*, 2005) e no método do Número Mais Provável (NMP) para a estimativa de degradadores de óleo diesel e gasolina proposto por Braddock & Catterall, (1999). Os frascos foram incubados em duplicata a 150 rpm e 30°C. Foram feitos ensaios controle, não inoculados, contendo MM1, TTC e etanol ou gasolina comercial. Todos os frascos foram cobertos com papel alumínio para evitar a fotoxidação.

3.2.6 Análises cromatográficas

A capacidade dos isolados em degradar etanol, BTX e C9 foi avaliada através de cromatografia gasosa, utilizando a técnica de *headspace* de amostragem. Para isso, os isolados foram individualmente inoculados em 9,9 mL de meio mineral, 24 μL de etanol ou 100 μL de gasolina comercial, seguido de incubação a 30 °C por 48 ou 72 horas, em triplicata. Durante o período, o material foi analisado em um cromatógrafo gasoso (Shimadzu 17A, Japão), equipado com detector de ionização de chama e sistema de injeção *headspace* (HS/GC/FID), coluna DB5 (poli-metil-siloxano com 5% de grupamentos fenila) de 30 metros por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase e gás de arraste H_2 com fluxo de 1,5 mL min^{-1} . As condições cromatográficas de análise foram realizadas segundo o método EPA 8015-B-96, a seguir descrito: temperatura e tempo de condicionamento do frasco de 80 °C por 15 minutos; programa de

temperatura do forno de 40 °C por 3 minutos, seguido de taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹ até 90 °C, mantido por 5 minutos nesta temperatura com posterior aquecimento de 10 °C min⁻¹ até 150°C onde permaneceu por um minuto. As temperaturas do injetor e detector foram 120 °C e 210 °C, respectivamente. Foi injetado 1,0 µL em modo de injeção *splitless* (um dos modos de injeção de cromatografia gasosa sem divisão). Nestas condições o tempo de análise foi de 43 minutos.

Os resultados foram apresentados na forma de percentual de degradação para cada pico (etanol, benzeno, tolueno, isômeros do xileno e isômeros do C9), pela comparação da área dos picos apresentados pelo controle. Foram feitos ensaios controle, não inoculados, contendo MM1 e etanol ou gasolina comercial, para diferenciar perdas por degradação biótica e abiótica. A repetibilidade do método foi definida a partir de uma solução de 9,9 mL de meio mineral, contendo 24 µL de etanol ou 100 µL de gasolina comercial. Foram feitas quintuplicatas das medidas, a partir das quais foi determinado o número de repetições necessárias para a confiabilidade dos dados.

Para as análises cromatográficas foram realizados testes de limite de detecção e faixa de linearidade para o estudo em questão. Para tal, foram analisadas soluções de meio mineral com os analitos etanol, benzeno, tolueno, isômeros do xileno e isômeros do C9 na faixa de concentração de 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2 % (v/v), segundo o método descrito anteriormente.

3.2.7 Análise estatística

O desvio padrão baseia-se nos desvios em torno da média aritmética e a sua fórmula básica pode ser traduzida como: a raiz quadrada da média aritmética dos quadrados dos desvios pelo número total de valores de dados e é representada por S.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n}}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de microrganismos degradadores de gasolina comercial

4.1.1 Seleção de meio mineral para o isolamento dos microrganismos

Para o isolamento de microrganismos degradadores da gasolina procedeu-se um enriquecimento em dois meios minerais de cultura, denominados MM1 e BH (Apêndice 2), utilizando a gasolina pura ou gasolina comercial como única fonte de C e energia. As três transferências foram feitas sempre utilizando os mesmos meios. Na última transferência, plaqueou-se as culturas e obteve-se 10 isolados. O meio que apresentou o maior número de isolados foi o MM1, que foi utilizado em todos os demais experimentos.

4.1.2 Efeito tamponante do meio mineral

A avaliação do efeito tampão do MM1, devido a presença de fosfato na concentração de 2 g L^{-1} foi avaliada com a adição de quantidades crescentes de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em 50 mL do meio MM1 (Figura 1).

A adição de um ácido forte, HCl, a um tampão (neste caso, o meio mineral MM1) ocasionará numa elevação da concentração dos íons H^+ no meio, perturbando o equilíbrio. Segundo o princípio de Le Chatelier, essa perturbação pode ser neutralizada pela base conjugada do tampão, restabelecendo o estado de equilíbrio, e o pH irá variar pouco. Conforme a Figura 1, foi necessário adicionar 900 μL de HCl para que houvesse redução de uma unidade de pH,

sendo esta a capacidade tamponante do meio mineral MM1 para um ácido forte (Skoog *et al.*, 2001).

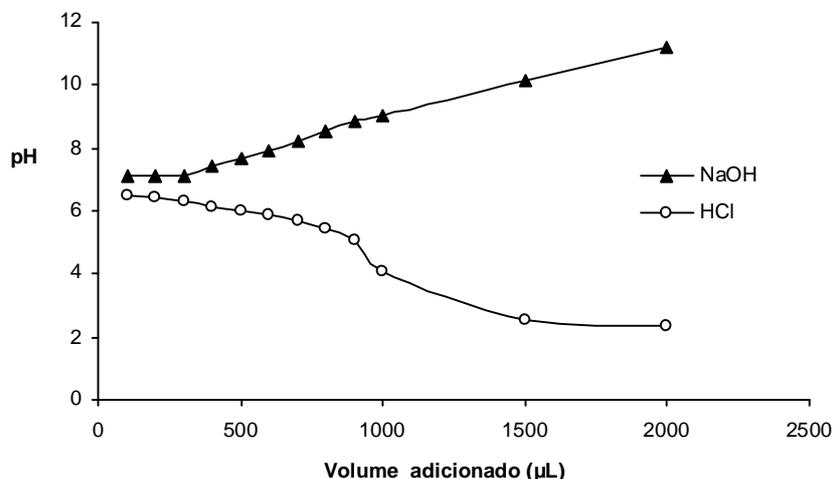


FIGURA 1. Medidas de pH do meio mineral MM1 em resposta a adição de quantidades crescentes de soluções de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ou de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Segundo o mesmo princípio, a adição a um tampão de uma base forte, NaOH, elevará as concentrações dos íons OH^- no meio, essa será neutralizada pelo tampão, restabelecendo o estado de equilíbrio, e o pH da solução irá variar pouco. Conforme a Figura 1, foi acrescentado $700 \mu\text{L}$ de NaOH para que a medida de pH aumentasse de 7,0 para 8,0, definindo a capacidade tamponante do meio mineral MM1 para uma base forte (Skoog *et al.*, 2001).

Estes resultados sugerem que o meio mineral MM1 atua como uma solução tampão e poderá neutralizar a ação de metabólitos ácidos ou básicos que são produzidos neste meio durante o crescimento das bactérias, alterando pouco seu pH durante o período de incubação.

4.1.3 Isolamento e caracterização dos microrganismos degradadores de etanol, BTX e C9

Para o isolamento de microrganismos com habilidade de degradar os compostos BTX, C9 e etanol foram utilizadas áreas com histórico de disposição de resíduos petroquímicos no solo e área de posto de combustível. O solo foi

inoculado em meio mineral contendo gasolina comercial como única fonte de carbono e de energia. Após 3 transferências semanais foram obtidos 37 isolados bacterianos. Avaliou-se a morfologia da colônia, aspectos visuais (aspecto, tamanho, coloração, forma e borda da colônia) e das células (teste de cloração de Gram), agrupando-se em 10 isolados (Tabela 2).

TABELA 2. Algumas características dos isolados degradadores de gasolina.

Isolados	Forma da célula	Gram	Produção de Ramnolipídio ¹	Origem da amostra
UFRGS01	bastonete	-	+	Posto de combustíveis ³
UFRGS02	bastonete	-	-	Posto de combustíveis ³
UFRGS03	bastonete	-	+	<i>Landfarming</i> ²
UFRGS04	cocos	+	-	<i>Landfarming</i> ²
UFRGS05	cocos	+	-	Posto de combustíveis ³
UFRGS06	cocos	+	-	Posto de combustíveis ³
UFRGS07	bastonete	-	+	Posto de combustíveis ³
UFRGS08	bastonete	-	-	Posto de combustíveis ³
UFRGS09	bastonete	-	+	Posto de combustíveis ³
UFRGS10	bastonete	-	+	Posto de combustíveis ³

¹ Crescimento em meio de cultura com azul de metileno (Apêndice 03).

² Área de disposição de resíduos petroquímicos do solo.

³ Área subsuperficial contaminada com combustíveis.

Considerando o crescimento dos isolados em meio mineral mais gasolina contendo o indicador de atividade metabólica TTC (cloreto de tetrazolium), os isolados que apresentaram maior crescimento, no menor intervalo de tempo, e por consequência, que tornaram o meio mais roxo, foram os seguintes: UFRGS02, UFRGS04, UFRGS08, UFRGS09 e UFRGS10. Estes cinco isolados foram selecionados para os testes posteriores.

4.1.4 Análise molecular dos isolados bacterianos

A análise da seqüência do gene do RNAr 16S indicou que estes cinco isolados pertencem ao gênero *Pseudomonas* (Tabela 3). Este gênero tem sido extensivamente utilizado nos estudos de biodegradação de BTX (Cunha, 1996 e 2000; Di Lecce *et al.*, 1997; Parales *et al.*, 2000; Solano-serena *et al.*, 2000b; Alvarez & Hunt, 2002; Prantera *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2002; Shim *et al.*, 2002; Otenio *et al.*, 2005; Perfumo *et al.*, 2006).

TABELA 3. Identificação dos microrganismos degradadores de gasolina pelo subsequenciamento do gene do RNAr 16S.

Isolado	Comparação da seqüência do RNAr 16S
	Isolado ou espécie mais próxima
UFRGS02	<i>Pseudomonas putida</i>
UFRGS04	<i>Pseudomonas putida</i>
UFRGS08	Não identificado
UFRGS09	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
UFRGS10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

4.2 Avaliação da degradação da gasolina comercial pelos isolados selecionados

4.2.1 Seleção da concentração de gasolina comercial no meio

Os testes para determinação do limite de detecção, bem como das curvas de calibração foram realizados anteriormente às análises cromatográficas dos experimentos. Estes testes foram conduzidos em quintuplicatas e repetidos quatro vezes, com percentuais de gasolina comercial no meio mineral de 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2%. O método mostrou-se linear de 0,25 a 1 %. Desta forma, foi estabelecido o valor de 1 % de gasolina comercial no meio mineral para a realização dos demais testes (Apêndice 4). Cunha (1996) afirma que a adição de gasolina comercial nas concentrações de 1 a 5 %, estimulam igualmente o crescimento microbiano.

4.2.2 Padronização do inóculo

A padronização do inóculo foi realizada com o isolado UFRGS02 selecionado por ter sido o mais abundante. Conforme observado na Figura 2, o inóculo utilizado foi de aproximadamente $7,3 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ e durante o período de análise de 80 horas, foi possível caracterizar as diferentes fases do crescimento bacteriano.

