

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO.
PROCESSOS TECNOLÓGICOS E AMBIENTAIS**

Paulo Sergio Salmazo

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO E ÁGUA CONTAMINADOS POR SOLVENTES
AROMÁTICOS PROVENIENTES DE COMBUSTÍVEIS**

**Sorocaba/SP
2019**

Paulo Sergio Salmazo

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO E ÁGUA CONTAMINADOS POR SOLVENTES
AROMÁTICOS PROVENIENTES DE COMBUSTÍVEIS**

Dissertação apresentada à Banca
Examinadora do Programa de Pós-
Graduação em Processos Tecnológicos e
Ambientais da Universidade de Sorocaba,
como exigência parcial para obtenção do
título de Mestre em Processos
Tecnológicos e Ambientais

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Angela
Faustino Jozala

**Sorocaba/SP
2019**

Ficha Catalográfica

S168b Salmazo, Paulo Sergio
Biorremediação de solo e água contaminados por solventes
aromáticos provenientes de combustíveis / Paulo Sergio Salmazo. –
2019.
69 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Faustino Jozala
Dissertação (Mestrado em Processos Tecnológicos e Ambientais)
– Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2019.

1. Biorremediação. 2. Biodegradação. 3. Hidrocarbonetos. 4.
Compostos aromáticos. 5. Solos – Poluição. 6. Água – Poluição. I.
Jozala, Angela Faustino, orient. II. Universidade de Sorocaba. III.
Título.

Paulo Sérgio Salmazo

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO E ÁGUA CONTAMINADOS POR SOLVENTES
AROMÁTICOS PROVENIENTE DE COMBUSTÍVEIS**

BANCA EXAMINADORA:


Prof.(a) Dr.(a) Angela Faustino Jozala
Universidade de Sorocaba


Prof.(a) Dr.(a) Daniel Bertoli Gonçalves
Universidade de Sorocaba


Prof.(a) Dr.(a) Nobel Penteado de Freitas
Universidade de Sorocaba

À Deus, pois sem Ele eu não teria forças para essa longa jornada. Agradeço aos meus professores e a minha família que me ajudaram durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

À Universidade de Sorocaba - UNISO, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela a cendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

À Professora Doutora Angela Faustino Jozala pela orientação e suporte a todo tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

À minha esposa e filhos, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu irmão Péricles que sempre me incentivou a buscar essa formação.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

E não podia faltar o agradecimento ao meu pai Aparecido e minha mãe Albina.

"Pergunte, porém, aos animais, e eles o ensinarão, ou às aves do céu, e elas lhe contarão; fale com a terra, e ela o instruirá, deixe que os peixes do mar o informem. Quem de todos eles ignora que a mão do Senhor fez isso? Em sua mão está a vida de cada criatura e o fôlego de toda a humanidade".

Jó 12:7-10

RESUMO

Os compostos aromáticos são muito utilizados nas indústrias químicas e petroquímicas, sendo os mais aplicados: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX). Esses compostos contaminantes trazem sérios prejuízos à saúde, podendo afetar o sistema nervoso central, além de serem carcinogênicos. Segundo levantamento da CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo em 2018, o estado de São Paulo possuía 6.110 áreas cadastradas (contaminadas e reabilitadas), contendo 14.592 contaminantes, sendo 4.176 solventes aromáticos (BTEX) e 4.593 combustíveis automotivos (contendo BTEX). Neste mesmo levantamento, a cidade de Sorocaba, possuía 52 áreas contaminadas contendo 119 contaminantes; sendo que 31 deles referem-se aos BTEX. A biorremediação vem sendo aplicada como alternativa sustentável para o tratamento de áreas contaminadas por petróleo e seus derivados, possibilitando menor custo. Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi a utilização de componentes de origem microbiana aplicados na descontaminação das áreas contaminadas por BTEX. Para tanto, foi desenvolvido em laboratório o cultivo padrão da bactéria *Bacillus subtilis* em meio de cultura *Tryptone Soy Broth* (TSB). O cultivo foi conduzido em agitador a 150 rpm/ 25 °C/ 24, 48, 72 e 96 horas/ pH 7. O sobrenadante obtido foi separado e submetido à análise de produção do biosurfactante. A biorremediação foi analisada com contaminação controlada utilizando gasolina e óleo diesel, tanto em água quanto em solo. A capacidade de produção do biosurfactante e biorremediação foi observada através de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e de Cromatografia gasosa. Os resultados mostraram a capacidade emulsificante do biosurfactante produzido, confirmando a aptidão da bactéria em produzir o biosurfactante. Com relação à degradação da gasolina e do óleo diesel, em meio líquido, e concomitante à produção do biosurfactante, foi verificada a capacidade do microrganismo degradar os compostos e produzir o biosurfactante. As análises em solo mostram que o microrganismo é capaz de degradar os BTEX. A biorremediação, utilizando microrganismos, pode ser uma alternativa eficiente, econômica e versátil para a remoção dos BTEX e ainda para obter subprodutos para controlar ou degradar esses poluentes e restabelecer o equilíbrio ecológico.

Palavras-chave: Biorremediação. Biodegradação. Solventes aromáticos. Hidrocarbonetos de petróleo – BTEX. Tratamento de áreas contaminadas.

ABSTRACT

Aromatic compounds are widely used in the chemical and petrochemical industries, the most applied being benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (known as BTEX). These contaminants compounds bring serious harm to health, which can affect the central nervous system, besides being carcinogenic. According to a CETESB - Environmental Company of São Paulo State survey, in 2018, the state of São Paulo had 6.110 registered areas (contaminated and rehabilitated), containing 14.592 contaminants, 4.176 of which are aromatic solvents (BTEX) and 4.593 automotive fuels (containing BTEX). In this same survey, the city of Sorocaba had 52 contaminated areas containing 119 contaminants; 31 of which refer to BTEX. Bioremediation has been applied as a sustainable alternative for the treatment of areas contaminated by petroleum and its derivatives, making possible a lower cost. For this reason, the objective of this work was the use of components of microbial origin applied in the decontamination of the areas contaminated by BTEX. Therefore, the standard culture of the bacterium *Bacillus subtilis* was grown in Tryptone Soy Broth (TSB) culture medium in laboratory. The culture was conducted on a shaker at 150 rpm / 25 °C / 24 hours, 48, 72 and 96 hours / pH 7. The obtained supernatant was separated and submitted to the analysis of biosurfactant production. The bioremediation was analyzed with controlled contamination using gasoline and diesel oil in both water and soil. The biosurfactant production and bioremediation capacity was observed through Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Gas Chromatography. The results showed the emulsifying capacity of the biosurfactant produced, confirming the ability of the bacteria to produce the biosurfactant. Regarding the gasoline and diesel oil degradation in liquid medium, and the concomitant production of the biosurfactant, was observed the ability of the microorganism to degrade the compounds and produce biosurfactant. Soil analysis shows that the microorganism is able to degrading BTEX. Bioremediation, using microorganisms, can be an efficient, economical and versatile alternative for the BTEX removal, in addition to obtain byproducts to control or degrade these pollutants and restore the ecological balance

Keywords: Bioremediation. Biodegradation. Aromatic solvents. Petroleum hydrocarbons - BTEX. Treatment of contaminated areas.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo
BRPS	Barreiras Reativas Permeáveis
BS	Biossurfactante
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CH₂	Metileno
CH₃	Metil
CHCs	Hidrocarbonetos clorados
CO₂	Gás carbônico ou dióxido de carbono
DCE	Dicloroetano
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
HCL	Ácido Clorídrico
IE	Índice Emulsificante
NRC	National Research Council
PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PCE	Tetracloroetano
POA	Processos oxidativos avançados
SVE	Extração de Vapor do Solo
TCE	Tricloroetano
TSB	Tryptone Soy Brith
USA	Estados Unidos da América

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Áreas Cadastradas Constatações de técnicas de remediação implantadas – dez. 2018.....	15
Figura 2. Somatória do número de contaminantes.....	16
Figura 3. Ocorrência dos contaminantes no Estado de São Paulo.....	17
Figura 4. Atividades econômicas mais geradoras de contaminações.....	18
Figura 5. Representação da estrutura dos BTEX.....	22
Figura 6. Esquema de barreiras reativas permeáveis.....	25
Figura 7. Evolução da redução dos custos nos processos de remediação.....	26
Figura 8. Etapas para definição e implementação de um processo de remediação.....	31
Figura 9. Estrutura molecular padrão da Surfactina.....	33
Figura 10. Primeira etapa para a realização dos ensaios.....	37
Figura 11. Segunda etapa para a realização dos ensaios.....	39
Figura 12. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	40
Figura 13. Tratamento em meio líquido.....	41
Figura 14. Tratamento em solo.....	43
Figura 15. Índice de emulsificação com biossurfactante pré-purificado. A – Instantes após passar no vórtex. B – Um minuto após passar no vortex.....	45
Figura 16. Espectros de transmitância de FTIR da pré-purificação.....	46
Figura 17. Espectros de transmitância de FTIR do tratamento de óleo diesel em água.....	47
Figura 18. Espectros de transmitância de FTIR do tratamento de gasolina em água.....	50
Figura 19. Espectros de transmitância de FTIR do tratamento realizado do óleo diesel em solo.....	51
Figura 20. Análise da presença de benzeno e etilbenzeno das amostras de solo contendo gasolina na presença ou não de <i>Bacillus subtilis</i> em diferentes dias através de Cromatografia Gasosa.....	52

Figura 21. Análise da presença tolueno das amostras de solo contendo gasolina na presença ou não de <i>Bacillus subtilis</i> em diferentes dias através de Cromatografia Gasosa.....	53
Figura 22. Análise da presença xilenos das amostras de solo contendo gasolina na presença ou não de <i>Bacillus subtilis</i> em diferentes dias através de Cromatografia Gasosa.....	53
Figura 23. Análise da presença BTEX das amostras de água contendo gasolina na presença ou não de <i>Bacillus subtilis</i> em diferentes dias através de Cromatografia Gasosa.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos.....	35
Tabela 2. Análise do Índice de Emulsificação com gasolina e óleo diesel.	44
Tabela 3. Análise da biodegradação da gasolina em solo.....	55
Tabela 4. Aplicações das técnicas de biorremediação para remoção de hidrocarbonetos no solo em condições de campo.....	56
Tabela 5. Comparação dos valores obtidos, com os valores orientadores da CETESB.....	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo, 2016.	57
--	-----------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Solventes aromáticos	20
3.2 Contaminação por hidrocarbonetos aromáticos	22
3.3 Áreas contaminadas por BTEX	22
3.4 Técnicas de remediação	23
3.4.1 Biorremediação (<i>in situ</i> e <i>ex situ</i>)	26
3.5 Biossurfactantes	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Lavagem de vidrarias	36
4.2 Cultivo do microrganismo	36
4.3 Dosagem da atividade Emulsificante do Biossurfactante	37
4.3.1 Índice emulsificante com sobrenadante de cultivo.....	37
4.4 Extração dos biossurfactantes (BS) – extração ácida	38
4.5 Extração líquido-líquido.....	38
4.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ..	39
4.7 Ensaio de avaliação da capacidade de biorremediação do microrganismo e produção do biossurfactante	40
4.7.1 Tratamento de óleo diesel em meio líquido.....	40
4.7.2 Tratamento de gasolina em meio Líquido.....	41
4.7.3 Tratamento de óleo diesel em solo.....	42
4.7.4 Tratamento de gasolina em solo.....	42

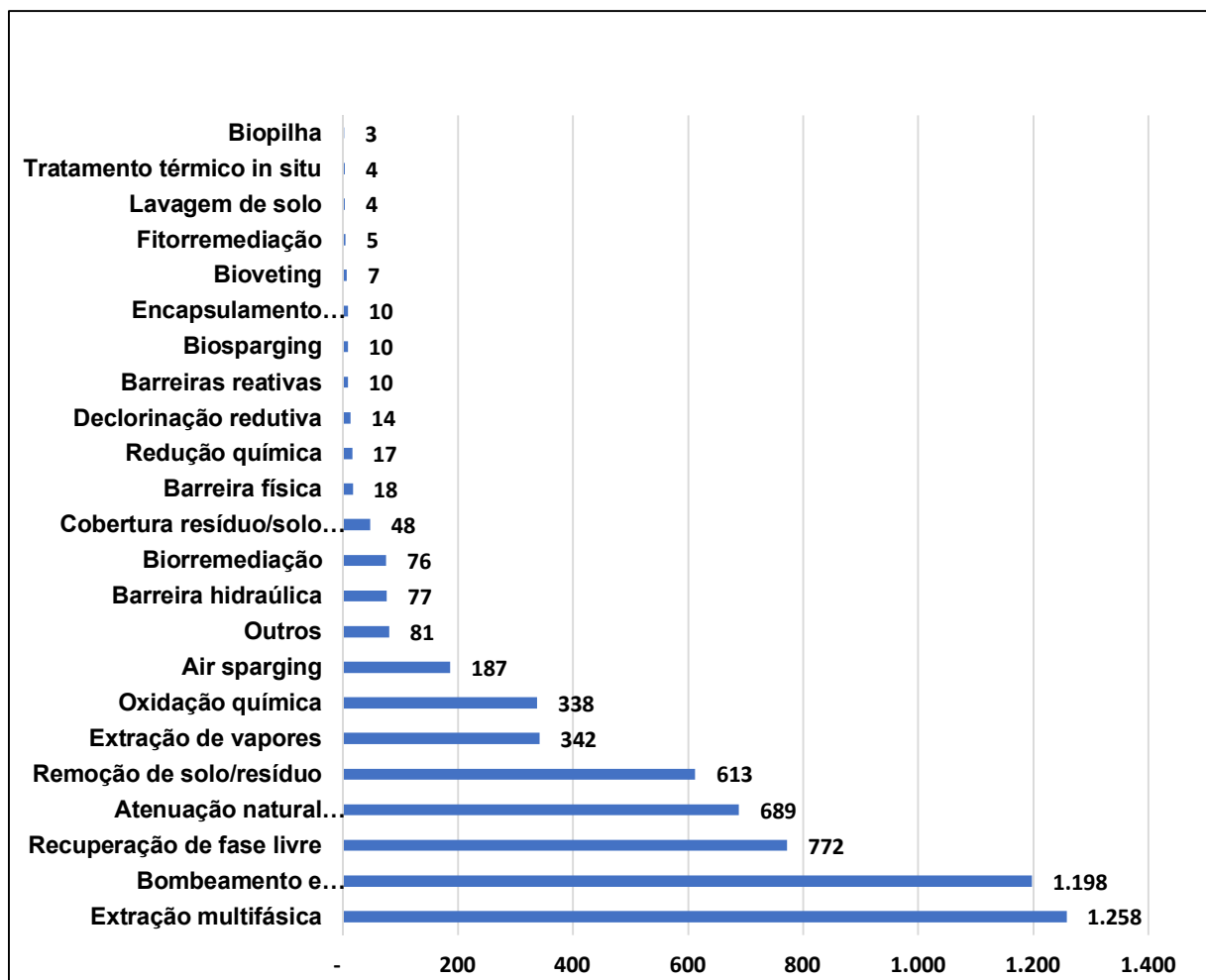
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Índice emulsificante	44
5.1.1 Índice emulsificante com biossurfactante pré-purificado	44
5.2 Análise da produção do biossurfactante através do método FTIR.....	45
5.2.1 Capacidade de Biorremediação e Produção de biossurfactante.....	47
5.3 Análise da Biorremediação da Gasolina por Cromatografia Gasosa	51
5.3.1 Gasolina em Solo	51
5.3.2 Gasolina em água.....	54
5.3.3 Análise da biodegradação da gasolina em solo e comparação com valores orientadores da CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.....	55
6 CONCLUSÃO	58
7 REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

O objetivo deste trabalho foi realizar ensaios laboratoriais utilizando componentes de origem microbiana para verificação da degradação ou não de poluentes provenientes de contaminações controladas de solo e água por diesel e gasolina.