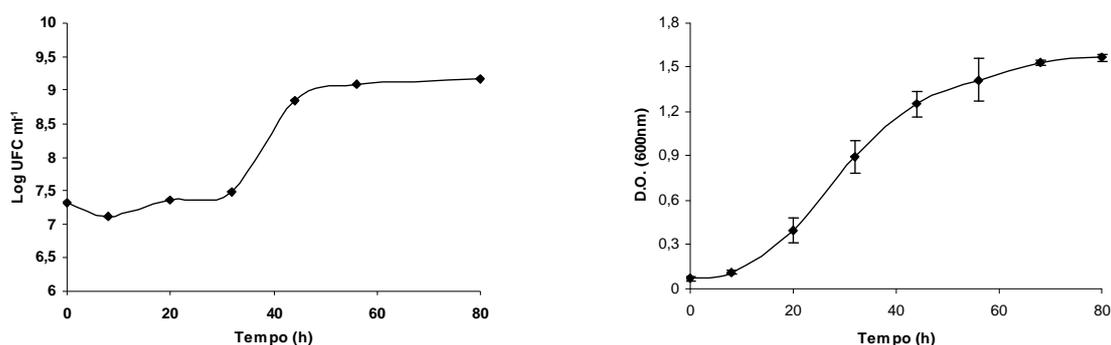


FIGURA 2. Curva de crescimento do isolado bacteriano UFRGS02 em meio mineral MM1 contendo 1 % de gasolina comercial (dados são média de duas repetições; barras representam o erro padrão).

4.3 Caracterização do comportamento dos isolados pré-selecionados

4.3.1 Curvas de crescimento em meio mineral e etanol ou meio mineral e gasolina comercial

As curvas de crescimento dos isolados foram obtidas realizando-se leituras em espectrofotômetro. Optou-se por avaliar o crescimento bacteriano por densidade ótica (D.O.) a partir de testes preliminares realizados. Na Figura 3, são apresentados os resultados de D.O. dos isolados selecionados que cresceram em meio mineral MM1 contendo 0,24 % de etanol ou em meio mineral MM1 contendo 1,0 % de gasolina comercial durante 54 horas.

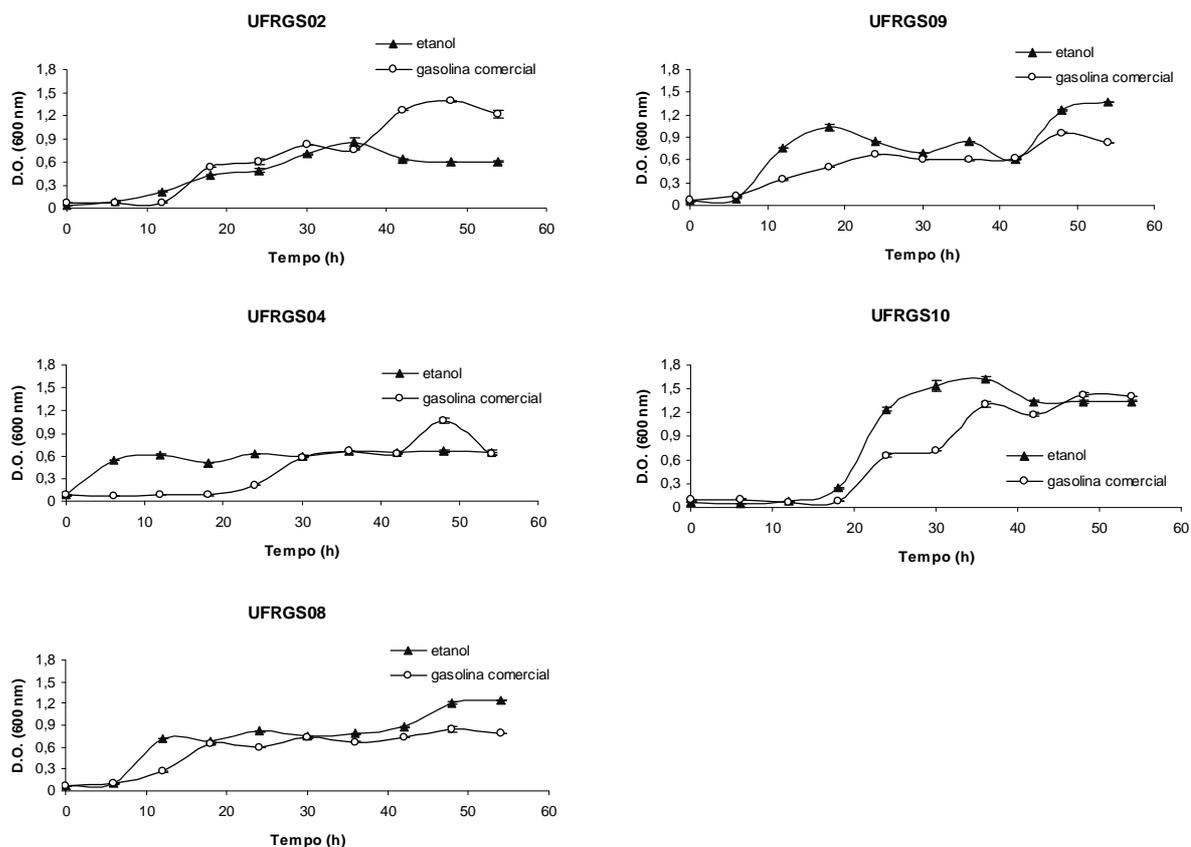


FIGURA 3. Curvas de crescimento dos isolados UFRGS02, UFRGS04, UFRGS08, UFRGS09 e UFRGS10 em meio mineral MM1 contendo 0,24 % de etanol ou em meio mineral MM1 contendo 1,0 % de gasolina comercial durante 54 horas (dados são média de duas repetições; barras representam o erro padrão).

Observa-se de modo geral que quando os isolados cresceram na presença do etanol o período de adaptação (fase lag) foi mais curto que quando cresceram na presença da gasolina comercial. Do início do experimento até 6 horas para os isolados UFRGS02, UFRGS08 e UFRGS09 e, até 12 horas, para o isolado UFRGS10, observou-se o período de adaptação de crescimento na presença de etanol. O isolado UFRGS04 não apresentou período de adaptação para este substrato, entretanto, na presença de gasolina comercial, o período de adaptação foi de 18 horas também verificado para o isolado UFRGS10. Os isolados UFRGS08, UFRGS09 e UFRGS02 apresentaram um período de adaptação de 6,

6 e 12 horas respectivamente na curva de crescimento com gasolina comercial (24 % de etanol).

O etanol pode ser degradado por enzimas constitutivas associadas a rotas metabólicas existentes, e os microrganismos que podem degradar os álcoois simples são mais comuns na natureza do que os microrganismos que degradam combinações de BTX. Então, é provável que muitas espécies que não podem degradar BTX proliferem quando o etanol estiver presente (Corseuil *et al.*, 1998; Powers *et al.*, 2001; Alvarez & Hunt, 2002; Dakhel *et al.*, 2003). Na realidade, o crescimento microbiano é geralmente mais rápido em etanol, devido a maior solubilidade do etanol e a presença de enzimas constitutivas em relação a fração BTX (Powers *et al.*, 2001). A fração BTX é considerada tóxica e com solubilidade em água relativamente maior que outros constituintes do petróleo (Lapertot *et al.*, 2007).

O aumento do número de células dos isolados ocorreu em uma escala logarítmica, na presença de etanol, até as 12 horas para o isolado UFRGS04, até as 36 horas para os isolados UFRGS02 e UFRGS10 e até as 54 horas para os isolados UFRGS08 e UFRGS09, sendo sustentada pela concentração de etanol dissolvida no meio mineral. Assim a quantidade de etanol solúvel no meio foi maior que a demanda pela biomassa, que ainda era pequena, fazendo com que os microrganismos crescessem em sua máxima taxa, isto é, o limitante nesta fase foi somente o metabolismo celular e não a biodisponibilidade.

Na presença de gasolina comercial, todos os isolados levaram 48 horas para atingir, em uma escala logarítmica, o maior número de células, seguidos de uma fase estacionária de crescimento até o final do experimento. Observa-se que o isolado UFRGS10 apresentou um número maior de células (maior densidade ótica) na presença de etanol, enquanto que na presença de gasolina comercial, os isolados UFRGS02 e UFRGS10 é que atingiram praticamente o maior e o mesmo valor de densidade ótica.

Abuhamed *et al.* (2004) avaliaram o efeito da adaptação de *Pseudomonas putida* F₁ na biodegradação de benzeno, tolueno e fenol. Estes autores

encontraram que a adaptação reduziu o tempo de biodegradação do benzeno e tolueno de 24 para 6 horas (90 mg L^{-1}). Lapertot *et al.* (2007) também avaliaram o cultivo de bactérias adaptadas para a degradação de uma mistura composta de tolueno, etilbenzeno e xileno. Foi constatado que os resultados do reator monitorado automaticamente são próximos, quase que similares, àqueles cultivados em condições controladas manualmente.

Segundo Gülensoy & Alvarez (1999) muitos microrganismos expressam enzimas que os habilitam a degradar vários compostos poluentes, entre eles a fração BTEX, entretanto a diferença na capacidade de degradação está associada a exposição prévia aos contaminantes. Neste sentido, os nossos isolados bacterianos, embora tenham sido obtidos após 3 transferências em meio mineral e gasolina, foram mantidos em agar nutritivo. A preparação do inóculo também foi realizada em meio nutritivo, que do ponto de vista nutricional é caracterizado como um meio rico. Desta forma, as bactérias ao serem inoculadas no meio mineral mínimo (sais minerais) e gasolina comercial como fonte de carbono, provavelmente necessitam de um tempo maior para a indução de enzimas. Em nossos experimentos os inóculos bacterianos não foram previamente crescidos na gasolina comercial.

4.3.2 Medidas de pH em meio mineral e etanol ou meio mineral e gasolina comercial

As medidas de pH foram obtidas realizando-se avaliações do meio de cultura sem células. Na Figura 4, são apresentados os resultados das medidas de pH dos isolados selecionados que cresceram em meio mineral MM1 contendo 0,24 % de etanol ou em meio mineral MM1 contendo 1,0 % de gasolina comercial durante 54 horas.