De acordo com CETESB (2018a), a biorremediação ainda não está entre as técnicas de remediação de áreas contaminadas mais utilizadas no estado de São Paulo, mesmo tendo eficiência comprovada, conforme dados da Figura 1.

Figura 1. Áreas Cadastradas Constatações de técnicas de remediação implantadas – dez. 2018.



Fonte: adaptado de CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2018).

Com o aumento rápido e significativo da população mundial, alcançado na última década, tem sido acompanhado por um aumento no consumo de petróleo. A produção mundial diária de petróleo atingiu mais de 96 milhões de barris em 2016. O

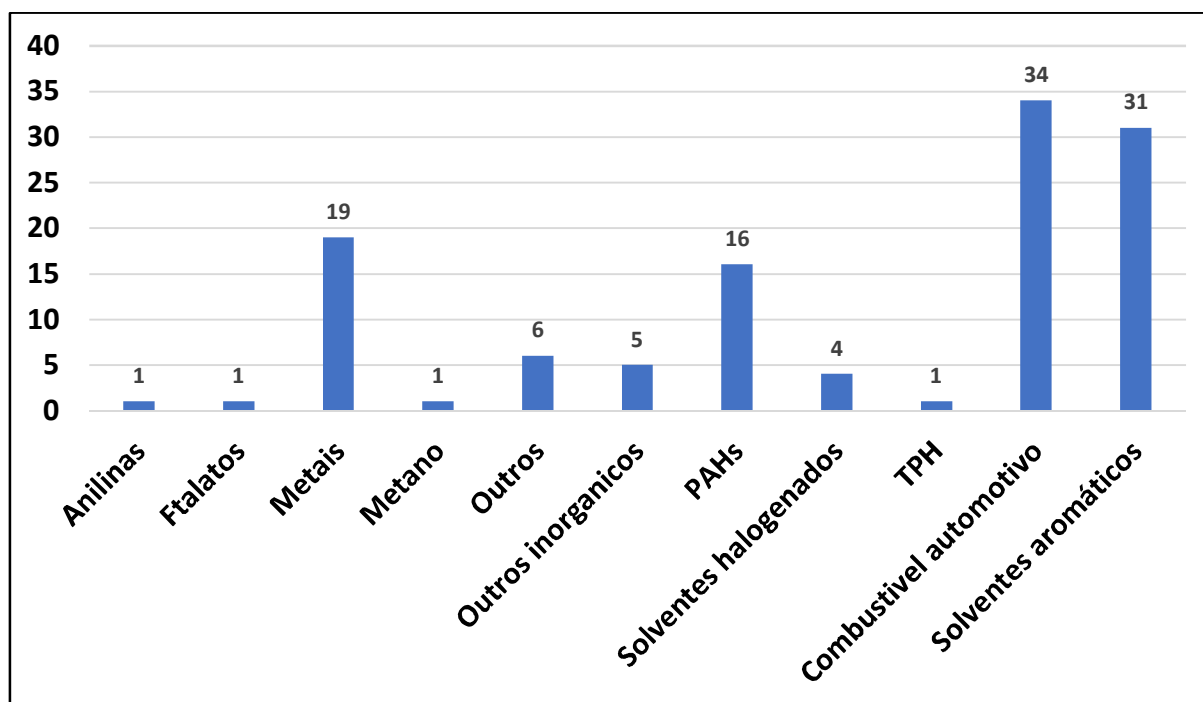
uso desenfreado desse produto e a falta de preocupação com o meio ambiente têm sido mais frequentemente associados à existência de diversas áreas contaminadas (CROZERA, 2001; VARJANI; UPASANI, 2017; IEA, 2018; XIE et al., 2018).

O vazamento de combustíveis, principalmente em postos de abastecimento de veículos automotores, tem causado contaminações no solo e águas subterrâneas de nossas cidades especialmente pelos hidrocarbonetos de petróleo conhecidos como BTEX. (ANDRADE, 2010; VARJANI; UPASANI, 2017).

Os BTEX quando em contato com as águas subterrâneas, as tornam impróprias ao consumo humano. A exposição a altas concentrações ou tempo prolongado pode afetar o sistema nervoso central e também são cancerígenos (RANGEL, 2014).

No Brasil, nas últimas duas décadas, o registro de contaminação de solo por derramamentos de petróleo e seus derivados, vem atraindo o olhar de pesquisadores para o desenvolvimento de estudos e pesquisas em biorremediação. (ANDRADE, 2010; VARJANI; UPASANI, 2017). Segundo a CETESB (2018b), no estado de São Paulo há 6.110 áreas contaminadas conhecidas (algumas delas já reabilitadas) e na cidade de Sorocaba há 52 áreas (Figura 2).

Figura 2. Somatória do número de contaminantes.

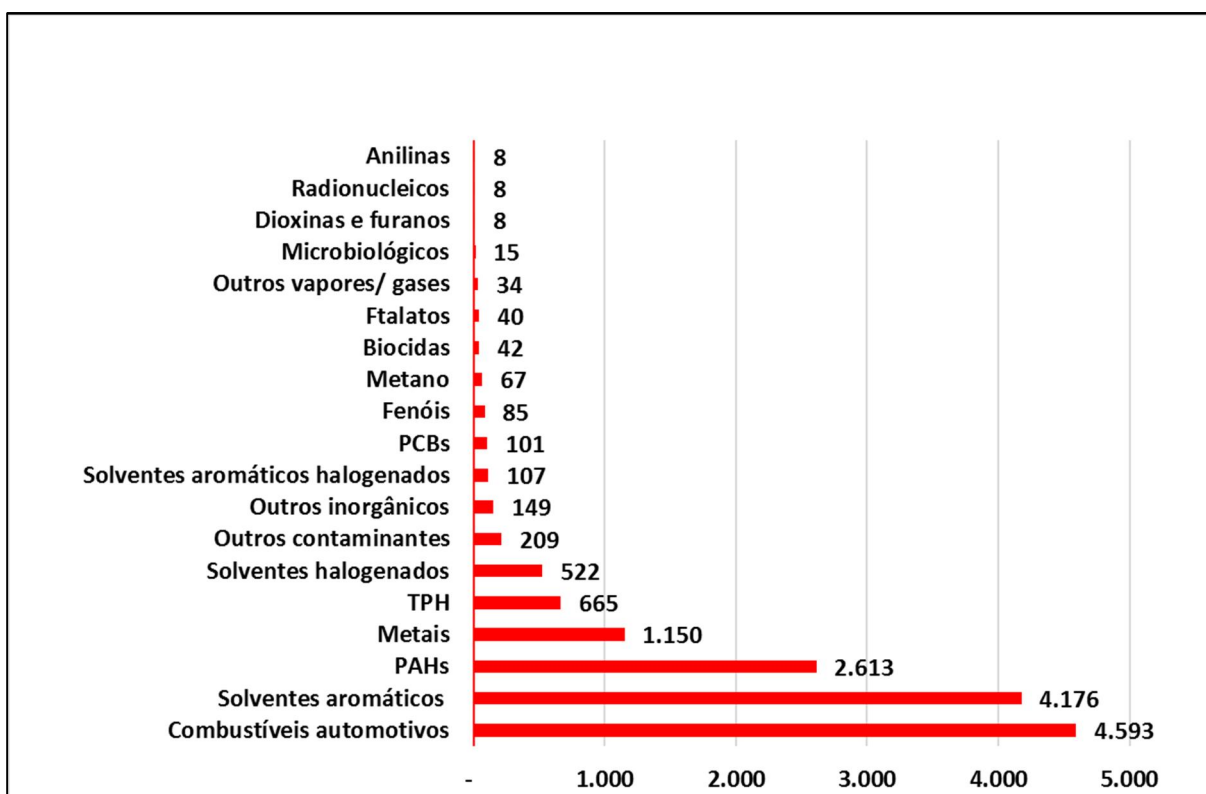


52 áreas contaminadas; 119 contaminantes; 31 (+34) BTEX
Elaboração Própria. Fonte: CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2018).

Diversas técnicas físicas, químicas e biológicas vêm sendo aplicadas para a remoção ou a degradação *in-situ* ou *ex-situ* de áreas contaminadas por derramamento de petróleo. A biorremediação vem sendo aplicada como alternativa sustentável para o tratamento de áreas contaminadas por petróleo e seus derivados, possibilitando menor custo (ANDRADE, 2010).

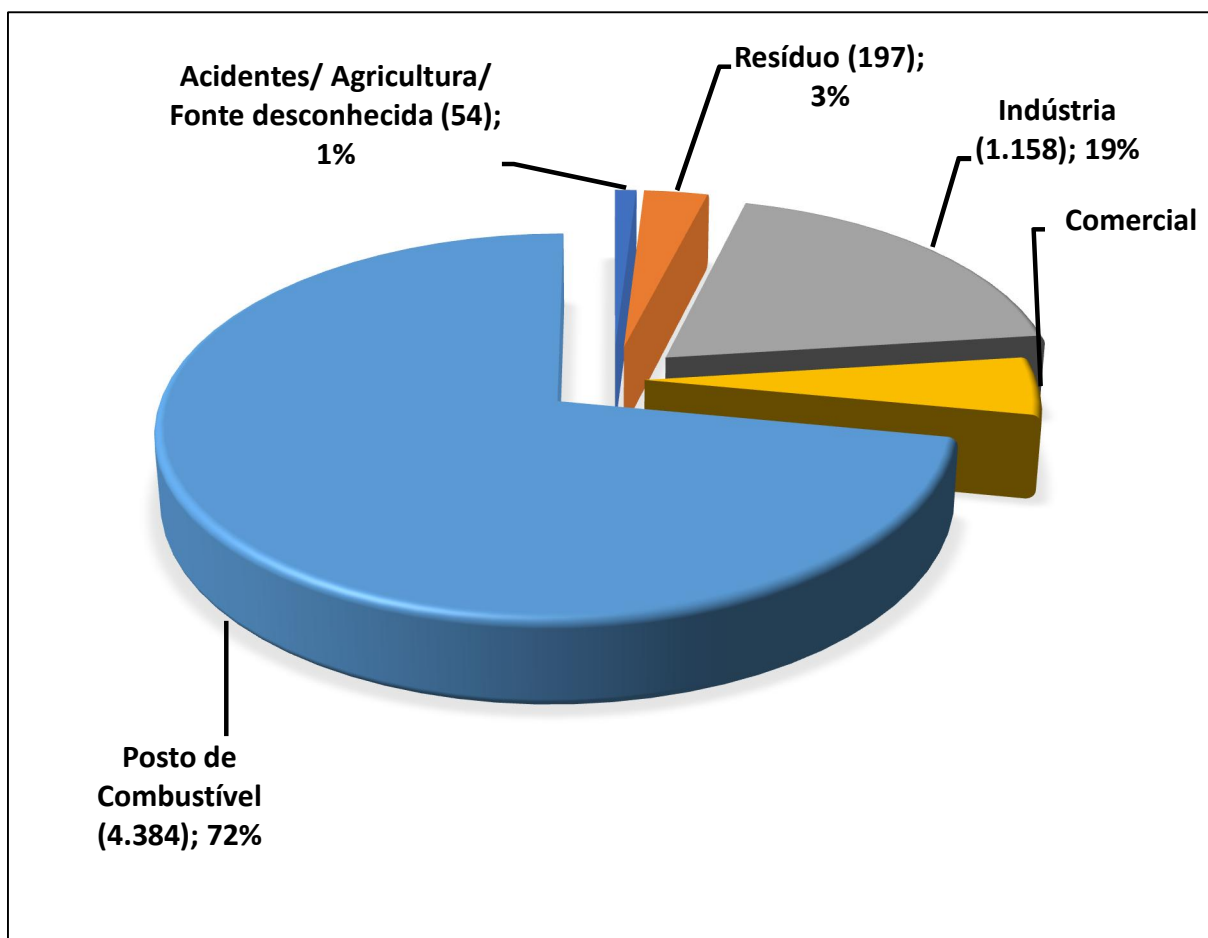
Foi realizado um levantamento bibliográfico bem como uma pesquisa documental junto a CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, onde pode-se verificar que dentre as 6.110 áreas contaminadas, na sua grande maioria foram contaminadas com solventes aromáticos (BETX), e a atividade econômica que mais gerou contaminações são os postos de combustível automotivo, conforme podemos verificar nas Figuras 3 e 4.

Figura 3. Ocorrência dos contaminantes no Estado de São Paulo.



Fonte: adaptado de CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2018).

Figura 4. Atividades econômicas mais geradoras de contaminações.



Fonte: adaptado de CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2018).

Neste trabalho as análises laboratoriais de produção do biossurfactante, biorremediação controlada e caracterização de amostras em biorremediação de diesel em solo e água e gasolina em água, foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Industrial e Processos Fermentativos, no Laboratório de Pesquisas Toxicológicas e no Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia, todos pertencentes a Universidade de Sorocaba - UNISO. As análises da capacidade de biorremediação em solo contendo gasolina, através do método de cromatografia gasosa, foram realizadas no laboratório terceirizado.

A seguir o leitor irá encontrar a dissertação organizada em objetivos, revisão bibliográfica, a descrição do material e métodos aplicados, os resultados e suas discussões e por fim, conclusão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de biorremediação do microrganismo *Bacillus subtilis*, através de ensaios laboratoriais dos solos e águas contaminados em testes controlados, por solventes aromáticos (BTEX), provenientes do óleo diesel e gasolina.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir o biossurfactante através do cultivo de *Bacillus subtilis* utilizando diesel e gasolina como substrato;
- Caracterizar a produção do biossurfactante através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR;
- Analisar a eficiência da biorremediação em solos e águas contaminados por BTEX utilizando a técnica de cromatografia gasosa;
- Verificar a biorremediação das amostras desenvolvidas no laboratório, em função do tempo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Solventes aromáticos

Os solventes aromáticos enquadram-se dentro da categoria de contaminantes derivados do petróleo.

“O petróleo é composto basicamente por três grupos de hidrocarbonetos: os parafínicos, os naftênicos e os aromáticos, e estes podem ser saturados ou insaturados” (PEDROZO et al., 2002 apud ROSA, 2006, p. 8).

Os hidrocarbonetos são constituídos por átomos de carbono e hidrogênio arranjados em vários tipos de configurações estruturais, basicamente divididos em dois grupos, os alifáticos e os aromáticos. Na classificação estrutural dos alifáticos existem quatro classes denominadas alcanos, alcenos, alcinos e cicloalcanos. Os aromáticos são divididos em monoaromáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (BAIRD, 2002 apud DONAIRE, 2007, p. 22).

Os solventes aromáticos podem ser classificados como substâncias químicas e também com uma mistura líquida de substâncias químicas com capacidade de dissolver outro material de utilização industrial. A palavra “solvente” se refere a um elemento de natureza orgânica. As composições químicas dos solventes são muito variadas, porém têm como propriedades comuns a lipossolubilidade (ser solúvel em gorduras), e também grande volatilidade, inflamáveis e produzem consideráveis efeitos tóxicos (RUPPENTHAL, 2013).

Ruppenthal (2013) relata que os solventes aromáticos são amplamente utilizados nas indústrias plásticas de borracha, química e petroquímica, sendo que os mais difundidos são o benzeno, o tolueno e o xileno, conhecidos também como BTEX.

Segundo Lima e colaboradores (2017), os compostos BTEX (Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), componentes da gasolina, estão entre os contaminantes mais comuns encontrados em áreas contaminadas. São amplamente usados como solventes industriais. A sua presença na subsuperfície é geralmente relacionada ao transporte, distribuição e uso de combustíveis e óleos, sendo

frequentemente encontrados em águas subterrâneas como resultado de vazamento de tanque de estocagem e encanamentos subterrâneos.

De acordo com a CETESB (2013), o benzeno (C_6H_6) é um composto volátil, incolor, com densidade de $0,87 \text{ g/cm}^3$ e inflamável, com ponto de ebulição $80,1^\circ\text{C}$. É formado em processos naturais e antropogênicos. E o benzeno se destaca como sendo o mais agressivo à saúde das pessoas, entre os BTEX. Na Figura 5, temos a representação das respectivas estruturas dos BTEX.

Ainda conforme a CETESB (2013):

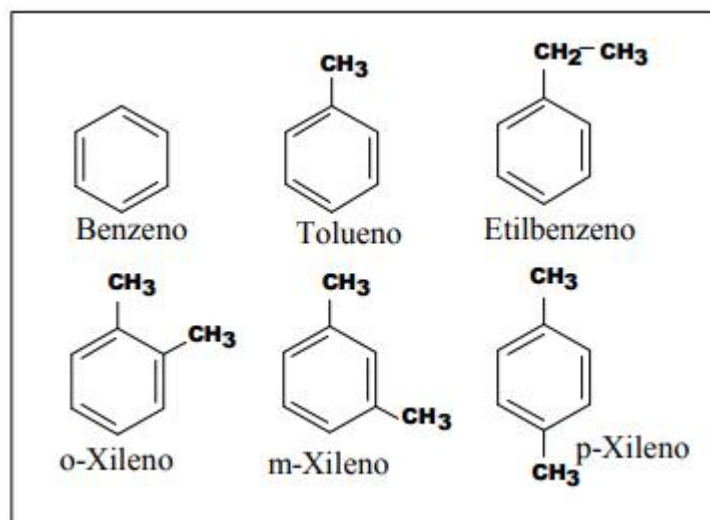
Fontes naturais de benzeno incluem emissões gasosas de vulcões e incêndios florestais que contribuem para a presença de benzeno no meio ambiente. O benzeno também pode ser emitido através de atividades industriais, pois é utilizado na manufatura de produtos químicos como detergentes, explosivos, tintas, pigmentos, etc.

Sobre o tolueno (C_7H_8), a CETESB (2013) o define como:

[...] um líquido volátil, incolor e inflamável, com densidade $0,86 \text{ g/cm}^3$ e ponto de ebulição 111°C . As principais fontes de emissão de tolueno para o ambiente são os combustíveis fósseis. O tolueno está presente na gasolina e também é utilizado na produção de benzeno, além de ser usado como solvente. Também pode ser emitido durante a produção, uso e descarte de produtos industrializados que contenham tolueno. As concentrações em ambientes internos podem ser elevadas em decorrência do uso de produtos domésticos como tintas, thinners, adesivos e esmalte de unha, além de fumaça de cigarro.

O xileno (C_8H_{10}) tem suas principais características como sendo um líquido incolor, inflamável, não sendo insolúvel em água e a apresenta um odor adocicado. É encontrado no petróleo e está presente em fragrâncias sintéticas e na fabricação de diversos produtos como: tintas, vernizes e borracha. Atingem a atmosfera quando provem de fontes poluentes industriais, através do escapamento dos carros e também liberados em incêndios florestais (CETESB, 2013).

Figura 5. Representação da estrutura dos BTEX.



Fonte: Mazzuco, 2004.

3.2 Contaminação por hidrocarbonetos aromáticos

De acordo com Nakhla et al. (2003 apud MAZZUCO, 2004, p. 20) os hidrocarbonetos aromáticos são altamente solúveis e possuem grande mobilidade em sistemas solo-água.

São várias as fontes de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo (BTEX), dentre elas, os tanques de armazenamento de combustíveis, transporte por caminhões tanque, terminais de transferência, oleodutos e também as refinarias. A contaminação do subsolo é basicamente proveniente dos vazamentos e acidentes envolvendo os BTEX, muitas das vezes de grandes proporções e até mesmo da disposição inadequada de rejeitos. Existem muitas áreas contaminadas por BTEX provenientes de tanques subterrâneos de armazenamento, com pequenas ou médias proporções. Já em refinarias e oleodutos são menos prováveis devido aos controles praticados, porém quando acontecem acidentes são de grandes proporções (N.R.C., 1997 apud LIMA, 2005, p. 33).

3.3 Áreas contaminadas por BTEX

De acordo com a CETESB (2018), áreas contaminadas são descritas como locais com concentrações de poluentes representados por quaisquer substâncias ou resíduos que venham a causar danos ou riscos aos bens a proteger, como a

qualidade das águas superficiais e subterrâneas, do solo e a saúde da população humana ou animal.

Na Relação de Áreas Contaminadas e Reabilitadas no estado de São Paulo publicada pela CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo em 2018, apresenta Sorocaba com 52 áreas contaminadas, (com mais de um contaminante em cada área), totalizando 119 contaminantes, sendo que 31 referem-se à contaminação por solventes aromáticos.

Os postos de combustíveis são uma das principais fontes de contaminação por solventes aromáticos, a partir da utilização de hidrocarbonetos.

Segundo a Agência Nacional de Petróleo (ANP), tem crescido no Brasil a instalação de postos revendedores de combustíveis automotivos. Em 2016 o número era de 41.829 postos instalados, dando ao país, nesse período, a quinta posição no ranking de maiores consumidores de petróleo do mundo (ANP, 2017).

Consequentemente, verifica-se também um aumento da quantidade de áreas contaminadas decorrentes dessa atividade.

Este aumento culminou na publicação da Resolução CONAMA nº 273/2000 (Brasil, 2000) que estabeleceu a obrigatoriedade da investigação de passivos ambientais para o licenciamento ambiental de postos de combustíveis e serviços. As diretrizes são descritas na Resolução CONAMA nº 420/2009 (Brasil, 2009), determinando critérios e valores orientadores de referência de qualidade, prevenção e investigação do solo e valores de investigação para águas subterrâneas.

3.4 Técnicas de remediação

A técnica conhecida como remediação, é um procedimento que implica em intervenção direta, para poder conter, isolar, remover ou reduzir as concentrações dos contaminantes presentes (GÜNTHER, 2006).

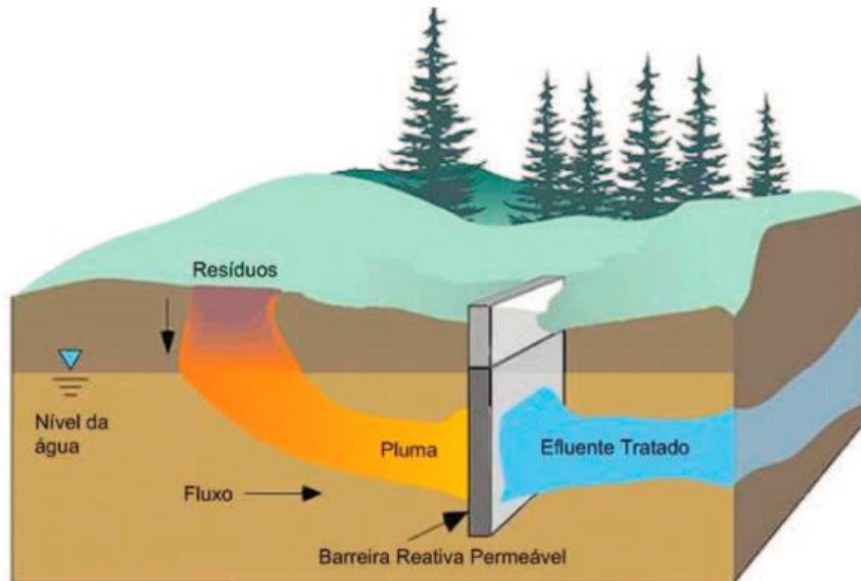
Diversas tecnologias para remediar áreas contaminadas por derivados de petróleo têm sido aplicadas. Dentre as que envolvem processos físicos e químicos podem ser citadas a lavagem de solo, extração de vapores, bombeamento e tratamento de águas subterrâneas, injeção de ar na zona saturada (*air sparging*), tratamento térmico, oxidação química, contenção e barreiras passivas e reativas. Também tem se destacado, devido ao menor custo e interferência mínima nas áreas contaminadas, as técnicas que removem o contaminante por meio de processos

biológicos. Nesta categoria destacam-se a atenuação natural, biorremediação e fitorremediação. Algumas das técnicas utilizadas com fins de descontaminação de sítios contaminados podem ser assim resumidas (TAVARES, 2013):

- PUMP AND TREAT – Trata-se de uma tecnologia de bombeamento e tratamento da água contaminada encontrada na zona saturada do solo. Para a extração da água subterrânea é necessário a construção de poço tubulares em quantidades que dependem da extensão da pluma de contaminação e o tratamento físico-químico da água pode ser realizado no próprio local ou transportada para uma estação de tratamento fora do local da contaminação (TAVARES, 2013).
- DESSORÇÃO TÉRMICA – Neste método há o aquecimento do solo para que seja possível a volatilização dos compostos orgânicos. Para que isso ocorra é utilizada a injeção de água ou vapor quente no solo propiciando a maior mobilidade possível dos contaminantes. Sua utilização é restrita para solos com a contaminação em pequenas profundidades. Esse método pode esterilizar o solo (TAVARES, 2013).
- EXTRAÇÃO DE VAPOR DO SOLO (SVE) – Consiste na remoção física dos contaminantes em especial os voláteis (onde se enquadra os BTEX) com a construção de poços de vapor, utilizando-se bombas à vácuo para a extração (TAVARES, 2013).
- AERAÇÃO *in-situ* (*Air Sparging*) – É utilizado para extrair compostos voláteis e semi-voláteis da zona saturada do solo. Também como na SVE é necessário a construção de poços, e esses são utilizados para poder executar a injeção de ar, com eficiência para os BTEX. Neste método existe a vantagem de que com o aumento da oxigenação do solo, haver biodegradação; porém pode-se “empurrar” a contaminação para locais que não estavam contaminados (TAVARES, 2013).
- BARREIRAS REATIVAS PERMEÁVEIS (BRPs) – trata-se de uma técnica que consiste na instalação de um material reativo no subsolo, transpondo a pluma

de contaminação (ver Figura 6), onde ocorre a retenção dos poluentes e permite a continuidade do fluxo de água subterrânea. Porém é um método a ser utilizado com exclusividade para a remediação das águas subterrâneas (lençol freático), e não remedia a porção solo da contaminação, sendo necessário outras técnicas para atuar em conjunto. Na América do Norte é uma técnica bastante difundida (TAVARES, 2013).

Figura 6. Esquema de barreiras reativas permeáveis.



Fonte: Adaptado da USEPA (1998 apud TAVARES, 2013, p. 74).

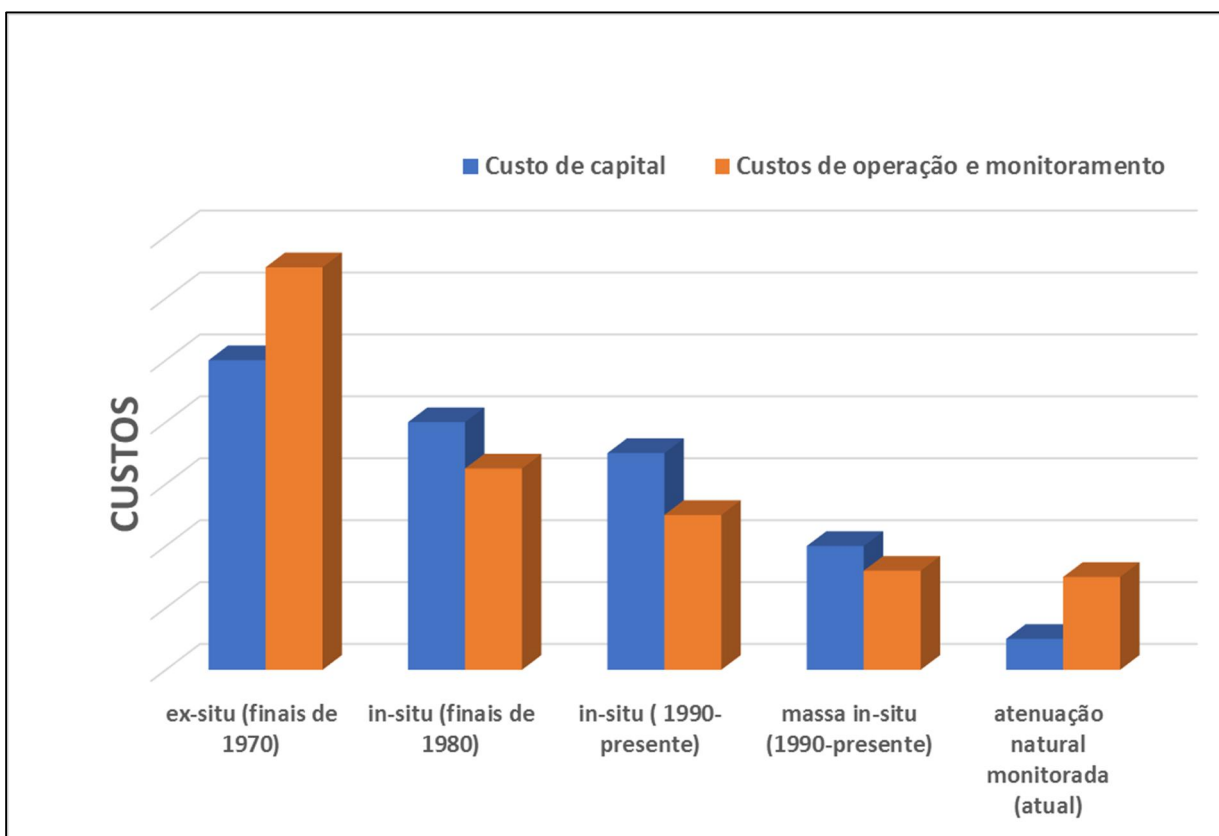
- LAVAGEM DO SOLO – através de poços construídos para esse método, ou quando esta técnica está consorciada com outras, aproveitando-se de poços já construídos; faz-se a injeção de fluidos no subsolo, sendo coletados em outros poços (TAVARES, 2013).
- PROCESSOS DE OXIDAÇÃO – Os Processos Oxidativos Avançados (POA) vêm de encontro a esta necessidade, devido à capacidade de converter poluentes em espécies químicas inócuas, tais como gás carbônico e água, levando à mineralização total do poluente (DONAIRE, 2007, p. 4).