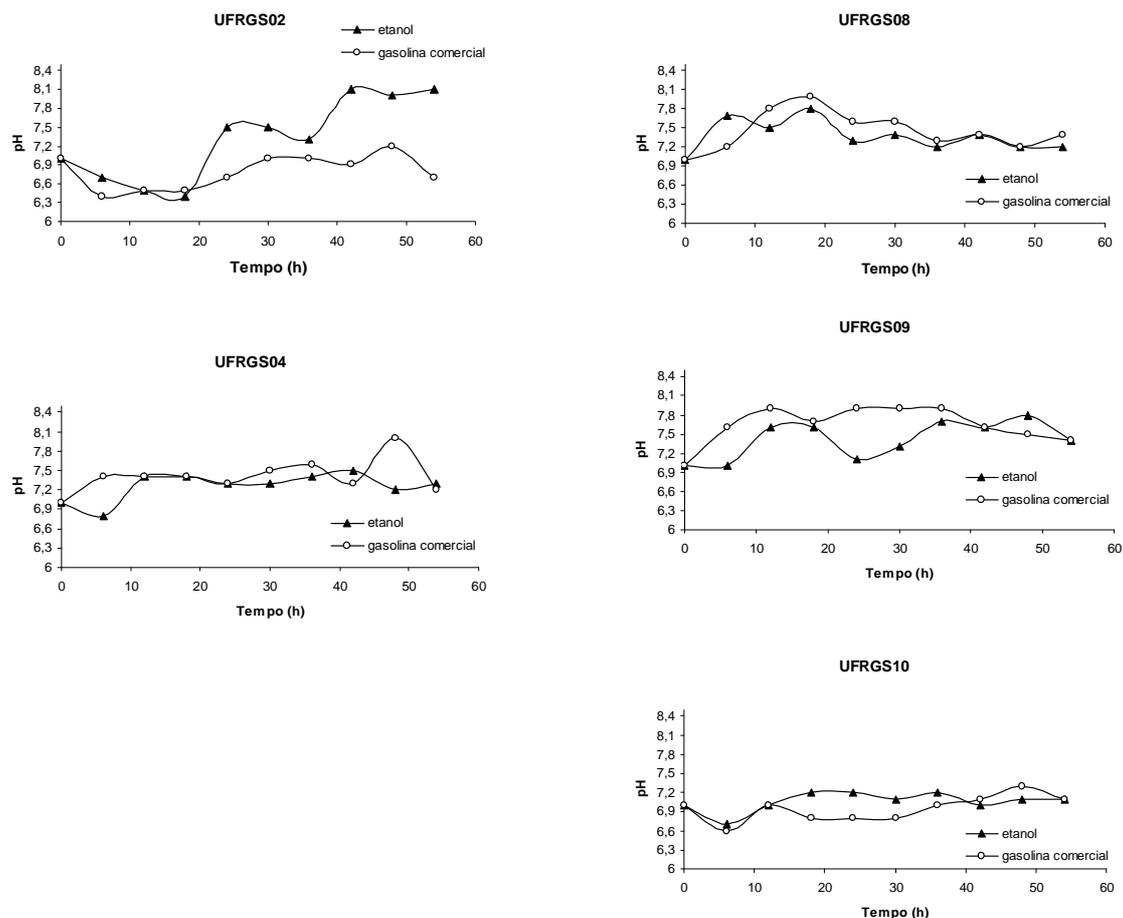


FIGURA 4. Medidas de pH do meio mineral MM1 contendo 0,24 % de etanol e do meio mineral MM1 contendo 1,0 % de gasolina comercial durante 54 horas de crescimento dos isolados UFRGS02, UFRGS04, UFRGS08, UFRGS09 e UFRGS10.

Na presença de etanol, não foi observado tendência geral de comportamento para os isolados. O isolado UFRGS09 apresentou oscilações nas medidas de pH de 7,0 a 7,7 durante o experimento, associado a um dos maiores crescimentos bacterianos. Os isolados UFRGS04 e UFRGS10 apresentaram uma tendência a neutralidade após uma curta acidificação do meio com variação na medida de pH em torno de 0,3 no tempo de 6 horas. Entretanto, o isolado UFRGS04 teve um início imediato no aumento do número de células e o isolado UFRGS10 apresentou um período de adaptação do crescimento que durou até as 12 horas. Mesmo apresentando tendência a neutralidade, o isolado UFRGS08

apresentou acréscimo de pH de 7,0 para 7,8 nas primeiras 18 horas do experimento. O isolado UFRGS02 apresentou redução do pH de 7,0 para 6,4 até o tempo 18 horas, a partir deste tempo foi observado um aumento gradativo do pH até 8,1 no tempo 42 horas associado a um dos menores crescimentos bacterianos.

Quando cultivados em meio mineral com gasolina comercial, todos os isolados apresentaram uma tendência a neutralidade após uma curta alcalinização ou acidificação do meio. A maior redução de pH de 7,0 para 6,4 foi observada para o isolado UFRGS02, associado também ao seu maior crescimento durante o experimento. Os isolados UFRGS04, UFRGS08 e UFRGS09 apresentaram um número constante na concentração de células a partir dos tempos 30, 18 e 24 respectivamente depois de terem apresentado uma alcalinização inicial do meio. Embora o isolado UFRGS04 tenha apresentado acréscimo de pH de 7,0 para 8,0 e um aumento na variação da densidade ótica de 0,45, a queda na concentração de células foi menos acentuada em relação aos dois isolados acima citados (Figura 3). O comportamento diferenciado deste isolado em elevar o pH pode estar relacionado com a produção de metabólitos de caráter básico.

O valor de pH em que os isolados apresentaram o maior crescimento foi próximo da neutralidade, o que se deve provavelmente a adaptação prévia dos isolados a este pH, uma vez que no enriquecimento e na seleção dos isolados o pH do meio era 7,0.

As diferenças observadas no crescimento dentro da mesma espécie, como é o caso dos isolados UFRGS02 e UFRGS04 identificados como *P. putida* e os isolados UFRGS09 e UFRGS10 identificados como *P. aeruginosa*, podem ser atribuídas a capacidade intrínseca de cada microrganismo em manter sua capacidade metabólica de degradação do etanol ou dos hidrocarbonetos presentes na gasolina comercial durante o armazenamento e a realização dos experimentos. Além disto, é esperado a ocorrência de uma fase lag devido a transferência dos microrganismos de um meio rico (ágar nutritivo utilizado no armazenamento) para o meio mineral mais etanol ou com meio mineral mais gasolina comercial utilizados nos experimentos.

A oxidação do etanol e dos hidrocarbonetos pelos microrganismos envolve a transformação dos alcanos em álcoois, aldeídos e ácidos graxos. A presença de metabólitos, como os ácidos orgânicos, pode ser responsável pela redução do pH, mas é preciso considerar etapas intermediárias, que poderão envolver outros compostos orgânicos (sem características ácidas), álcoois e cetonas.

Desta forma, a competência enzimática das espécies envolvidas (aspectos fisiológicos, estabilidade do inóculo) em degradar o etanol e os hidrocarbonetos presentes na gasolina comercial, bem como outros fatores (oxigênio, competição, tamponamento da solução) podem estar relacionados com a quantidade e o tipo de ácidos produzidos pelos microrganismos.

Há ainda que se considerar que o meio mineral utilizado apresenta poder de tamponamento do pH, o que se deve provavelmente a alta concentração de fosfato ($2,0 \text{ g L}^{-1}$). Provavelmente, as produções de metabólitos pelos microrganismos em geral, sejam eles ácidos ou básicos, pode ter ocorrido em baixas concentrações, não sendo observada alteração significativa no pH devido a capacidade de tamponamento do meio.

4.3.3 Degradação do etanol puro ou gasolina comercial em meio mineral

A verificação da capacidade dos isolados em degradar o etanol puro e a gasolina comercial foi avaliada pela técnica de cromatografia gasosa. Na Tabela 4, são apresentados os resultados de degradação do etanol puro (0,24 %) em meio mineral MM1 e dos compostos etanol, benzeno, tolueno, isômeros do xileno e isômeros do C9 da gasolina comercial (1,0 %) em meio mineral MM1 pelos isolados UFRGS02, UFRGS04, UFRGS08, UFRGS09 e UFRGS10 inoculados separadamente.

Observando os dados da Tabela 4, verifica-se que os isolados UFRGS02 e UFRGS10 apresentaram poder de degradação de aproximadamente 100 e 50 %, respectivamente, do etanol puro em 24 horas. Para o mesmo período, os isolados UFRGS04, UFRGS08 e UFRGS09 degradaram o etanol puro, aproximadamente, 27, 44 e 30 %, respectivamente.

TABELA 4. Degradação (%) do etanol puro (0,24 %) em meio mineral MM1 e dos compostos etanol, benzeno, tolueno, isômeros do xileno e isômeros do C9 da gasolina comercial (1,0 %) em meio mineral MM1 pelos isolados UFRGS02 e UFRGS10 durante 48 horas e pelos isolados UFRGS04, UFRGS08 e UFRGS09 durante 72 horas, inoculados separadamente.

Isolado	Tempo (h)	Etanol (0,24 %)	Gasolina Comercial (1,0 %)				
			Etanol	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9
			-----%				
UFRGS02	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	99,7	100,0	0,0	39,9	67,0	0,0
	48	99,8	100,0	0,0	39,9	67,0	0,6
UFRGS04	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	9,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	12	17,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	18	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	27,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	19,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	26,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
UFRGS08	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	5,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	12	27,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	18	40,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	43,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	50,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	55,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
UFRGS09	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	12	11,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	18	15,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	28,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	41,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	46,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
UFRGS10	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	48,0	100,0	14,5	67,0	5,9	0,0
	48	100,0	100,0	14,63	67,2	5,9	0,0

Na presença de gasolina comercial, o isolado UFRGS02 foi capaz de degradar o tolueno, os isômeros do xileno e os isômeros do C9, e não sendo degradado o benzeno do meio mineral em 24 horas. A maior degradação ocorreu com os isômeros do xileno (67,0 %), sendo que este valor representa 80,0 % de degradação do isômero de posição alfa. Os outros isômeros de posição do xileno não apresentaram degradação. Esse isolado foi o único que apresentou

degradação dos isômeros do C9 (0,6 %). Porém, na presença do mesmo substrato e no mesmo período, o isolado UFRGS10 mostrou ser capaz de degradar o benzeno, o tolueno e os isômeros do xileno não sendo degradados os isômeros do C9. A maior degradação ocorreu com o tolueno (67,0 %), seguido pelo benzeno (14,6 %). A degradação dos isômeros do xileno foi de 5,9 %, sendo que este valor representa 18,9 % de degradação do isômero de posição gama e 7,5 % do isômero de posição beta. O isômero de posição alfa não apresentou degradação.

Os isolados UFRGS02 e UFRGS10 identificados como *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa* mostraram-se capazes de degradar compostos tóxicos monitorados da gasolina comercial. Segundo Siegmund & Wagner (1991), a capacidade de degradar tolueno e os isômeros do xileno pode indicar a presença do plasmídeo TOL, pois a rota degradadora deste gene não utiliza benzeno como substrato, mas sim os isômeros do xileno e do tolueno, conforme verificado pela bactéria *Pseudomonas putida*. Assim como no presente trabalho, Otenio *et al* (2005) estudou a degradação de BTX por *P. putida* CCMI 852, portadora do plasmídeo TOL, onde o isolado apresentou a capacidade de degradar os mesmos compostos (tolueno e os isômeros do xileno). Este autor também verificou que a presença do benzeno reduziu em 50 % a degradação desses compostos.

Verificou-se que os isolados UFRGS04 e UFRGS09 não degradaram nenhum dos compostos monitorados da gasolina comercial. Apesar disto e de terem sido identificados como *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, observou-se pela curva de crescimento, conforme Figura 3, que houve um aumento da população microbiana, sugerindo que outros compostos que não foram monitorados possam ter sido utilizados para o crescimento da mesma, já que a única fonte de carbono e energia era a gasolina comercial. Este comportamento também foi verificado pelo isolado UFRGS08, o qual não foi identificado no presente trabalho.

Observou-se que o etanol presente na gasolina comercial foi degradado, preferencialmente, pelos isolados UFRGS02 e UFRGS10 em relação à fração BTX e C9, no período de 24 horas, uma vez que 100 % do etanol foi degradado e

nenhum dos demais compostos monitorados apresentaram qualquer percentual de degradação neste tempo.

A habilidade destes isolados em degradar preferencialmente o etanol da gasolina comercial em relação aos compostos BTX e C9 pode estar relacionada ao fato de o etanol ser um composto de estrutura muito simples sendo facilmente degradado pelas enzimas constitutivas, que são aquelas que participam em vias metabólicas centrais, ou seja, são sempre produzidas, independente das condições ambientais (Rice, 2000), enquanto que, a degradação dos BTX e C9 requer a atividade de enzimas específicas. Resultados semelhantes foram encontrados por Powers *et al.* (2001) que compararam a biodegradação do etanol com os compostos BTX e verificaram que os isolados cresceram preferencialmente as expensas do etanol. A degradação do etanol consome o oxigênio, os nutrientes e substratos necessários para a biorremediação dos BTX nas águas subterrâneas, o que acarretaria no decréscimo da degradação dos BTX pela falta de aceptores de elétrons na água (Corseuil *et al.*, 1998; Deeb *et al.*, 2002).

Analisando os dados obtidos para os isolados UFRGS04, UFRGS08 e UFRGS09 verificou-se que os mesmos não degradaram preferencialmente o etanol presente na gasolina comercial, sugerindo que havia outras fontes de carbono e energia que não as monitoradas que foram prontamente utilizadas para o seu crescimento. Segundo Lapertot *et al.* (2007), os solventes (TEX) são conhecidos por acumularem e usarem a membrana celular bacteriana, desta forma afetando a integridade estrutural e funcional da célula, sendo o crescimento inibido por efeitos tóxicos dos TEX. Além disso, o comportamento dos microrganismos na biodegradação é muito inconstante. A capacidade de degradarem componentes pode não se verificar nos mesmos compostos em idênticas condições num momento seguinte.

4.3.4 Tensão superficial em meio mineral e etanol ou em meio mineral e gasolina comercial

Para avaliar se os isolados produziram compostos de ação tensoativa durante o crescimento em meio mineral mais etanol ou gasolina comercial, foi feito à detecção de biossurfactantes através do acompanhamento da redução da medida da tensão superficial. Na Tabela 5, são apresentados os resultados de tensão superficial (T.S.) do meio mineral MM1 contendo 0,24 % de etanol durante o crescimento dos isolados por 72 horas.

O meio mineral MM1 utilizado durante os ensaios de crescimento dos isolados apresentou valor próximo ($70,2 \text{ mN m}^{-1}$) ao encontrado para a água destilada ($70,0 \text{ mN m}^{-1}$). Foi observado que o tratamento controle (sem microrganismos), na presença de etanol, não apresentou redução significativa nas medidas de tensão superficial durante 72 horas de incubação. O meio contendo o isolado UFRGS02 foi responsável pela maior redução da tensão superficial ($28,0 \text{ mN m}^{-1}$, observada no tempo 30 horas), seguido dos isolados UFRGS08 e UFRGS09, cuja redução média foi de $29,0 \text{ mN m}^{-1}$ no tempo 18 horas. Como a degradação do etanol pelo isolado UFRGS02 foi de 100,0 % em 24 horas e a redução observada na tensão superficial foi às 30 horas. Sugere-se que os biossurfactantes tenham sido produzidos a partir de alguma substância de reserva do isolado UFRGS02.

Quando cultivados em etanol, o comportamento de três isolados (UFRGS08, UFRGS09 e UFRGS10) foi semelhante. Eles apresentaram reduções gradativas nas medidas de tensão superficial até às 18 horas. A partir deste tempo, verificou-se um acréscimo que se estendeu até as 48 horas. Tão logo este tempo foi atingido, as medidas começaram a reduzir novamente.

Os resultados de tensão superficial (T.S.) do meio mineral MM1 contendo 1,0 % de gasolina comercial durante o crescimento dos isolados por 72 horas estão apresentados na Tabela 6.

Observou-se que a medida do tempo zero do experimento apresentou um valor de tensão superficial menor que a do meio mineral ($70,2 \text{ mN m}^{-1}$) devido ao estabelecimento do equilíbrio entre a gasolina comercial e a fase aquosa do meio mineral. Ao longo das 72 horas, não ocorreu reduções significativas nas medidas de tensão superficial no tratamento sem microrganismos.

Os isolados UFRGS02 e UFRGS10, que apresentaram as maiores taxas de degradação dos compostos monitorados da gasolina, tiveram a tensão superficial reduzida de 70,2 para 44,4 e 40,6 mN m⁻¹, respectivamente, no tempo de 24 horas, demonstrando que ocorreu a produção de moléculas surfactantes durante a degradação das frações avaliadas.

A produção de biossurfactantes geralmente tem sido associada com o crescimento celular em meios de cultura ou em meios minerais seja com a fonte de carbono solúvel ou insolúvel. Alguns autores reportam a redução da tensão superficial do meio na fase exponencial de crescimento (Willumsen & Karlson, 1997). Isto foi verificado na Figura 3 pelos isolados UFRGS02 na presença de etanol, UFRGS04 na presença de gasolina comercial, e, UFRGS08 e UFRGS09 na presença dos dois substratos. Outros autores relatam que a redução pode ocorrer na fase estacionária, como observado no isolados UFRGS02 e UFRGS08 na presença de etanol, e UFRGS09 na presença dos dois substratos, sendo considerados por muitos autores como metabólitos secundários (Desai & Banat, 1997; Wu & Ju, 1998, Ron & Rosenberg, 2001; Pruthi & Cameotra, 2003; Tahzibi *et al.*, 2004).

4.3.5 Índice de emulsificação em meio mineral e etanol ou em meio mineral e gasolina comercial

O índice de emulsificação também foi avaliado para a detecção de biossurfactantes. Nas Tabelas 7 e 8, são apresentados os resultados de índice de emulsificação (I.E.) do meio mineral MM1 contendo 0,24 % de etanol, ou em meio mineral MM1 contendo 1,0 % de gasolina comercial, respectivamente, durante 72 horas de crescimento dos isolados.

O surgimento de emulsão no meio mineral, com células microbianas, na presença de etanol ou gasolina comercial indica que os biossurfactantes estão associados a parede da célula (Koch *et al.*, 1991; Bento *et al.*, 2007). Esta emulsão esteve localizada na interface gasolina/meio, mas preferencialmente posicionada no meio mineral, sugerindo a presença de um biossurfactante com afinidade pela fase hidrofílica.

A emulsão foi observada nos isolados UFRGS04, UFRGS08 e UFRGS09, enquanto que os isolados UFRGS02 e UFRGS10 não produziram ou não foi verificada a formação em nenhum tempo na presença de etanol. Este comportamento pode ter ocorrido tendo em vista que o etanol é usado para extrair a fração lipídica da parede celular e pode assim ter solubilizado a formação de emulsão (Chaud & Sgarbieri, 2006).

TABELA 7. Medidas de índice de emulsificação do meio mineral MM1 contendo 0,24 % de etanol, durante 72 horas de crescimento dos isolados UFRGS02, UFRGS04, UFRGS08, UFRGS09 e UFRGS10.

Tempo (h)	Controle (MM1 + Etanol)	UFRGS02 + MM1 + Etanol	UFRGS04 + MM1 + Etanol	UFRGS08 + MM1 + Etanol	UFRGS09 + MM1 + Etanol	UFRGS10 + MM1 + Etanol
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	0,0	0,0	37,0	0,0	0,0	0,0
12	0,0	0,0	37,0	0,0	0,0	0,0
18	0,0	0,0	14,8	0,0	0,0	0,0
24	0,0	0,0	29,6	0,0	22,8	0,0
30	0,0	0,0	14,8	0,0	22,2	0,0
36	0,0	0,0	14,8	0,0	29,6	0,0
42	0,0	0,0	11,5	37,0	23,1	0,0
48	0,0	0,0	9,7	37,0	26,9	0,0
54	0,0	0,0	13,5	21,4	29,6	0,0
60	0,0	0,0	13,8	17,6	25,8	0,0
66	0,0	0,0	18,1	14,8	0,0	0,0
72	0,0	0,0	19,2	0,0	0,0	0,0

O maior valor de I.E. (37 %) foi observado nos isolados UFRGS04 e UFRGS08 nos tempos 6 e 12, e 42 e 48 horas, respectivamente. Verificou-se que os isolados apresentaram, no mesmo período, o maior número de células. Após esses tempos, o número de células permaneceu constante.

Conforme Bento *et al.* (2007), a produção de biossurfactantes pode ocorrer no final da fase estacionária de crescimento, sugerindo que seja um metabólito secundário, o que foi observado na presença do isolado UFRGS08.

Alguns compostos da gasolina possuem baixa solubilidade em água, o que pode dificultar o ataque enzimático dos microrganismos degradadores. A adição

de etanol, totalmente solúvel, aumenta a solubilidade dos compostos da gasolina, facilitando a dissolução da fração BTX na fase aquosa (Da Silva & Alvarez, 2002). Porém, a medida que o etanol é degradado, os microrganismos podem utilizar mecanismos que aumentam a sua disponibilidade de substrato às células.

De acordo com os dados de índice de emulsificação de gasolina comercial (Tabela 8) o isolado UFRGS10 apresentou após 18 horas de incubação os melhores valores, chegando a 61,5 %. Sendo que, nos tempos 24 e 66 horas, também foi verificada a produção de emulsão de 46,15 e 30,77 %, respectivamente.

O isolado UFRGS08 apresentou no tempo 12 horas a maior produção de emulsão (37 %), coincidindo com a maior redução de tensão superficial (34,0 mN m⁻¹). Esse valor do I.E. foi atingido também pelos isolados UFRGS04 e UFRGS09 nos tempos 24 e, 48 e 54 horas respectivamente.

TABELA 8. Medidas de índice de emulsificação do meio mineral MM1 contendo 1,0 % de gasolina comercial, durante 72 horas de crescimento dos isolados UFRGS02, UFRGS04, UFRGS08, UFRGS09 e UFRGS10.