Além das técnicas citadas, a evolução das tecnologias vem evoluindo no sentido de desenvolvimento e aplicação de técnicas mais naturais. Nesse sentido, técnicas de remediação que utilizam micro-organismos e plantas despontam como

técnicas viáveis economicamente e com reconhecimento comprovado (TAVARES, 2013).

Na Figura 7, pode-se observar os custos de remediação ao longo das últimas décadas.

Figura 7. Evolução da redução dos custos nos processos de remediação.



Fonte: adaptado de Revista Química e derivados (2003, vol. 7, nº 417 apud TEIXEIRA, 2013, p. 81).

No próximo tópico é apresentada a descrição e aplicação dessas técnicas consideradas naturais, dada a pertinência do tema e aplicação nesse trabalho.

3.4.1 Biorremediação (*in situ* e *ex situ*)

“Biorremediação é um processo de utilização de organismos vivos ou de seus sistemas enzimáticos para o tratamento do ambiente contaminado, com o objetivo de diminuir os níveis de contaminantes até à detoxificação total do ambiente pela mineralização dos compostos poluentes” (SILVA, 2007, p.8).

Quando da utilização de organismos vivos, entende-se a utilização de micro-organismos e plantas com capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes, transformando-os em substâncias inertes (SILVA, 2007, p.8).

Numerosas publicações demonstram a possibilidade do tratamento biológico para os mais diferentes tipos de contaminantes, entre os quais hidrocarbonetos, resíduos de petróleo, solventes clorados (DCE, TCE, PCE), com eficiências relatadas de até 95% de redução da concentração inicial do contaminante (Ground Water and soil Cleanup: improving management of Persistent Contaminants, 1999 apud LIMA, p. 64, 2005).

Segundo Tavares (2013), os microrganismos comumente usados na biorremediação são as bactérias e fungos que, normalmente, degradam as substâncias mais simples e menos tóxicas.

Tavares (2013), lembra que o maior projeto de biorremediação foi no derramamento de petróleo do navio Exxon Valdez, na América do Norte, mais especificamente no Alasca, onde foi-se utilizado fertilizantes para bioaumentar os microrganismos existentes naquele habitat.

“Entre as estratégias para biorremediação de hidrocarbonetos no ambiente, destacam-se a biorremediação passiva, a bioestimulação, a bioaumentação e o *landfarming*” (SANTOS, 2013, p. 11).

“A biodegradação de um composto químico no meio ambiente depende, sobretudo, da presença de uma população de microrganismos capaz de metabolizar a molécula original e seus produtos de degradação” (GAYLARD et al., 2005, p. 37).

Na biorremediação, os organismos utilizados podem ser nativos (de ocorrência natural) ou cultivados. Os organismos utilizados são bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Entre esses, as bactérias são mais comumente empregadas como elemento principal em trabalhos de biorremediação (TEIXIERA, 2007).

Silva (2007) afirma que o tratamento por meio da biorremediação pode ser feito de 2 formas: *in situ* (no local), ou *ex situ* (fora do local).

3.4.1.1 Biorremediação *in situ*

O tratamento *in situ*, na maioria das situações, é a opção mais desejada já que dispensa uso de recursos e custos referentes ao manuseio do material contaminado. (Pritchard et al., 1992 apud SILVA, 2007).

São várias técnicas de biorremediação *in situ*, tais como a biorremediação passiva, a bioestimulação, a bioaugmentação, e a fitorremediação (JACQUES et al., 2007).

A escolha dessas técnicas dependerá do tipo e quantidade do poluente, seu grau de saturação no solo, suas propriedades físico químicas, umidade, aeração e temperatura ambiente, considerando também as características geológicas, geofísicas e hidrológicas do sítio contaminado (SILVA, 2007); bem com o domínio do conhecimento dos princípios e das aplicações dessas técnicas (JACQUES et al., 2007).

A princípio, as avaliações biológicas devem ser realizadas em laboratório com o objetivo de otimizar a biodegradação do composto. “Elas compreendem os testes de bioestimulação, pela adição de nutrientes e/ ou surfactantes, e os testes de bioaugmentação, pela adição de culturas de microrganismos biodegradadores ou mediadores” (GAYLARD, 2005, p. 39).

A fitorremediação também é uma técnica *in situ* e é definida como o uso de vegetais superiores para facilitar a aeração do local, degradar, reter ou eliminar os contaminantes do solo. Neste processo pode atuar o vegetal e/ou microrganismos (TAVARES, 2013).

Os vegetais são muito eficazes em se adaptarem a diversos tipos de ambientes que poucos lugares são completamente desprovidos de sua presença. Algumas espécies, inclusive, têm a capacidade de interagir simbioticamente com outros organismos, possibilitando que se adaptem em solos salinos, ácidos, pobres e ricos em nutrientes ou excessivamente contaminado em elementos químicos como metais pesados. Por isso, contribui também na melhoria das características físicas, químicas e biológicas das áreas contaminadas (TAVARES, 2013).

O uso desta tecnologia tem se expandido por sua grande viabilidade técnica e/ou econômica, em países desenvolvidos como Estados Unidos, Canadá e Alemanha (TAVARES, 2013).

De acordo com Boszszowski (2003 apud TAVARES, 2013, p. 88), até o ano de 2000, eram conhecidas 400 espécies de plantas acumuladoras pertencentes a 45 famílias diferentes, destacando-se as famílias Brassicaceae (*Brassica juncea* – mostarda-da-índia, *Brassica napus* – canola), Asteraceae (*Helianthus annuus* – girassol), Euphorbiaceae e Leguminosaeae (*Medicago sativa* – alfafa).

No processo de fitorremediação, há cinco tipos principais de mecanismos pelo qual é realizado a remediação dos poluentes. Segundo Pilon-Smits (2005 apud Jacques et al., 2007, p. 1198), esses tipos principais são descritos como:

- a) rizofiltração, que é uma técnica de tratamento de água em que os contaminantes são removidos e retidos no tecido vegetal; b) fitoextração, em que os contaminantes são removidos do solo e retidos no tecido vegetal; c) fitotransformação, uma técnica que pode ser aplicada ao tratamento da água e do solo, na qual ocorre a degradação dos contaminantes através do metabolismo da planta; d) fitoestimulação, em que ocorre a estimulação da atividade dos microrganismos degradadores dos contaminantes pela rizosfera da planta; e e) fitoestabilização, quando as plantas são utilizadas para reduzir a migração dos contaminantes no solo.

Associado às técnicas de biorremediação já citadas, podem ser aplicadas também outras tecnologias in situ como o *bioventing* e o *biosparging*. Ambos consistem em tratamentos semelhantes, já que utilizam a injeção de ar atmosférico. A diferença entre os dois métodos é que no *bioventing* o ar é injetado na zona saturada do solo e *biosparging* na zona insaturada (SILVA, 2007).

“A aeração objetiva o suprimento de oxigênio ao ambiente, favorecendo o crescimento de microrganismos aeróbios que utilizam este elemento como aceptor final de elétrons, viabilizando a biodegradação do poluente” (TRINDADE et al., 2005 apud SILVA, 2009, p. 12).

A *landfarming* é outra técnica que pode ser utilizada no tratamento de contaminantes hidrocarbonetos (SANTOS, 2013).

De acordo com Santos (2013, p. 11), na biorremediação pela técnica *landfarming*, a microbiota da camada superficial do solo é estimulada por diferentes processos: o solo é revolvido, com o objetivo de aerar e homogeneizar as camadas com diferentes concentrações de contaminantes; são adicionados também

corretivos, fertilizantes e, se necessário, água; e pode-se, ainda, bioaumentar o solo e adicionar surfactantes, visando aumentar a biodisponibilidade dos contaminantes.

Esta técnica pode ser realizada *in situ* e visa a descontaminar o solo no local onde este foi contaminado, ou pode ser realizada *ex situ*, se o solo contaminado foi removido para outro local onde o *lanfarming* será operado (DOELMAN & BREEDVELK, 1999 apud JAQUES et. al, 2007, p. 1198).

3.4.1.2 Biorremediação *ex situ*

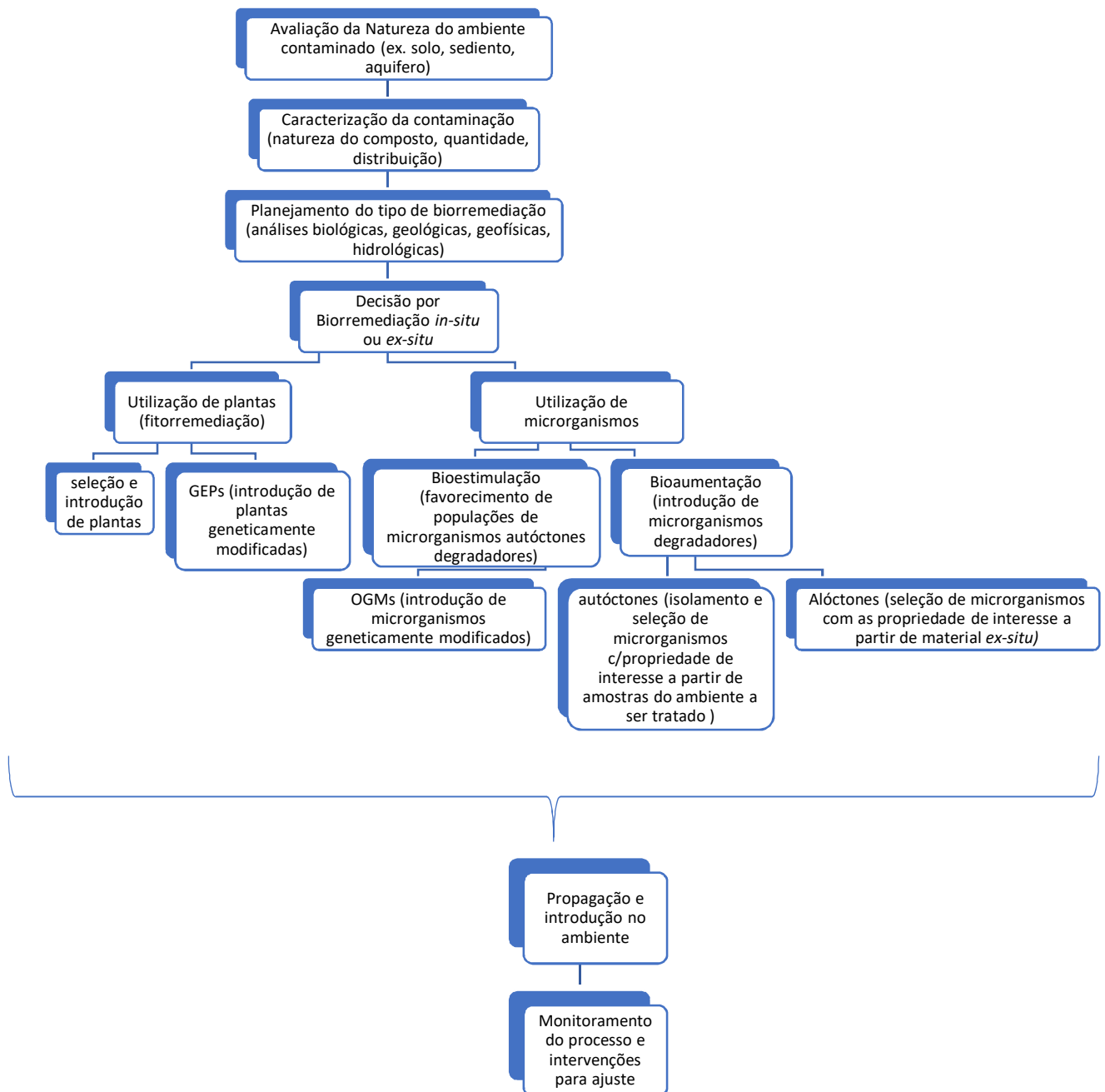
Na biorremediação *ex situ* pelo processo de compostagem, Silva (2007, p. 9) descreve a como a combinação de solo contaminado com compostos orgânicos para o desenvolvimento e estimulação da microbiota, como os resíduos agroindustriais e esterco. “Neste solo, será desencadeado um processo em que os microrganismos aeróbios irão degradar os contaminantes orgânicos, transformando-os em material orgânico estabilizado, CO₂ e água” (JAQUES et al., 2007, p. 1197).

Outra técnica *ex situ* é a utilização de biorreatores (tanques herméticos aéreos, onde se insere o solo contaminado e água; através de aeração mecânica e rotações, propicia aos microrganismos a realizarem a biodegradação dos poluentes (MACLEOD & DAUGULIS, 2005 apud JACQUES et al., 2007).

As biopilhas são uma tecnologia de biorremediação *ex situ* que se apresenta como uma alternativa de baixo custo e que apresenta bons resultados na biodegradação de poluentes, inclusive o BTEX. Essa técnica de biopilhas trata-se da construção de células ou pilhas de solo contaminado. Através de aeração, os microrganismos são estimulados a promover a degradação dos poluentes tais como o BTEX. É recomendável que se tenha um solo impermeabilizado como por exemplo um piso de concreto para prevenir a lixiviação de contaminantes para o solo local; e também que as biopilhas sejam cobertas por lonas plásticas que além de protegê-las de intemperes, também evita a emissão de poluentes na atmosfera. O clima tropical brasileiro favorece bem a aplicação dessa técnica (BITTAR, 2002 apud MORAIS et al., 2005).