Tempo (h)	Controle (MM1 + Gas.com.)	UFRGS02 + MM1 + Gas. com.	UFRGS04 + MM1 + Gas. com	UFRGS08 + MM1 + Gas. com	UFRGS09 + MM1 + Gas. com	UFRGS10 + MM1 + Gas. com
	----- % -----					
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	0,0	0,0	14,8	20,8	14,8	0,0
12	0,0	0,0	15,9	37,0	18,6	0,0
18	0,0	15,4	22,2	19,6	22,2	61,5
24	0,0	23,1	37,0	16,5	22,2	46,1
30	0,0	0,0	19,2	14,8	22,2	0,0
36	0,0	0,0	14,8	0,0	22,2	0,0
42	0,0	0,0	0,0	0,0	29,6	0,0
48	0,0	0,0	0,0	21,5	37,0	0,0
54	0,0	0,0	0,0	37,0	37,0	0,0
60	0,0	0,0	14,8	29,6	29,6	0,0
66	0,0	0,0	22,2	22,2	22,2	30,8
72	0,0	0,0	29,6	22,2	22,2	0,0

Os isolados UFRGS02 e UFRGS10 podem ter consumido o surfactante como uma das fontes de carbono e energia a partir do tempo 24 horas, já que não

mais foi produzida emulsão nos tempos seguintes. Além disso, foi observado que não houve alterações nas porcentagens de degradação dos compostos monitorados da gasolina pelas bactérias (Tabela 4). Por vezes, o consumo do surfactante pelo microrganismo é decorrente da ausência, baixa concentração ou indisponibilidade de fonte de carbono e energia no ambiente, gasolina comercial, induzindo a bactéria a procurar e degradar substratos com esses elementos.

Cunha *et al.* (2004) isolou microrganismos de locais contaminados com gasolina e avaliou a produção de biossurfactantes destes isolados bacterianos através de medidas de tensão superficial e índice de emulsificação. 70% das bactérias pertenciam ao gênero *Pseudomonas* e quando os isolados cresceram em meio mineral com gasolina comercial (22 % de etanol), 31 % dos isolados exibiram índices de emulsificação de 100 %, formando emulsões estáveis com a gasolina. Porém, neste mesmo trabalho, nas medidas de tensão superficial após 72 horas de incubação, não foi observado reduções significativas, sendo a menor redução obtida de 67,8 mN m⁻¹ (no meio mineral) para 43.9 mN m⁻¹ por um isolado identificado como *Pseudomonas putida* SVGG17. Entretanto, em nosso estudo, um dos isolados identificados como *Pseudomonas putida* (UFRGS04) em meio mineral com gasolina comercial como fonte de carbono, após 36 horas de incubação, reduziu a tensão do meio de 70,2 mN m⁻¹ para 29 mN m⁻¹ e apresentou índice de emulsificação de 14,8 %.

Muitos dos surfactantes produzidos por microrganismos degradadores de combustível não são constitutivos, requerendo a presença de alcanos para induzirem sua síntese. Segundo Rocha *et al.* (1992) dois isolados de *Pseudomonas aeruginosa* produziram biossurfactantes em meio de cultura com glicose como única fonte de carbono, embora a adição de óleo bruto na fase estacionária do crescimento resultou em um aumento da produção do biossurfactante. O consumo de glicose e a atividade emulsificante também foram acompanhados durante o crescimento de uma *Pseudomonas* sp. isolada de tanques de estocagem de óleo diesel. Após o consumo de glicose foi adicionado óleo diesel e constatado o aumento na atividade emulsificante, sugerindo a produção de compostos surfactantes (Bento & Gaylarde, 1996).

A produção de bioemulsificantes também tem sido associada com o crescimento celular em meios de cultura ou em meios mínimos. Os bioemulsificantes são geralmente produzidos quando as culturas atingem a fase estacionária de crescimento. Em vários casos foi demonstrado que a produção de emulsificantes é induzida por sinais moleculares envolvendo *quorum-sensing*. Esta característica regulatória parece ser geral e provavelmente se aplica a produção de ambos os emulsificantes de alto e baixo peso molecular (Ron & Rosenberg, 2001).

4.3.6 Detecção de ramnolípido

De acordo com os dados da Tabela 2, apresentada no item 4.1.3, dos 5 isolados bacterianos selecionados no estudo, duas bactérias identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* e o isolado UFRGS 08 produziram ramnolípido. Os dois isolados identificados como *Pseudomonas putida* não produziram biossurfactantes do tipo ramnolípidios, conforme o método proposto por Siegmund & Wagner (1991). Esta técnica foi originalmente desenvolvida para selecionar ramnolípidios, mas pode ser utilizada para selecionar qualquer biossurfactante aniônico de baixo peso molecular (Bodour & Maier, 2002).

Os ramnolípidios fazem parte de uma das maiores classes de biossurfactantes já estudadas, os glicolípideos (Maier & Soberón-Chaves, 2000). A produção de ramnolípidios é limitada a *P. aeruginosa* (Bodour *et al.*, 2003), sendo produzido no final da fase logarítmica e na fase estacionária. Eles facilitam a degradação de uma grande variedade de fontes de carbono, desde glicose (Guerra-Santos *et al.*, 1984; De Jesus, 1998), vários hidrocarbonetos em culturas líquidas (De Jesus, 1998; Solano-serena *et al.*, 1999), até hidrocarbonetos poliaromáticos (Déziel *et al.*, 1996), principalmente, quando alguns nutrientes, como N, P, Fe se encontram limitados no meio e em uma variedade de substratos como glicose (Guerra *et al.*, 1984) e ácido fosfórico (Bodour *et al.*, 2003).

O crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em alcanos de cadeia longa é atribuído a síntese e excreção de ramnolípidios extracelulares. Este fato foi demonstrado pela marcada redução na fase lag durante o período de crescimento

de 60 horas em hexadecano para menos de 10 horas, quando ramnolípídios foram adicionados ao meio (Wu & Ju, 1998). No entanto, existe uma especificidade de ação do biossurfactante associada ao modo de captação apresentada por cada espécie microbiana. Noordman & Jansen (2002) investigaram o efeito da presença e ausência de um ramnolípido na biodegradação de hexadecano por três espécies, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 e *Rhodococcus erythropolis*. O ramnolípido estimulou a degradação de hexadecano para a *Pseudomonas aeruginosa*. A presença do biossurfactante causou um aumento na hidrofobicidade celular, devido à extração de lipolissacarídeos do envelope celular pelo ramnolípido, o que facilitou a captação através do contato direto entre as células e as gotículas do hidrocarboneto (Noordman & Jansen, 2002). A diferença no comportamento entre as espécies foi atribuída as diversas formas de interação com o hidrocarboneto, uma vez que o biossurfactante produzido pelo *Rhodococcus erythropolis* é associado ao envelope celular (Rapp *et al.*, 1979; Homel, 1990; Noordman & Jansen, 2002).

Mulligan (2005) apresenta uma extensa revisão que inclui as aplicações ambientais dos biossurfactantes para o tratamento de solo e da água. Os biossurfactantes são promissores devido a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e efetividade em aumentar a biodegradação e solubilização de compostos de baixa solubilização. Até o presente momento a maioria dos trabalhos têm sido realizada com ramnolípídios e outros biossurfactantes precisam ser investigados, pois podem apresentar muitas propriedades promissoras.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- a) É possível isolar e caracterizar bactérias a partir de solos contaminados com hidrocarbonetos com potencial para degradar gasolina comercial;
- b) Algumas bactérias selecionadas apresentaram potencial para degradar tanto o etanol quanto o benzeno, o tolueno e os isômeros do xileno em meio mineral no tempo 24 horas;
- c) Apenas um isolado apresenta potencial para degradar um isômero de posição do C9;
- d) Ocorreu a degradação preferencial do etanol da gasolina comercial em meio mineral, no tempo 24 horas, por alguns isolados;
- e) Ocorreu a produção de biossurfactantes e bioemulsificantes por alguns isolados durante a degradação do etanol ou da gasolina comercial em meio mineral.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABUHAMED, T.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOGLU, T.; MEHMETOGLU, Ü. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegra. **Process Biochemistry**, Chicago, v.3, p.983-988, 2004.
- ALCALDE, T. K. **Determinação de solventes orgânicos em urina por cromatografia gasosa empregando headspace e SPME-Headspace**. 90 f. Dissertação (Mestre em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- ALEF, K. Estimation of microbial activities. In: ALEF, K. et al. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1995. p.193-270.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nuclei Acids Reasearch**, Oxford, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- ALVAREZ, P.J.J.; HUNT, C.S. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, São Paulo, v.44, n.2, p.83-104, 2002.
- ASUBEL, F.M. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley and Sons, 1997. p.781.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4th ed. Menlo Park : Benjamin/Cummings, 1998. 694p.
- BARDI, L; MATTEI, A; STEFFAN, S; MARZONA, M. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.27, p. 709-713, 2000.

- BENTO, F.M.; GAYLARDE, C.C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel fuels. **International Biodegradation & Biodeterioration**, Suitland, v.38, n.1, p.31-33, 1996.
- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, Chicago, v.96, n.9, p.1049-1055, 2005.
- BENTO, F.M.; GAYLARDE, C.C.; CAMARGO, F.A.O. Biosurfactantes. In: BENTO et al. **Microbiologia Ambiental**. 2nd ed. Embrapa, 2007. (em fase de publicação).
- BEWLEY, R.J.F. Field implementation of in situ bioremediation: key physicochemical and biological factors. In: STOTZKY, G.; BOLLAG, J. M. **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. v.9, p.473-542.
- BODOUR, A.A.; MAIER, R.M. Biosurfactants: types, screening methods and applications. In: ENCYCLOPEDIA of Environmental Microbiology. Hardcover: Gabriel Bitton, 2002. p.750-770.
- BODOUR, A.A.; DREES, K.P.; MAIER, R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.6, p.3280-3287, 2003.
- BOTTON, S.; PARSONS, J. R. Degradation of BTX by dissimilatory iron-reducing cultures. **Biodegradation**, Dordrecht, v.18, p.371-381, 2007.
- BRADDOCK, J.F.; CATTERALL, P.H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.3, p.81-84, 1999.
- CAMARGO, F.A.O. et al. *In vitro* reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 39 stimulated by Cu⁺⁺. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.62, n.5-6, p.569-573, 2003.
- CAIRNEY, S. et al. The neurobehavioural consequences of petrol (gasoline) sniffing. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, New York, v.26, p.81-89, 2002.
- CAMEOTRA, S.; BOLLAG, J.M. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Philadelphia, v.30, n.2, p.111-126, 2003.
- CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Current Opinion Biotechnology**, New York, v.4, p.331-338, 1993.

- CETESB. **Relação de áreas contaminadas**. Disponível em:
<http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp>.
Acesso em: 15 nov. 2006.
- CHAUD, S.G.; SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, 2006.
- CORDAZZO, J. Modelagem e solução numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas. **Revista Roteiro**, Joaçaba - SC, 2000.
- CORSEUIL, H.X.; MARTINS, M.D. Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v.2, n.2, p.50-54, 1997.
- CORSEUIL, H.X.; HUNT, C.S.; SANTOS, R.C.F.; ALVAREZ, P.J.J. The influence of the gasoline Oxygenate Ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. **Water Research**, Orlando, v.32, n.7, p.2065-2072, 1998.
- CORSEUIL, H.X.; MARTINS, M.D. Efeitos causados pela mistura de gasolina e álcool em contaminações de águas subterrâneas. **Boletim Técnico da Petrobrás**, Rio de Janeiro, v. 41, n.2, p.133-138. 1998.
- CORSEUIL, H.X.; FERNANDES, M. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v.4, n.1, p.71-75, 1999.
- CORSEUIL, H.X.; KAIPPER, B.I.A.; FERNANDES, M. Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol. **Water Research**, Orlando, v.38, n.6, p.1449-1456, 2004.
- CUNHA, C.D. **Avaliação da biodegradação de gasolina em solo**. 1996. 97 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.
- CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, n.31, p.4-49, 2000.
- CUNHA, C.D.; ROSÁRIO, M.; ROSADO, A.S.; LEITE, S. G. F. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. **Process Biochemistry**, Chicago, v. 39, p. 2277-2282, 2004.

- DAKHEL, N.; PASTERIS, G.; WERNER, D.; HOHENER, P. Small-volume releases of gasoline in the vadose zone: impact of the additives MTBE and ethanol on groundwater quality. **Environmental Science & Technology**, London, v.37, n.10, p.2127-2133, 2003.
- DA SILVA, M.L.B.; ALVAREZ, P.J.J. Effects of ethanol versus MTBE on benzene, tolueno, ethylbenzene, and xylene natural attenuation in aquifer columns. **Journal of Environmental Engineering**, Amsterdam, v.128, n.9, p.862-866, 2002.
- DEEB, R.A.; SHARP, J.O.; STOCKING, A.; McDONALD, S.; WEST, K.A.; LAUGIER, M.; ALVAREZ, P.J.J.; KAVANAUGH, M.C.; ALVAREZ-COHEN, L. Impact of ethanol on benzene plume lengths: microbial and modeling studies. **Journal of Environmental Engineering**, Amsterdam, v.128, n.9, p.868-875, 2002.
- DE JESUS, S.H. **Isolamento e caracterização de bactérias biodegradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de biossurfactantes**. 1998. 120 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, p.47-64, 1997.
- DÉZIEL, É.; PAQUETTE, G.; VILLEMUR, R.; LÉPINE, F. ; BISSALLON, J-G. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.1908-1912, 1996.
- DI LECCE, C.; ACCARINO, M.; BOLOGNESE, F.; GALLI, E.; BARBIERI, P. Isolation and metabolic characterization of a pseudomonas stutzeri mutant able to grow on the three isomers of xylene. **Microbiology**, São Paulo, v.63, p.3279-3281, 1997.
- EDWARDS, D.A. et al. Experimental data and modeling for surfactant micelles, HOCs and soil. **Journal Environmental Engineering**, Amsterdam, v.120, p.23-41, 1994.
- FERREIRA, S.M. **Relação entre a espessura real e aparente da gasolina com etanol e da gasolina pura em colunas de laboratório**. 2003. 119 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Minerais Hidrogeologia, Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

FISPQ. **Ficha de informação de segurança de produtos químicos**. Disponível em: <[http://www.br.com/pdf/produtos quimicos/fispq](http://www.br.com/pdf/produtos_quimicos/fispq)>. Acesso em: 5 agosto 2007.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.48, n.2, p.301-305, 1984

GÜLENSOY, N.; ALVAREZ, J.J.P. Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbon biodegradation capabilities. **Biodegradation**, Netherlands, v.10, p.331-340, 1999.

HOLLIGER, C. et al. Contaminated environmental in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.20, n.4, p.517-523, 1997.

HOMEL, R.K. Formation and physiological role of biosurfactants reduced by hydrocarbon - utilizing microorganisms. **Biodeterioration**, Amsterdam, v.1, p.107-119, 1990.

JACQUES, R. J. S. **Biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no solo**. 2005. 188 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

KARIMI-LOTFABAD, S.; PICKARD, M.; GRAY, M.R. Reaction of polynuclear aromatic hydrocarbons on soil. **Environmental Science & Technology**, Washington, v.30, n.4, p.1145-1151, 1996.

KASTNER, M. et al. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.1, p.359-362, 1998.

KLAASSEN, C.D. Tóxicos ambientais não-metálicos: poluentes do ar, solventes e vapores e pesticidas. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

KOCH, K.A.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, n.3, p.4212-4219, 1991.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254p.

LAPERTOT, M.; SEIGNEZ, C.; EBRAHIMI, S.; DELORME, S.; PERINGER, P. Mass production of bacterial communities adapted to the degradation of

- volatile organic compounds (TEX). **Biodegradation**, Amsterdam, v.18, p.343-350, 2007.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environmental. **Microbiological Reviews**, London, v.54, p.305-315, 1990.
- MADIGAN, J.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8th ed. Upper Saddle River, NJ : Prentice Hall, 1997.
- MALINA, G.; GROTENHUIS, J.T.C.; RULKENS, W.H. Vapor extration/Biovent seqüencial treatment of soil contaminated with volatile and semivolatile hydrocarbon mixtures. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.6, n.2, p.159-176, 2002.
- MAIER, R.M.; SOBERÓN-CHAVES, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.54, p.625-633, 2000.
- MAIER, R. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.52, p.101-121, 2003.
- MARCHAL, R.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J.P. Gasoline and diesel oil biodegradation. **Oil & Gas Science and Technology**, Paris, v.58, n.4, p.441-448, 2003.
- MORAIS, E. B.; TAU-K-TORNISIELO, S.M. Biodegradação de Resíduos Oleosos de Refinaria de Petróleo através do Sistema de Biopilhas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA APLICADA, 9., 2004, Curitiba. Curitiba, 2004.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, Amherst, v.133, p.183-198, 2005.
- MURIEL, J.M.; BRUQUE, J.M.; OLÍAS, J.M.; JIMENEZ-SANCHEZ, A. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. **Biotechnology Letters**, Northwood, v.18, n.3, p.235-240, 1996.
- NYER, E.K. Practical techniques for groundwater and soil remediation. United States of America: **Lewis publishers**, London, 1992, 214 p.
- NOORDMAN, W.T.; JANSSEN, D.B. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n.9, p.4502-4508, 2002.
- OTENIO, M. H.; SILVA, M. T. L.; MARQUES, M. L. O.; ROSEIRO, J. C.; BIDOIA, E.D. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, p.258-261, 2005.

- PARALES, R.E.; DITTY, J.L.; HARWOOD, C.S. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene and trichloroethylene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, Sept., p.4098-4104, 2000.
- PERFUMO, A.; BANAT, I.M.; CANGANELLA, F.; MARCHANT, R. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.72, p.132-138, 2006.
- POWERS, S.; HUNT, C.G; HEERMANN, S.E.; CORSEUIL, H.X.; RICE, D.; ALVAREZ, J.J. The transport and Fate of ethanol and BTEX in Groundwater contaminated by gasohol. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Philadelphia, v.31, n.1, p.79-123, 2001.
- PRADHAN, S.P. et al. Potencial of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. **Journal of Soil Contamination**, Boca Raton, v.7, n.4, p.467-480, 1998.
- PRANTERA, M.T.; DROZDOWICZ, S.G.L.; ROSADO, A.S. Degradation of gasoline aromatic hydrocarbons by two n₂-fixing soil bacteria. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v.24, p.85-89, 2002.
- PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactant by *Pseudomonas putida* – a Gujarat oil field isolate. **Journal Surfactants Detergents**, München, v.6, p.65-68, 2003.
- RAHMAN, K.S.M; BNAT, I.M.; THAHIRA, J.; THAYUMANAVAN, THA.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Techonology**, Chicago, v.81, p.25-32, 2002.
- RAPP, P.; BOCK, H.; WRAY, V.; WAGNER, F. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n- alkanes. **Journal of General Microbiology**, Berks, v.115, p.491-503, 1979.
- RATLEDGE, C. Hydrocarbons - Products of hydrocarbon - microorganism interaction. **Biodeterioration**, London, v.7, p.219-236, 1988.
- RATLEDGE, C. Biochemistry of aliphatic hidrocarbon assimilation and degradation. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE BIODETERIORAÇÃO, Campos de Jordão. **Anais**, São Paulo: SLAB, 1992. p.236-250.

- REILING, H.E.; THANEI-WYSS, L.H.; GUERRA-SANTOS, R.; HIRT, O.; KÄPPELI; FIECHTER, A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, n.5, p.985-989, 1986.
- REISFELD, A.; ROSENBERG, E.; GUTNICK, D. Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. **Applied Microbiology**, Washington, v.24, n.3, p.363-368, 1972.
- RICE, D. Background on ethanol. **Underground Tank Technology Update**, Madison, v.14, n.4, p.2-3, 2000.
- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v.44, p.93-100, 1999.
- RIFAI, H.S.; BORDEN, R.C.; WILSON, T.; WARD, C.H. Intrinsic bioattenuation for subsurface restoration. In: HINCHEE, R.E.; BROCKMAN, F.J.; VOGEL, C.M. **Intrinsic Bioremediation**. Columbus, OH: Battelle Press, 1995.
- ROCHA, C.; SAN-BLAGS, G.; SAN-BLAS, F.; VIERNA, L. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.8, p.125-128, 1992.
- RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.3, n.4, p.229-237, 2001.
- SIEGMUND, I.; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnology, Technology**, Northwood, v.5, p.265-268, 1991.
- SILVA SANTOS, A. da. **Adição de compostos oxigenados a motores do ciclo OTTO e DIESEL**. Rio de Janeiro : Escola de Química da UFRJ, 1998. Projeto final de curso.
- SIMS, J.L. et al. Approach to bioremediation of contaminated soil. **Hazardous Waste Hazardous Material**, London, v.7, p.117-149, 1990
- SOLANO-SERENA, R.M.; ROPARS, M.J.; LEBEAULT, M.; VANDECASTEELE, J.P. Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. **Journal of Applied Microbiology**, Bradford, v.86, p.1008-16, 1999.
- SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, R.; LEBEAULT, J.-M.; VANDECASTEELE, J.-P. Selection of microbial populations degrading recalcitrant hydrocarbons of gasoline by monitoring of culture-headspace composition. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.30, p.19-22, 2000a.

- SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, R.; CASARÉGOLA, S.; VASNIER, C.; LEBEAULT, J.-M.;VANDECASTEELE, J.-P. A Mycobacterium strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, june, p.2392-2399, 2000b.
- SCHNEIDER, M.R. **Intemperismo de fontes de contaminação em aquíferos impactados por derramamentos de gasolina e álcool e a influência sobre o risco à saúde humana**. 2005. 192 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- SHIM, H.; SHIN, E.; YANG, S. A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. **Advances in Environmental Research**, California, v.7, p.203-216, 2002.
- SMAM. **Smam interdita mais um posto de combustíveis**. Comunicação social. Disponível em: <<http://www.portoalegre.rs.gov.br/smam>>. Acesso em: 16 de fev. 2006.
- SPINELLI, L.F. **Biorremediação, toxicidade e lesão celular em derrames de gasolina**. 2005. 218 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- SKIPPER, H.D. Bioremediation of contaminated soils. In : SYLVIA, D. M. et al. (Ed.) **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p.469-481.
- SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; ALEXANDER, M. **Fundamentals of analytical chemistry**. 7nd ed. New York: Saunders College, 2001. p.205-209.
- STRUTHERS, J.K. et al. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.9, p.3368-3375, 1998.
- SZWARC, A. A Era da Emancipação. **Revista Agroanalysis**, Escola de Economia de São Paulo, v.20, n.03, p.49-50, 2000. Edição Especial.
- TAHZIBI, A.; KAMAL, F.; ASSADI, M.M. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. **Iranian Biomedical Journal**, Iranian, v.8, n.1, p.25-31, 2004.
- TIBURTIUS, E. R. L.; ZAMORA, P. P. Contaminação de águas por BTXE e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, São Paulo, v.27, p.441-446, 2004.