A imagem apresentada a seguir (Figura 8) mostra um esquema para determinação da melhor técnica de biorremediação a ser empregada, levando-se em consideração a contaminação por hidrocarbonetos.

Figura 8. Etapas para definição e implementação de um processo de remediação.



Fonte: adaptado de GAYLARD et al. (2005).

3.5 Biossurfactantes

Entre os diferentes componentes de origem microbiana que podem ser utilizados para minimização ou descontaminação de áreas contaminadas encontram-se os biossurfactantes. Eles constituem uma classe importante de compostos químicos utilizados em diversos setores industriais. Atualmente, o

principal mercado para os biosurfactantes é a indústria do petróleo, em que estes compostos podem ser utilizados na limpeza de derrames de óleos, na remoção dos resíduos de óleo a partir de tanques de armazenamento, recuperação de óleo através de cultura microbiana e biorremediação de solos e água. A aplicação de biosurfactantes para a remoção de contaminantes é impulsionada principalmente pelas propriedades físico-químicas do biotensoativo, e não pelos seus efeitos sobre a atividade metabólica ou alterações nas propriedades de superfície da célula. Os biosurfactantes aumentam a interação superficial, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos. Eles podem ainda ser aplicados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas (NITSCHKE; PASTORE, 2002; KANG et al., 2010).

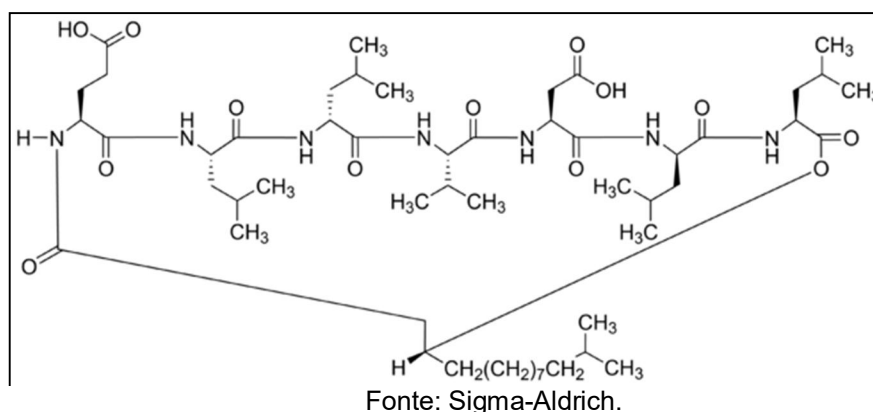
Nesse sentido, realizar a investigação de tecnologias inovadoras e ecologicamente compatíveis para remover os contaminantes se torna interessante. Nos últimos anos, há uma tendência nas pesquisas em realizar a biorremediação de solo e efluentes utilizando os biosurfactantes (CALVO et al., 2009; KANG et al., 2010; SWAPNA et al., 2016).

Os biosurfactantes são moléculas anfifílicas compostas de uma porção hidrofílica, ou polar, comumente denominada “cabeça polar”, e uma porção hidrofóbica ou apolar, comumente denominada “cauda apolar”, ainda heterogêneas obtidas a partir do cultivo de microrganismos podendo ser glicolipídios, lipopeptídeos, complexos protéico-polissacarídeos, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros (AHIMOU et al., 2000) capazes de reduzir a tensão superficial, concentração micelar crítica e tensão interfacial em soluções aquosas e misturas de hidrocarbonetos (KITAMOTO et al., 2002; RAHMAN et al., 2002). Alguns biosurfactantes podem apresentar atividade antibacteriana e antifúngica, destacando-se neste grupo lipopeptídeos como a surfactina (Figura 5), iturina e fengicina (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004).

Os biosurfactantes são expressos espontaneamente durante o crescimento celular e sua função está geralmente relacionada ao consumo de hidrocarbonetos incluindo resíduos oleosos (MUKHERJEE et al., 2006; MUKHERJEE et al., 2008). Estas biomoléculas apresentam uma série de vantagens, em relação aos surfactantes químicos, dentre as quais a baixa toxicidade, a elevada biodegradabilidade, melhor compatibilidade ambiental, maior formação de espuma, elevada seletividade e atividade específica em condições extremas (elevadas

temperaturas, pH ou salinidade) (MULLIGAN, 2009). Os biossurfactantes vêm encontrando aplicações em setores diversos, sendo empregados desde em tratamentos de resíduos até como matérias-primas nas indústrias de cosméticos e alimentos (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Figura 9. Estrutura molecular padrão da Surfactina.



Essas características dos biossurfactantes os fazem ter diversas aplicações em diversos segmentos da indústria, pois são aplicados na detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhante, solubilização, dispersão de fases, adjuvante em produtos ou na remoção de agentes poluentes e contaminantes; e para aumentar a eficiência na degradação de compostos hidrofóbicos por ação microbiana, especialmente, óleos, hidrocarbonetos aromáticos e pesticidas (NITSCHKE; PASTORE 2002; CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Apesar das inúmeras aplicações do biossurfactante, este projeto foi voltado para a biorremediação. O interesse crescente é atribuível ao fato de os surfactantes melhorarem a solubilização dos poluentes do solo e água contaminados e aumentar a sua solubilidade, o que por sua vez melhora a sua biodisponibilidade.

A eficiência dos biossurfactantes se dá conforme descreve Decesaro et al. (2015):

Os biossurfactantes aumentam as áreas da superfície dos compostos insolúveis que conduzem a um aumento da mobilidade e biodisponibilidade dos hidrocarbonetos, além disso, a interação com a superfície da célula aumenta a hidrofobicidade da superfície, permitindo que substratos hidrofóbicos possam se associar mais facilmente com células bacterianas, como consequência, melhoram a biodegradação e remoção dos compostos oleosos. A adição dos biossurfactantes aumenta a biodegradação dos

hidrocarbonetos através dos mecanismos de mobilização, solubilização ou emulsificação.

O resultado de uma biorremediação de solos terá a interferência pelas condições ambientais, tais como: umidade, teor de nutrientes, concentração de oxigênio e tipo de solo, pH, gradiente de temperatura (GONZAGA et al., 2013).

A biorremediação tem se mostrado como sendo a mais importante forma de degradação dos hidrocarbonetos, onde incluem-se o BTEX; sendo que em alguns solos ocorre a forte adsorção desses hidrocarbonetos, e somente com a adição de biossurfactantes pode-se aumentar a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos. Através de técnicas analíticas tipo a cromatografia gasosa, pode-se verificar a eficiência dos biossurfactantes. O *Bacillus subtilis* encontradas no solo por ser capaz de suportar e adaptar-se a diversas variações com relação as condições ambientais com capacidade de produzir a surfactina (biossurfactante lipopeptídico) que tem muito poder de redução da tensão superficial da água e além disso é altamente estável sob grandes variações de pH e temperatura, que para outros microrganismos seria um problema (JACQUES et al., 2007). Considerando também efeitos significativos na biodegradação de hidrocarbonetos e remoção de óleo de solo contaminado (BARROS, 2007).

Os biossurfactantes (Tabela 1) tem sido identificado pelas indústrias como sendo o material mais promissor dos últimos tempos para diversas aplicações apresentando vantagens por serem biodegradáveis e menos tóxicos ao meio ambiente, podendo ser sintetizados a partir de fontes renováveis (KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002).

Segundo Matsuura (2004), a produção dos biossurfactantes em larga, tem custo superior aos surfactantes sintéticos, mas isso tendo a alternar com o avanço tecnológico do processo de fermentação.

Tabela 1. Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos.

MICROORGANISMO	TIPO DE BIOSSURFACTANTE
<i>Candida lipolytica</i>	“Liposan”
<i>Candida petrophilum</i>	Peptidolípido
<i>Candida tropicalis</i>	Complexo ácido graxo-polissacarídeo
<i>Torulopsis bombicola (Candida)</i>	Soforolípido
<i>Torulopsis petrophilum</i>	Glicolípido e/ou proteína
<u>Bacillus subtilis</u>	<u>Lipoproteína (surfactin)</u>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Lipoheteropolissarídeo (Emulsan)
<i>Acinetobacter</i> sp. H01 -N	Ácidos graxos, mono e diglicerídios
<i>Arthrobacter</i>	Glicolípido
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Glicolídeos sacarose e frutose
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipoproteína (lichenysin)
<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>	Complexo proteína-polissacarídeo
<i>Corynebacterium lepus</i>	Ácidos corinomicólicos
<i>Corynebacterium salvonicum</i> SFC	Lípido neutro
<i>Nocardia erythropolis</i>	Lípidos neutros
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolípido
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptídeo
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trealose dimicolatos
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Fosfolípido
<i>Aspergillus</i> sp.	Fosfolípido
<i>Streptomyces tendae</i>	Streptofactina
<i>Flavobacterium</i> sp.	Flavolípidos

Fonte: Matsuura (2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Diante do exposto e com o objetivo de avaliar a capacidade de biorremediação do microrganismo *Bacillus subtilis*, foram realizados ensaios em laboratório utilizando como substrato o óleo diesel e a gasolina em meio líquido e em solo, cujos processos são descritos a seguir.

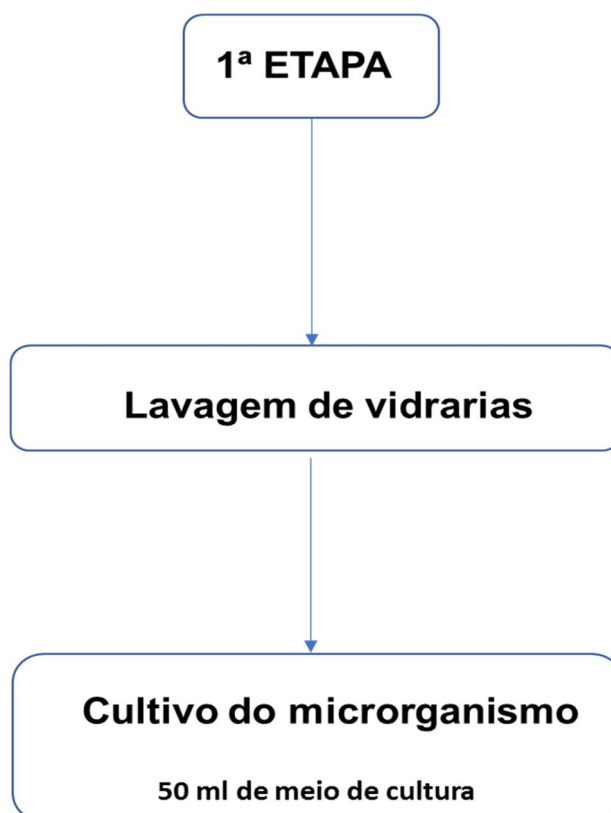
4.1 Lavagem de vidrarias

Foi realizado um Banho de Ácido-Base em todas as vidrarias utilizadas neste projeto. O banho foi realizado aplicando solução de HNO_3 1M por 12h; após este tempo, as vidrarias foram dispostas por mais 12h em solução de NaOH 1M em solução alcoólica 50%; após este período, as vidrarias foram enxaguadas com água destilada e dispostas a secagem em estufa incubadora (Quimis – Diadema, São Paulo, Brasil) por 24h. O banho foi uma etapa importante para retirar qualquer impureza das vidrarias que pudesse alterar os resultados das análises, como parte da primeira etapa para os ensaios.

4.2 Cultivo do microrganismo

Foi realizado o pré-inóculo do microrganismo *Bacillus subtilis* em 50 mL do meio de cultivo padrão Tryptone Soy Broth (TSB). Dispostos em frascos Erlenmeyers (250 mL), esse cultivo foi conduzido em agitador de bancada (Nova técnica modelo NT715 – Piracicaba, Brasil) a 150 rpm/ 35 °C por diferentes períodos de tempo, 24, 48, 72 e 96 horas, conforme ilustração da Figura 10. Todos os meios foram esterilizados a 121°C por 15 minutos (Autoclave modelo AV Plus, Phoenix Luferco – Araraquara, São Paulo – Brasil).

Figura 10. Primeira etapa para a realização dos ensaios.



Fonte: Elaboração própria.

4.3 Dosagem da atividade Emulsificante do Biossurfactante

A verificação da atividade emulsificante do biossurfactante, é a segunda parte dos procedimentos em busca da avaliação da capacidade de biorremediação do microrganismo *Bacillus subtilis*.

4.3.1 Índice emulsificante com sobrenadante de cultivo

Para determinar se o microrganismo estava apto a fazer a produção de biossurfactante foi avaliado o índice emulsificante (IE). Volumes iguais do sobrenadante do cultivo e líquidos hidrofóbicos foram misturados por 1 minuto no vortex e deixados em repouso. O IE foi calculado pela equação $C = 100 \times (V_s/V_t)$, onde V_t corresponde ao volume total da mistura e V_s ao volume da fase emulsionada. Esses valores foram calculados em observações realizadas após 1h e 24h. Método baseado na metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987) e Pereira et al. (2013).

4.4 Extração dos biossurfactantes (BS) – extração ácida

A extração do BS a partir do meio de cultivo foi realizada mediante precipitação ácida. Concluída a fase de produção microbiológica, cada 25 mL do meio fermentado foi centrifugado a 4 °C/ 5.000 rpm por 30 min (Centrifuga Thermo Scientific modelo ST16R - Massachusetts, EUA) para a obtenção do sobrenadante livre de células.

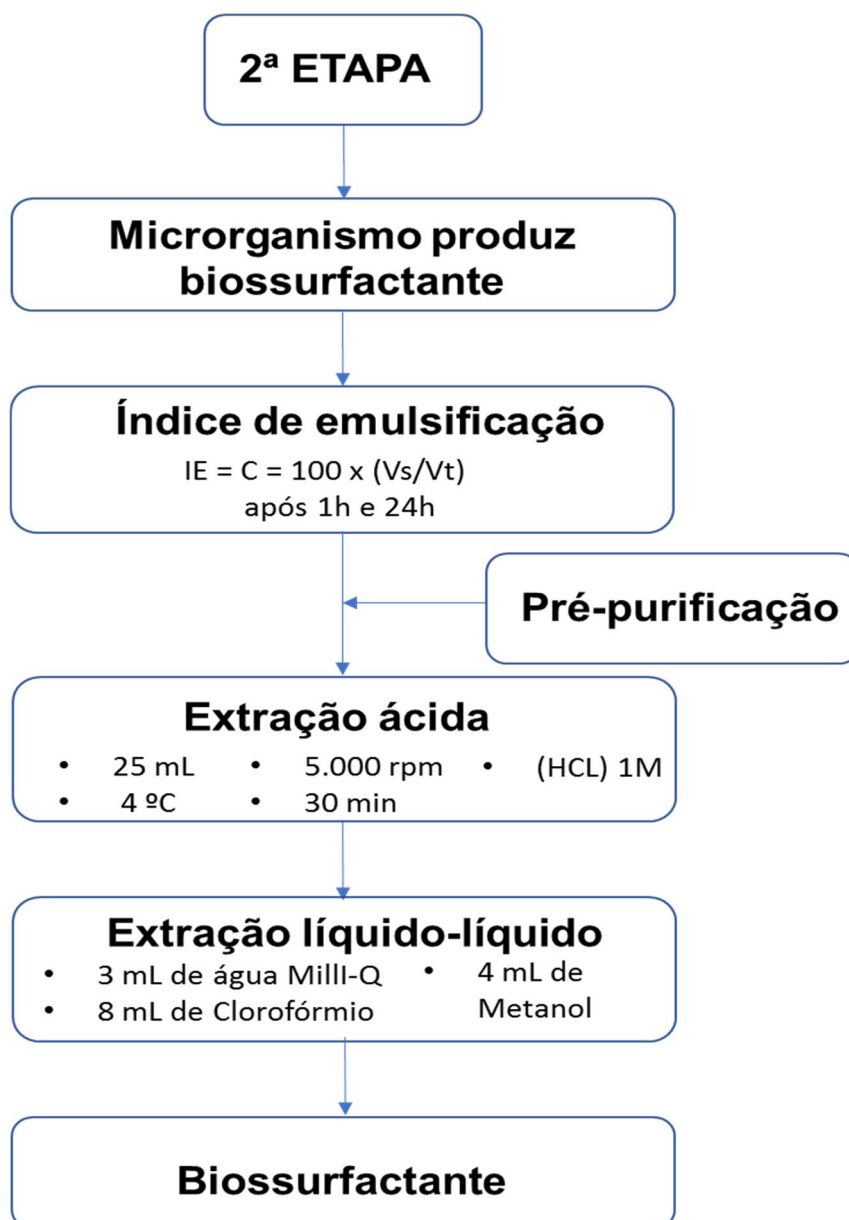
O sobrenadante obtido foi acidificado utilizando ácido clorídrico (HCL) 1M até atingir o valor de pH 2. Após atingir o pH 2, o sobrenadante foi mantido *overnight* a 4 °C e novamente centrifugado, nas mesmas condições citadas acima, e então, o precipitado obtido foi armazenado a 4°C para posterior análise (ROCHA, 2009).

4.5 Extração líquido-líquido

Para obtenção da surfactina concentrada foi realizada a extração líquido-líquido. O precipitado obtido da extração ácida foi ressuspenso em 3 mL de água Milli-Q, misturado a 8 mL de Clorofórmio e 4 mL de Metanol, essa solução foi agitada manualmente cinco vezes e centrifugada 5.500 rpm/ 10 minutos/ 25 °C. A interface aparente foi separada e reservada para a evaporação dos solventes em microtubo de 2 mL. Após a evaporação realizou-se o processo de liofilização (PEREIRA et al., 2013).

Na Figura 11, estão descritos os procedimentos realizados.

Figura 11. Segunda etapa para a realização dos ensaios.

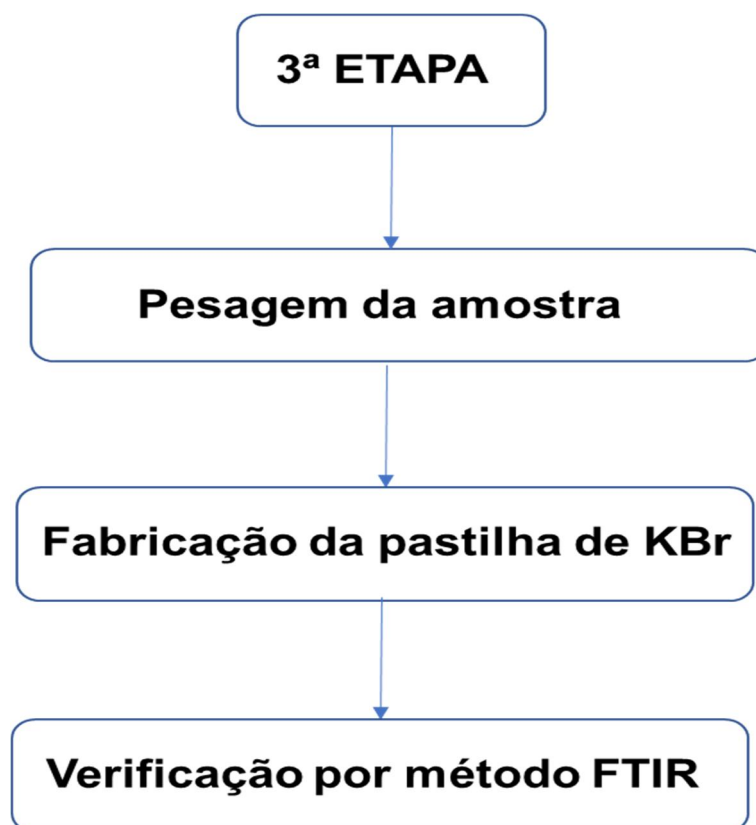


Fonte: Elaboração própria.

4.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização das amostras foi realizada por Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR (AGILENT modelo Cary 630 - Santa Clara, CA, EUA), usando modos de transmitância, demonstrado na Figura 12, denominado etapa 3. Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda 4.000 a 500 cm^{-1} , as bandas foram associadas aos principais grupos químicos.

Figura 12. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).



Fonte: Elaboração própria.

4.7 Ensaios de avaliação da capacidade de biorremediação do microrganismo e produção do biossurfactante

A seguir estão descritas as metodologias para ensaios de avaliação da capacidade de biorremediação e produção do biossurfactante.

4.7.1 Tratamento de óleo diesel em meio líquido

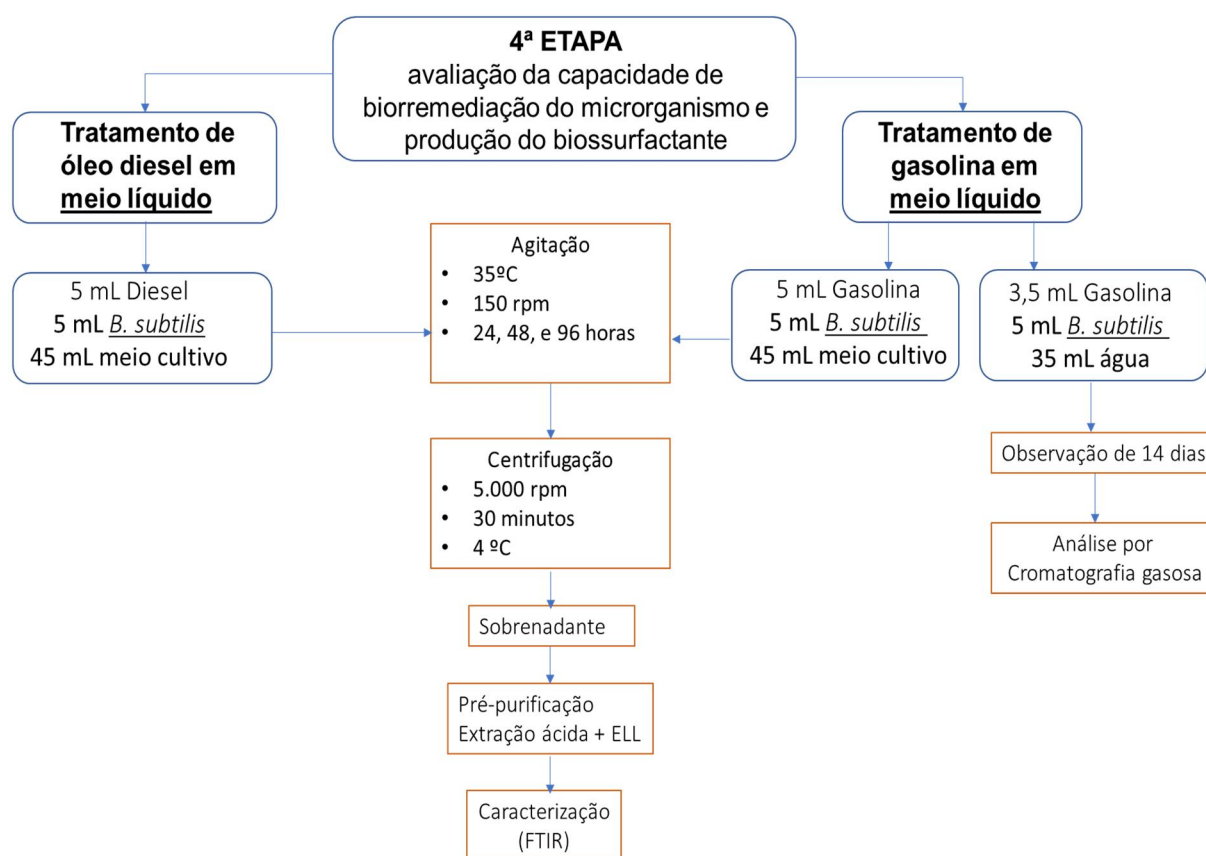
Em frascos Erlenmeyers (250 mL) foram adicionados 45 mL do meio de cultivo padrão *Tryptone Soy Broth* (TSB), 5 mL (10%) de óleo diesel e 5 mL do caldo contendo crescimento de *Bacillus subtilis*. Para confirmar a degradação ou não do óleo diesel um frasco foi elaborado sem acrescentar o microrganismo. Os cultivos foram incubados em agitador de bancada a 35°C/ 150 rpm por 24, 48 e 96 horas. Após cada período as amostras foram centrifugadas para remoção das células a 4°C/ 5.000 rpm por 30 min (Figura 13).

4.7.2 Tratamento de gasolina em meio Líquido

Em frascos Erlenmeyers (250 mL) foram adicionados 45 mL do meio de cultivo padrão *Tryptone Soy Broth* (TSB), 5 mL (10%) de gasolina e 5 mL do caldo contendo crescimento de *Bacillus subtilis*. Para confirmar a degradação ou não da gasolina um frasco foi elaborado sem acrescentar o microrganismo. Os cultivos foram incubados em agitador de bancada a 35°C/ 150 rpm por 24, 48, 72 e 96 horas. Após cada período as amostras foram centrifugadas para remoção das células a 4°C/ 5.000 rpm por 30 min (Figura 13).

Também foram preparadas duas amostras: uma contendo de 35 mL de água, 10% de gasolina e 5 mL de cultivo do microrganismo, e outra somente com água; para após 14 dias serem analisadas por cromatografia gasosa por laboratório terceirizado.

Figura 13. Tratamento em meio líquido.



Fonte: Elaboração própria.

4.7.3 Tratamento de óleo diesel em solo

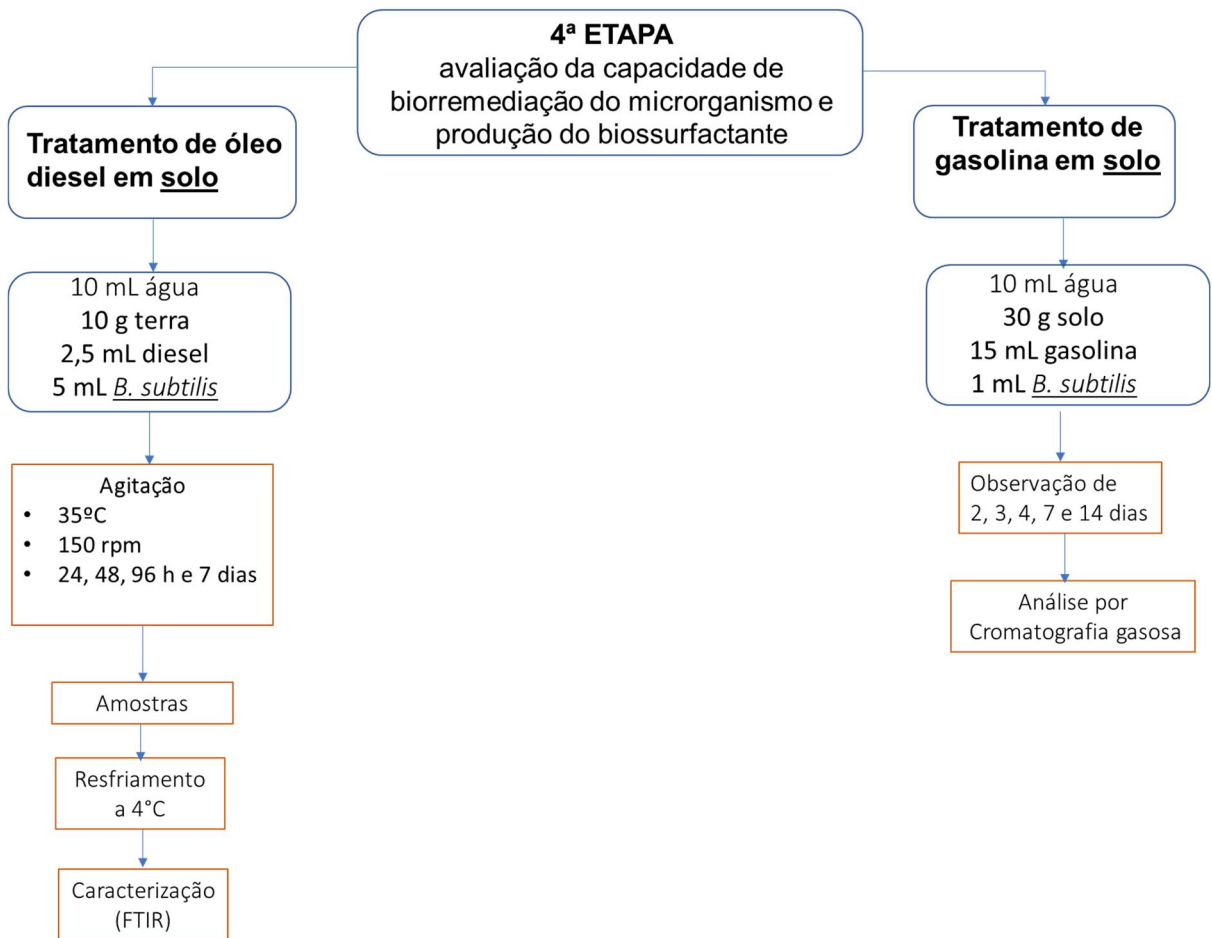
Em frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 10g de solo foram adicionados 5 mL de sobrenadante do BS que foi obtido pelo cultivo de *Bacillus subtilis*, 2,5 mL de diesel e aproximadamente 10 mL de água estéril, o suficiente para homogeneizar as amostras, que foram mantidas em agitador de bancada 35°C/ 150 rpm por 24, 48, 96 horas e 7 dias. Para confirmar a degradação ou não do óleo diesel um frasco foi elaborado sem acrescentar o *Bacillus subtilis*. As amostras foram armazenadas a 4 °C para posterior análise. Baseado no método realizado por Pereira e colaboradores (2013) (Figura 14).