- TULEVA, B.J.; IVANOV, G.R.; CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Zeitschrift Naturforsch**, Local, v.57c, p.356-360, 2002.
- ULLER, L. A Natureza Corrosiva dos Solos e Avanços na Prevenção da Corrosão de Tanques de Armazenamento Subterrâneos. In: NACE LATIN AMERICAN REGION CORROSION CONGRESS, 2., Rio de Janeiro, 1996. **Plenary Lecture C-2**. Rio de Janeiro, 1996.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.67, n.4, p.503-549, 2003.
- ZHANG, Y.; MILLER, R.M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (Biosurfactant). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.10, p.3276-3282, 1992.
- YERUSHALMI, L.; MANUEL, M.F.; GUIOT, S.R. Biodegradation of gasoline and BTEX in a microaerophilic biobarrier. **Biodegradation**, Amsterdam, v.10, p.341-352, 1999.
- WATKINSON, R.J.; MORGAN, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Biodegradation**, Amsterdam, v.1, p. 79-92, 1990.
- WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soil, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, Amsterdam, v.7, p.415-423, 1997.
- WU, J.; JU, L.K. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.59, p.193-2002, 1998.

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Cromatogramas obtidos por HS GC FID do etanol em meio mineral ou da gasolina comercial em meio mineral.

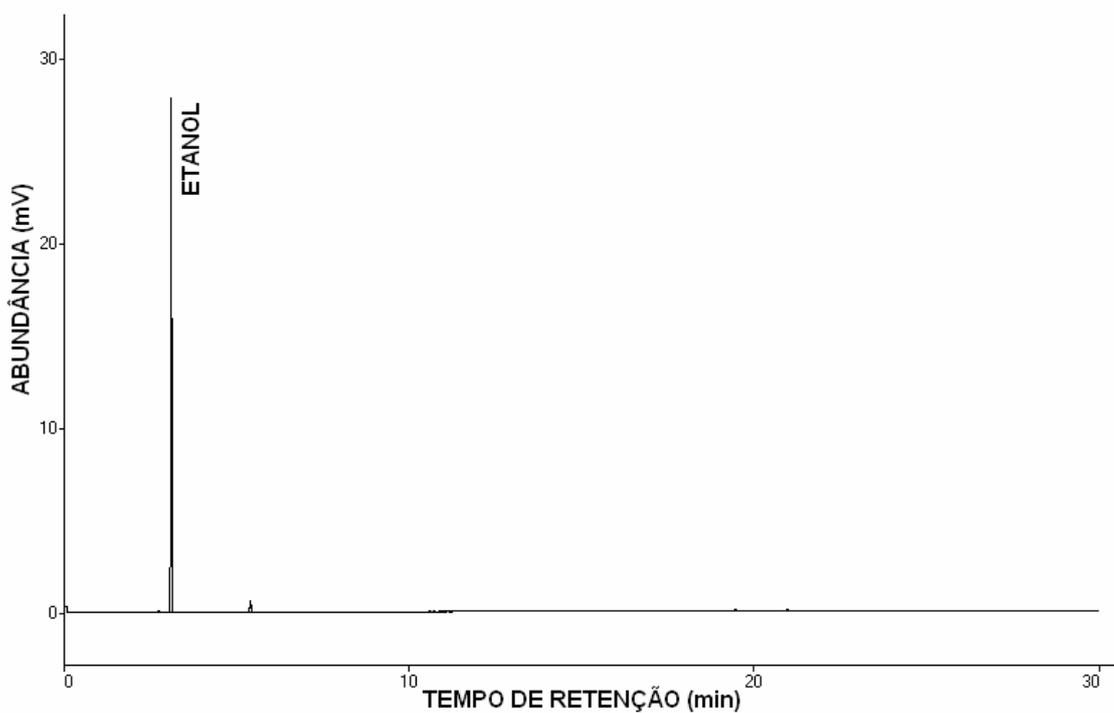


FIGURA 5. Cromatograma padrão do etanol em meio mineral obtido por HS GC FID.

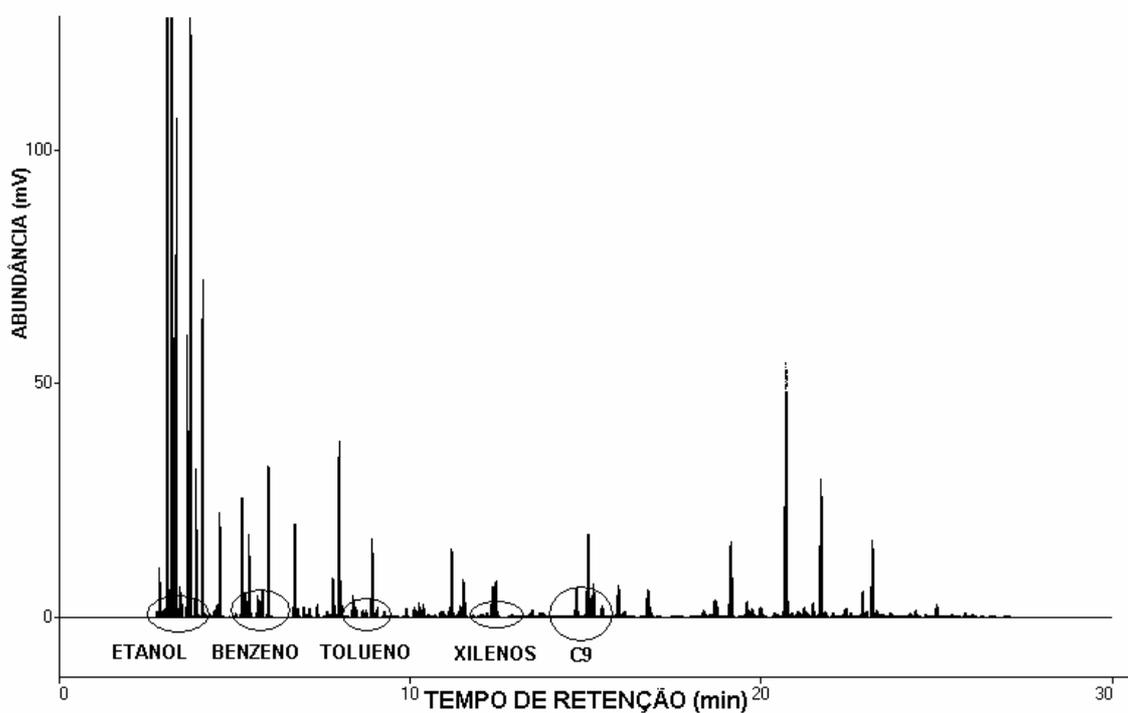


FIGURA 6. Cromatograma padrão da gasolina comercial em meio mineral obtido por HS GC FID, indicando a faixa de tempo de retenção do etanol, benzeno, tolueno, isômeros do xileno e isômeros do C9.

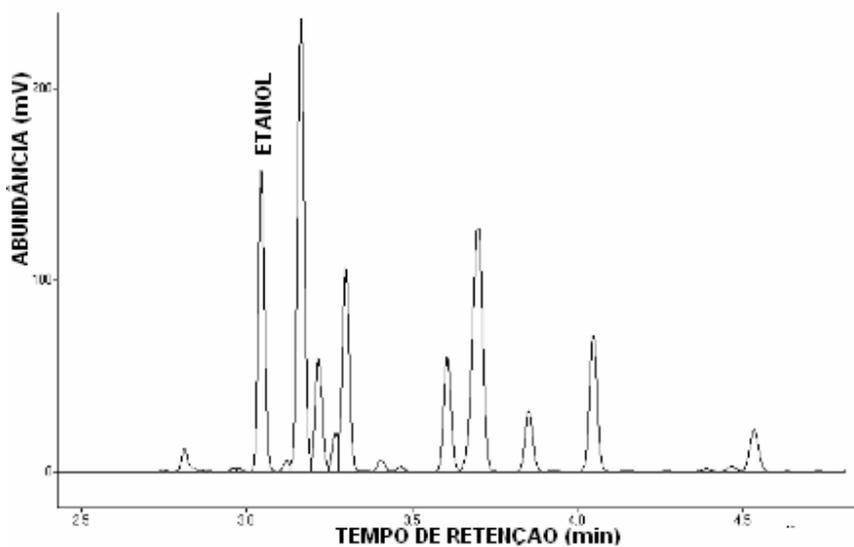


FIGURA 7. Cromatograma padrão da gasolina comercial em meio mineral obtido por HS GC FID com expansão em torno do tempo de retenção do etanol.

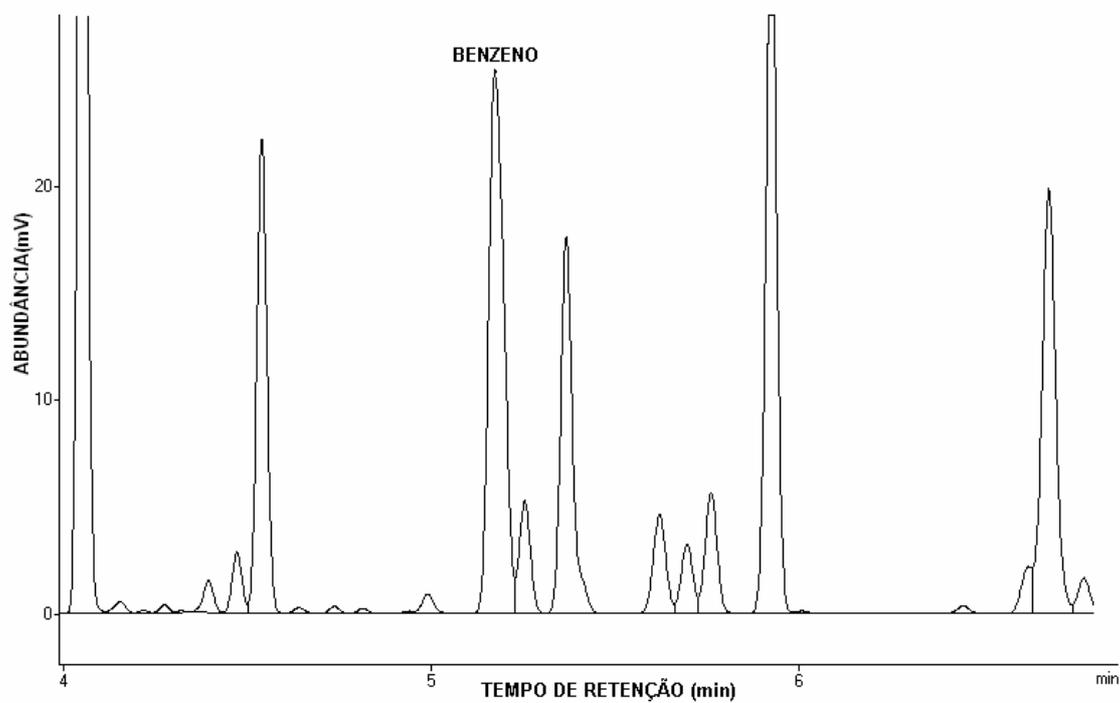


FIGURA 8. Cromatograma padrão da gasolina comercial em meio mineral obtido por HS GC FID com expansão em torno do tempo de retenção do benzeno.

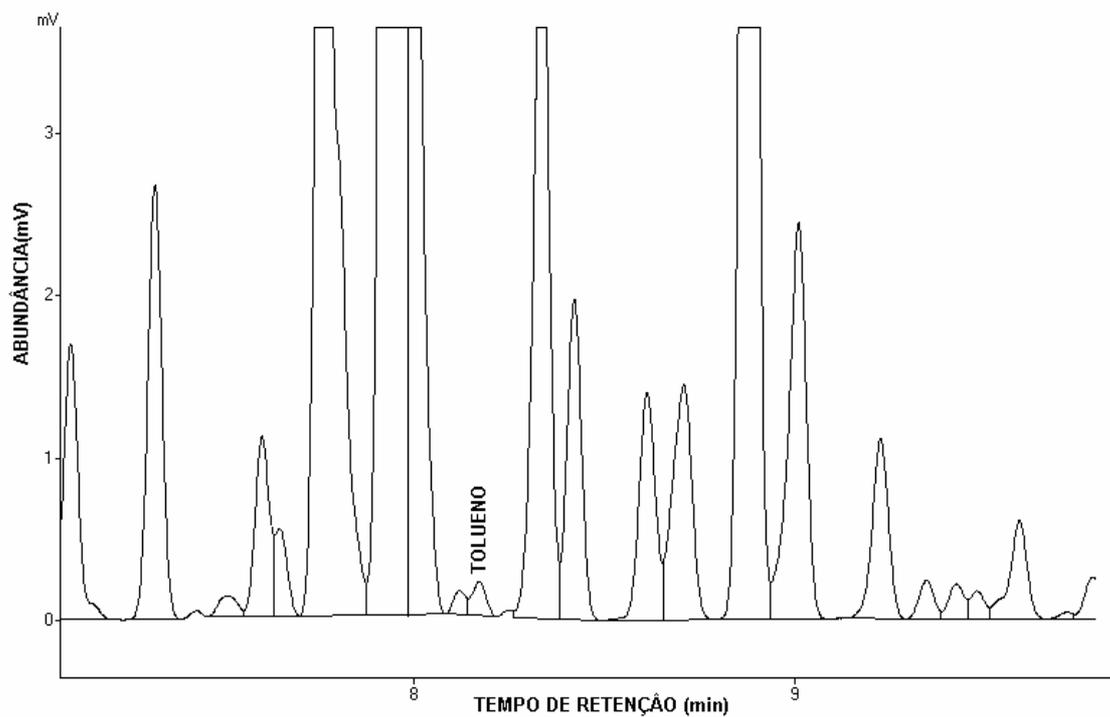


FIGURA 9. Cromatograma padrão da gasolina comercial em meio mineral obtido por HS GC FID com expansão em torno do tempo de retenção do tolueno.

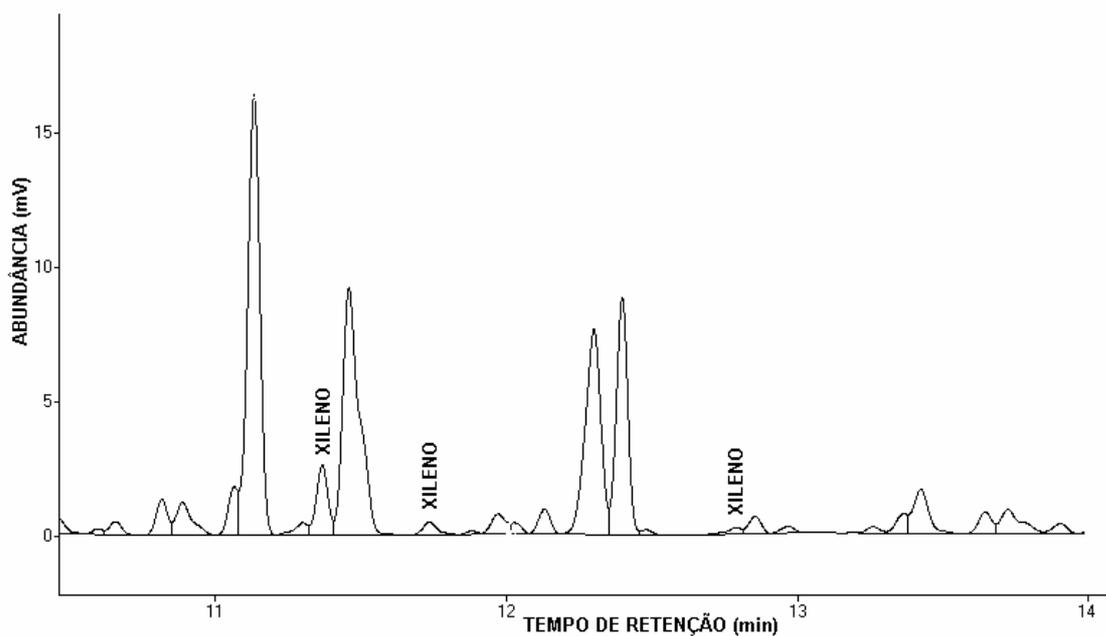


FIGURA 10. Cromatograma padrão da gasolina comercial em meio mineral obtido por HS GC FID com expansão em torno do tempo de retenção dos isômeros do xileno.

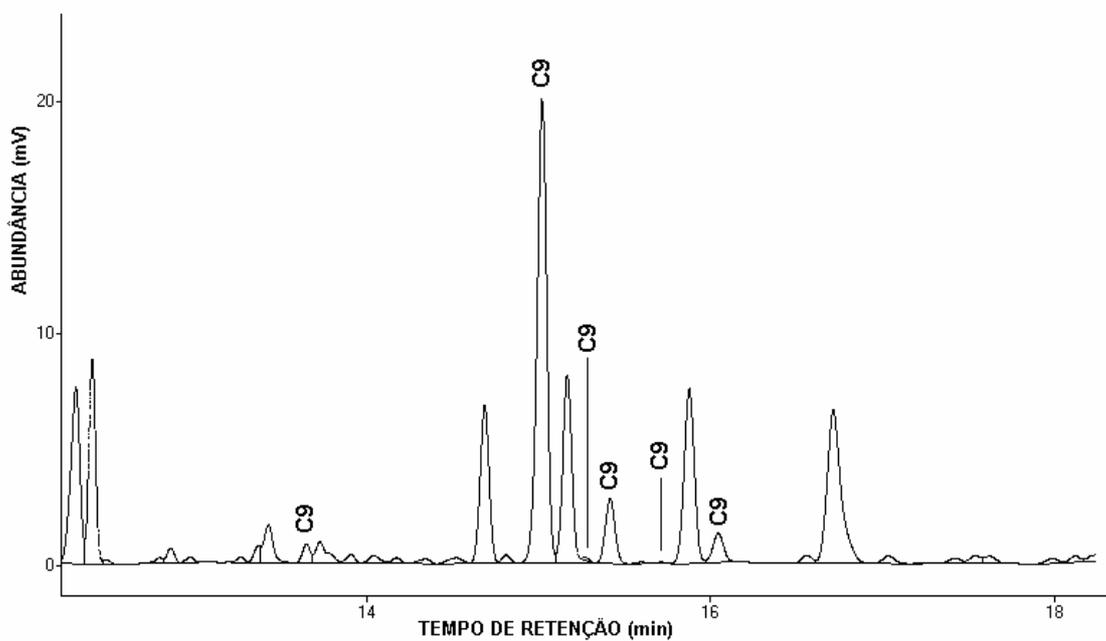


FIGURA 11. Cromatograma padrão da gasolina comercial em meio mineral obtido por HS GC FID com expansão em torno do tempo de retenção dos isômeros do C9.

Apêndice 2. Meios minerais utilizados e Agar nutritivo utilizado

Meio mineral 1 (Richard & Vogel, 1999)

Solução de macronutrientes			
Reagentes	g L ⁻¹	Substituto	g L ⁻¹
KCL	0,7		
KH ₂ PO	2,0		
Na ₂ HPO ₄	3,0	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2,9
NH ₄ NO ₃	1,0		
Solução de micronutrientes (1000X)			
MgSO ₄	4,0	MgSO ₄ .7H ₂ O	8,2
FeSO ₄	0,2	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,36
MnCl ₂	0,2	MnCl ₂ .7H ₂ O	0,31
CaCl ₂	0,2	CaCL ₂ 7H ₂ O	0,26

Meio mineral BH (Bushnell-Haas, 1941).

Reagente	g L ⁻¹
MgSO ₄	0,2
CaCl ₂	0,02
KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	1,0
FeCl ₃	0,05

Meio ágar nutritivo

Reagente	g L ⁻¹
Extrato de carne	3,0
Peptona bacteriológica	5,0
agar	15

Caldo nutritivo

Reagente	g L ⁻¹
Extrato de carne	3,0
Peptona bacteriológica	5,0

Apêndice 3. Meio azul de metileno

Meio azul de metileno (Siegmund & Wagner, 1991)

Reagente	g L ⁻¹
Peptona bacteriológica	10,0
Lactose	10,0
Fosfato dipotássico	2,0
Azul de metileno	0,065
Agar	15,0

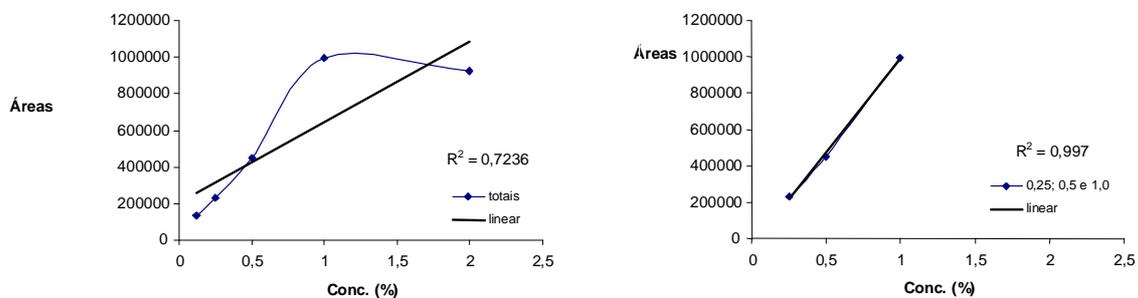
Apêndice 4. Curva de linearidade da gasolina comercial.

FIGURA 12. Curva de linearidade com soluções de meio mineral e gasolina comercial na faixa de concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2 % (v/v). Concentração padrão da gasolina comercial no tempo de retenção dos C9.

8. VITA

Aline Schneider Teixeira, filha de Diamarante Ferreira Teixeira e Glaci Schneider Teixeira, nascida em 23 de abril de 1978 em Porto Alegre-RS.

Estudou no colégio Anchieta, onde completou o primeiro e segundo graus. Em 1999 ingressou na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, onde foi graduada Licenciada em Ciências Biológicas em agosto de 2004. No ano seguinte iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.