4.7.4 Tratamento de gasolina em solo

Em frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 30g de solo foram adicionados 1 mL do cultivo de *Bacillus subtilis*, 15 mL de gasolina e aproximadamente 10 mL de água estéril, o suficiente para homogeneizar as amostras, que foram analisadas por 2, 3, 4, 7 e 14 dias. Para confirmar a degradação ou não da gasolina, um frasco foi elaborado sem acrescentar o *Bacillus subtilis*. As amostras foram armazenadas a 4 °C para posterior análise (Figura 14).

Totalizando assim onze amostras para serem analisadas por cromatografia gasosa pelo laboratório terceirizado.

Figura 14. Tratamento em solo.



Fonte: Elaboração própria.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir estão apresentados os resultados obtidos dos ensaios de emulsificação, produção de biosurfactante e de biorremediação e suas respectivas discussões.

5.1 Índice emulsificante

Após 96 horas, o período de produção do surfactante, o sobrenadante do cultivo foi submetido a análise de emulsificação. A metodologia proposta, quando executada em bancada, não forneceu os IE esperados.

O biosurfactante produzido em nossos ensaios poderia ser aplicado na biorremediação de óleo ou poluentes com características hidrofóbicas. Os resultados obtidos dos IE foram de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Análise do Índice de Emulsificação com gasolina e óleo diesel.

Contaminante	1h			24h		
	Vt(mL)	Vs(mL)	C=IE(%)	Vt(mL)	Vs(mL)	C=IE(%)
Gasolina	4	1	25	4	0,5	12,5
Diesel	4	0,2	5	4	0,2	5

Fonte: Elaboração própria. **Vt**: volume total da mistura, **Vs**: volume da fase emulsionada e **C=IE**: índice emulsificante.

Observando a tabela 2, é identificado que o sistema se manteve estável com diesel, em que o IE foi de 5%. Já com a gasolina o IE diminuiu após 24h, passou de 25% após 1 hora para 12,5% após 24h.

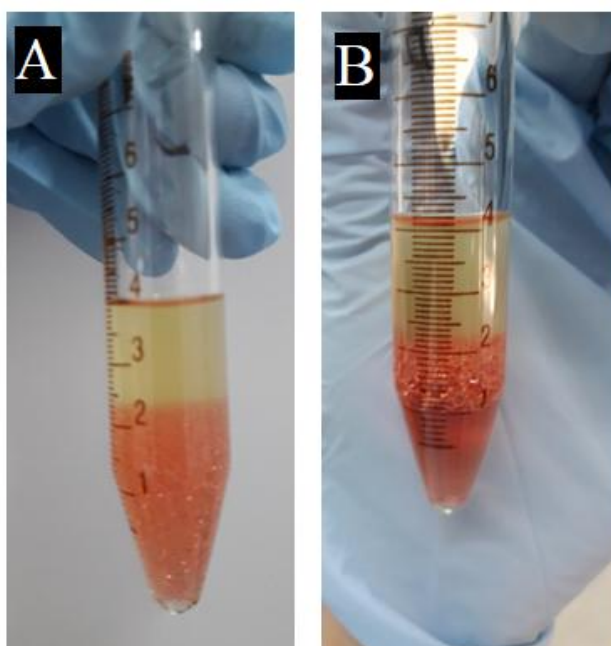
5.1.1 Índice emulsificante com biosurfactante pré-purificado

No IE realizado por Bueno et al. (2010), em que a produção do biosurfactante foi realizada com a bactéria *Bacillus pumilus* isolada utilizando meio sintético acrescido de diferentes fontes de carbono em diferentes valores de pH, por diferentes períodos de tempo, em diferentes concentrações, o IE foi realizado com 3,5 mL do sobrenadante e 2,0 mL do tolueno. As amostras com pH 7 e 8 conduzidas por 48, 72 e 96h obtiveram IE= 11%; valores que se aproximam aos resultados

obtidos nesse projeto, que após 1 e 24h, o IE observado para a amostra de gasolina foi 12,5%. Na atividade de emulsão realizada por Rocha (2017) foi identificada a produção de biossurfactante pelo microrganismo *Bacillus subtilis*, em que o IE da amostra com sobrenadante de cultivo livre de células produzido por fermentação mais o querosene foi igual a 62%.

Em nossos ensaios foi observado, após a pré-purificação em extração líquido-líquido, o IE no diesel (Figura 15) foi de 50%.

Figura 15. Índice de emulsificação com biossurfactante pré-purificado. A – Instantes após passar no vórtex. B – Um minuto após passar no vortex.

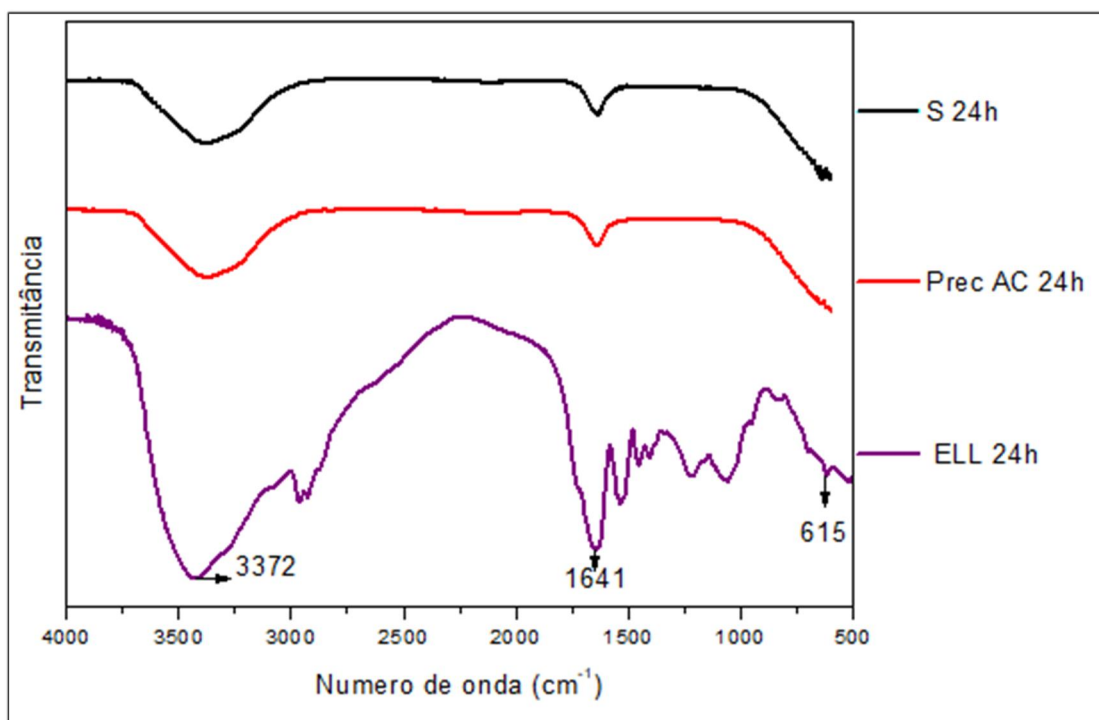


Fonte: Elaboração própria.

5.2 Análise da produção do biossurfactante através do método FTIR

Podemos observar, na Figura 16, os espectros referentes ao precipitado acidificado de 24 horas do sobrenadante. As curvas são semelhantes às curvas dos sobrenadantes analisados sem acidificar e, no espectro referente à extração líquido-líquido, as curvas continuam, além de novas curvas características também ficarem evidentes. Posteriormente, esses espectros foram comparados aos encontrados na literatura e descritos nos itens a seguir.

Figura 16. Espectros de transmitância de FTIR da pré-purificação.



S 24h – Sobrenadante obtido do cultivo de *Bacillus subtilis* após incubação de 24h. **Prec AC** – Precipitado obtido na extração ácida realizada com sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* de 24h. **ELL 24h** – pré-purificação obtido da extração líquido-líquido realizada com precipitado acidificado.

Fonte: Elaboração própria.

Das et al. (2008) fez a extração ácida do biossurfactante semelhante ao apresentado neste trabalho e concluída essa etapa, o precipitado de biossurfactante bruto foi dissolvido em água com pH 7,5 e foi liofilizado com posterior solubilização em metanol absoluto e filtração a 0,22 μm . E observou valores muito semelhantes aos apresentados neste trabalho, que aproximam os resultados obtidos na identificação da produção de biossurfactantes no processo de biorremediação para fases líquidas e sólidas.

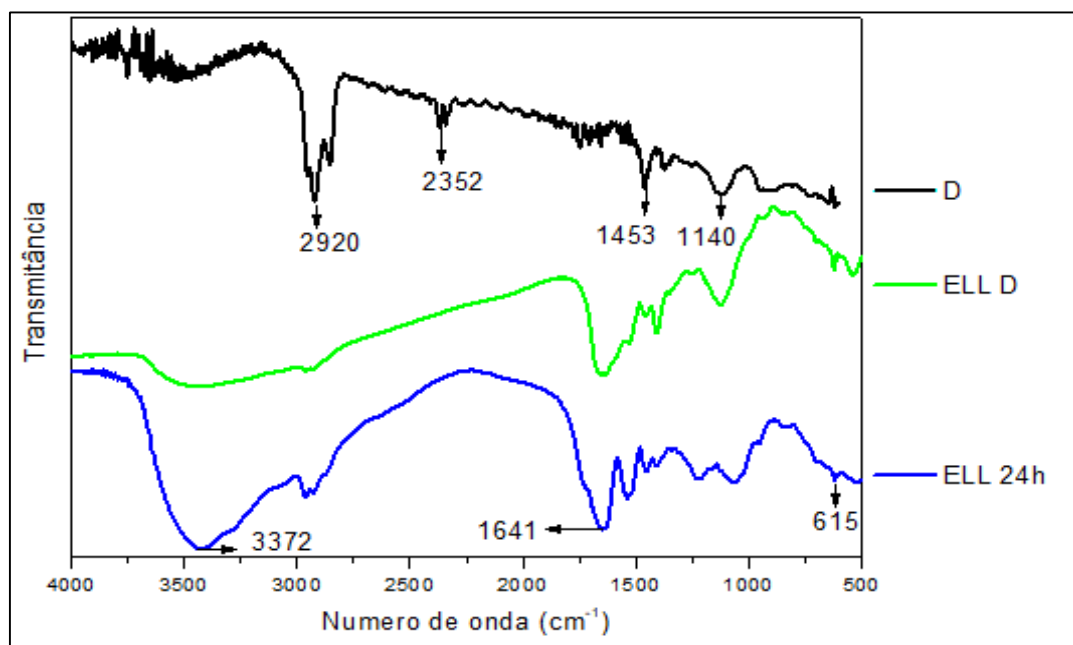
A extração ácida concentra o biossurfactante produzido e a extração líquido-líquido auxilia na pré-purificação. Como pode ser observado na Figura 16, os picos característicos da surfactina continuam presentes após a pré-purificação. As bandas dos picos são 3.372 cm^{-1} , referente à possíveis deformações axiais de O-H (SÁNCHEZ-SOTO et al., 2007), banda 1.641 cm^{-1} , absorções referentes à presença de ligação dupla C=C (ALBUQUERQUE et al., 2007) e banda 615 cm^{-1} , indicando frequência do grupo C $\equiv$ C-H (FAUST, 1997).

5.2.1 Capacidade de Biorremediação e Produção de biosurfactante

Os grupamentos químicos característicos do diesel (Figura 17) são as bandas 2.920 cm^{-1} , referente à H-C-H, banda 2.352 cm^{-1} , referente à dupla C=O, banda 1.453 cm^{-1} , referente ao CH_2 e CH_3 e a banda 1.140 cm^{-1} , também referente a dupla C=O, se assemelhando aos descritos na literatura (RIBEIRO, et al. 2014).

Essas bandas se tornam inexistentes quando realizado o tratamento de biorremediação utilizando o sobrenadante obtido pelo cultivo de *Bacillus subtilis*. No espectro obtido da extração líquido-líquido realizada com o tratamento de óleo diesel as bandas dos picos são 3.372 cm^{-1} , referente à possíveis deformações axiais de O-H (SÁNCHEZ-SOTO et al., 2007), banda 1.641 cm^{-1} , referente à presença de ligação dupla C=C (ALBUQUERQUE et al., 2007) e banda 615 cm^{-1} , indicando frequência do grupo $\text{C}\equiv\text{C-H}$ (FAUST, 1997), representando o aumento da biosurfactina em contato com o líquido hidrofóbico.

Figura 17. Espectros de transmitância de FTIR do tratamento de óleo diesel em água.



D – Óleo diesel. **ELL D** – Extração líquido-líquido realizada no tratamento de óleo diesel. **ELL** – Extração líquido-líquido realizada com precipitado acidificado de 24h

Fonte: Elaboração própria.

A biorremediação irá depender das condições de crescimento do microrganismo, como biodisponibilidade de nutrientes, substratos e disponibilidade de oxigênio (CHANDRA et al., 2013; VARJANI et al., 2017, ABBASIAN et al., 2015). Os BTEX por exemplo, podem ser seletivamente metabolizados dependendo da concentração de oxigênio disponível (ABBASIAN et al., 2015).

Os ensaios de biorremediação foram realizados em aerobiose, ou seja, na presença de oxigênio. Nessas condições, segundo Abbasian et al. (2015), os compostos BTEX sofrem oxidação inicial e o anel aromático presente pode ser clivado pela ação metabólica do microrganismo. Além disso, os autores afirmam que há oxidação do terminal de metila para formar álcool primário pela introdução de oxigênio molecular em hidrocarboneto.

O modo de ação dos biossurfactantes na biorremediação de poluentes tem sido amplamente estudado (VARJANI; UPASANI, 2016). Uma das hipóteses é que os biossurfactantes formam micelas que aumentam a biodisponibilidade dos poluentes, e pode favorecer a biodegradação de hidrocarbonetos (SOUZA et al., 2014; VARJANI; UPASANI, 2016). Os resultados de FTIR, observados neste trabalho, podem estar relacionados com essa hipótese, pois as curvas obtidas após o tratamento de biorremediação apresentam os mesmos alongamentos das curvas obtida após a produção e extração do biossurfactante.

A oxidação pode ser observada na Figura 17, onde podemos analisar os espectros dos contaminantes e do biossurfactante, antes e depois do tratamento de 24 horas, pois os alongamentos típicos de óleo diesel, são modificados e aparecem novos alongamentos nas regiões com presença de oxigênio nas ligações, caracterizando a presença da biodegradação com relação aos picos semelhantes do óleo diesel e gasolina com o biossurfactante. Segundo o trabalho de Varjani (2017), poluentes monoaromáticos (BTEX) derivados de petróleo podem ser degradados pelo microrganismo da espécie *Bacillus*. Essa oxidação também pode ser observada na Figura 18.

Na análise FTIR realizada por Yadav (2015), os picos de maior relevância observados ao analisar o óleo diesel foram $2.921,4\text{ cm}^{-1}$ que representa o alongamento C-H e $1.459,6\text{ cm}^{-1}$ que representa a flexão C-H que indica a presença de alcanos, picos esses também observados na análise realizada neste trabalho. Qasim (2017) identificou na análise de óleo diesel picos fortes e semelhantes: 2.922 cm^{-1} e 1.459 cm^{-1} evidenciando a presença de alcanos.

Os resultados obtidos foram comparados com os valores alcançados pelos autores Yadav (2015) e Qasim (2017). Sendo o menor número de onda identificado com um valor de maior biodegradabilidade do diesel, qualitativamente caracterizando uma deformação axial de C-O, tanto em fase líquida quanto sólida, que nos permite também perceber que o microrganismo utilizado teve maior degradabilidade na gasolina do que no diesel em fase líquida, conforme ilustrados pelas Figuras 17 e 18.

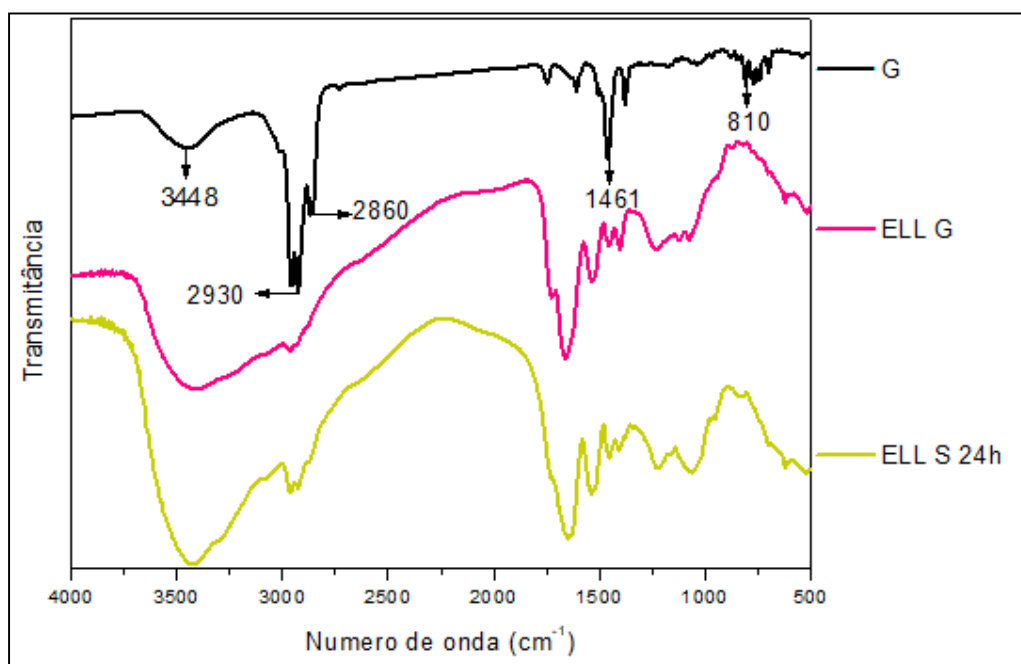
Deon (2012) realizou a contaminação do solo com óleo diesel, óleo lubrificante e óleo de soja, a fim de simular possíveis contaminações com resíduos oleosos. Os experimentos foram realizados durante 21 dias e foi observada a biorremediação, em que os percentuais de remoção de óleos e graxas foram de 18,54%, 7,30% e 11,38%, respectivamente.

Com relação a biodegradação observada, apresentado e detalhado na Figura 17, percebe-se que o processo de biodegradação é mais lento, pois os espectros do diesel e do diesel tratado em 24 horas, existem poucas deformidades nos alongamentos de banda, caracterizando pouca eficiência na degradação pelo microrganismo, já nos espectros referentes ao período de 48 horas e 7 dias, é visível que houve uma biodegradação e a produção do biossurfactante, observando maiores alongamentos de banda, mas se analisarmos por mais tempo, provavelmente os picos possam se assemelhar ao do biossurfactante.

Na Figura 18, os grupamentos químicos característicos da gasolina (primeiro espectro), são as bandas 3.448 cm^{-1} , relacionadas com OH no alongamento da vibração dos grupos hidroxila (JIAO et al., 2009), bandas 2.930 cm^{-1} e 2.860 cm^{-1} , referentes ao estiramento simétrico e assimétrico C-H de grupos CH_3 e CH_2 , a banda 1.461 cm^{-1} , referente à deformação angular assimétrica dos grupos CH_3 e CH_2 e a banda 810 cm^{-1} , referente à deformação fora do plano C-H do anel aromático, semelhantes aos descritos na literatura (COELHAS, 2013).

Essas bandas se tornam menos expressivas quando realizado o tratamento de biorremediação utilizando *Bacillus subtilis*. O espectro referente ao tratamento (segundo espectro) fica semelhante ao espectro da pré-purificação do biossurfactante (terceiro espectro).

Figura 18. Espectros de transmitância de FTIR do tratamento de gasolina em água.

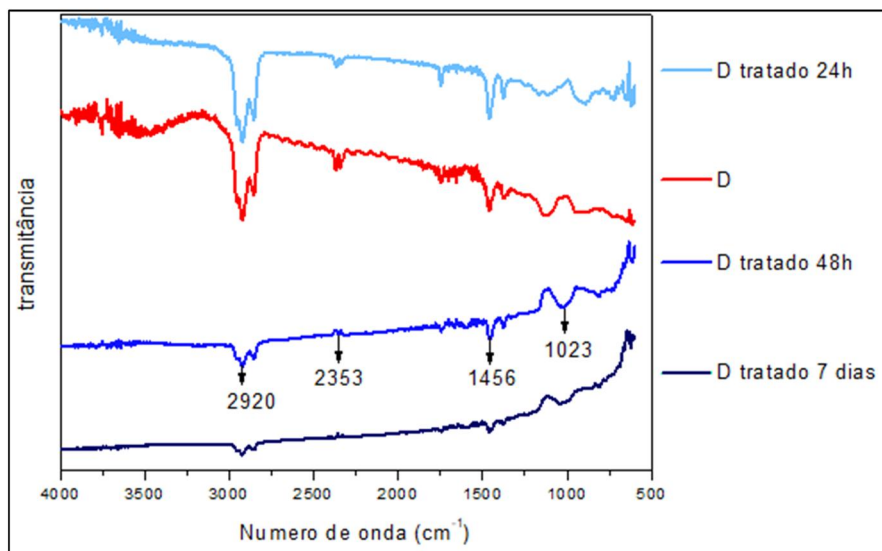


G – Gasolina. **ELL G** – Extração líquido-líquido realizada com o precipitado acidificado obtido no tratamento de gasolina. **ELL S 24h** – Extração líquido-líquido realizada na pré-purificação do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*.

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 19, o tratamento do óleo diesel em solo, a amostra obtida após 24h de tratamento (primeiro espectro) se assemelha bastante ao espectro do diesel puro (segundo espectro). Já nos espectros obtidos em análises das amostras de 48h (terceiro espectro) e 7 dias (quarto espectro) é possível observar uma contínua degradação do diesel através da deformação das bandas que o caracterizam: banda 2.920 cm^{-1} refere-se a CH_2 , CH_3 modo de alongamento (MIHALY et al., 2006), banda 2.353 cm^{-1} corresponde à faixa de alongamento C-O (KANNAN, 2014), banda 1.456 cm^{-1} ao grupo CH_2 (ENRIQUE et al., 2007) e a banda 1023 cm^{-1} deformação axial de C-O, sendo referente ao grupamento éster (GARCIA et al., 2012).

Figura 19. Espectros de transmitância de FTIR do tratamento realizado do óleo diesel em solo.



D tratado – Sobrenadante do tratamento realizado com diesel em solo com análises de **24, 48** horas e **7** dias. **D** – Óleo diesel.

Fonte: Elaboração própria.

Assim, não foi possível deduzir valores numéricos, pois utilizamos o método FTIR que nos permitiu analisar qualitativamente que os contaminantes estudados foram biodegradados, através de uma diminuição dos valores de frequência de banda encontrados em laboratório.

Herculano (2011) utilizou para o crescimento de *Bacillus subtilis* e concluiu que os peptídeos produzidos apresentam aplicações para inibir o crescimento de cianobactérias, precipitação de metais e remoção de compostos orgânicos em solos contaminados, assim como foi observado neste trabalho.

5.3 Análise da Biorremediação da Gasolina por Cromatografia Gasosa

Essas análises foram realizadas pelo laboratório terceirizado.

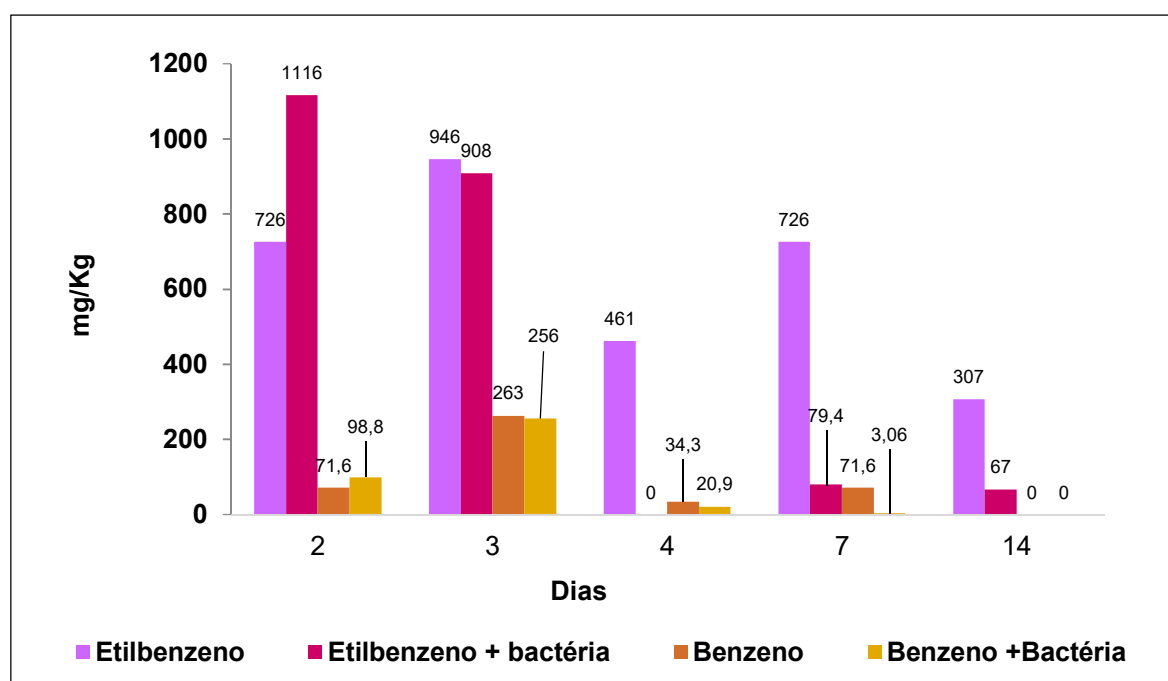
5.3.1 Gasolina em Solo

A análise inicial de solo com água, indicou a ausência dos BTEX.

Podemos observar na Figura 20, a concentração de benzeno, detectada na amostra, após dois dias de análise, com bactéria, foi de 98,8 mg/kg e a concentração detectada sem a utilização da bactéria, foi de 71 mg/kg. Já a

concentração de etilbenzeno, na amostra com bactéria, foi de 1.116 mg/kg e sem a bactéria foi 726 mg/kg. Foi observado um aumento do valor dos níveis de benzeno e etilbenzeno após 3 dias de contato, isso pode ter ocorrido pelo transporte ou coleta de amostra ou ainda pelo acúmulo do contaminante pelo *Bacillus subtilis* (bioacumulação) antes do início da biodegradação.

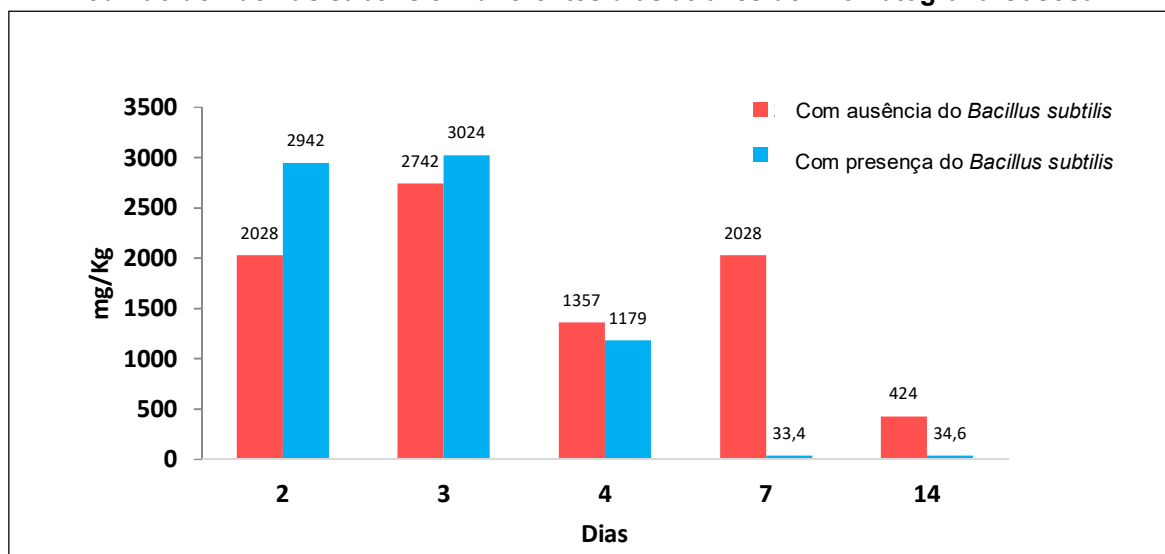
Figura 20. Análise da presença de benzeno e etilbenzeno das amostras de solo contendo gasolina na presença ou não de *Bacillus subtilis* em diferentes dias através de Cromatografia Gasosa.



Fonte: Elaboração própria.

Podemos ainda observar na Figura 20, que os níveis de benzeno na presença de bactéria eram nulos após 7 dias de contato e do etilbenzeno com bactéria não foi detectada a presença no 4º dia.

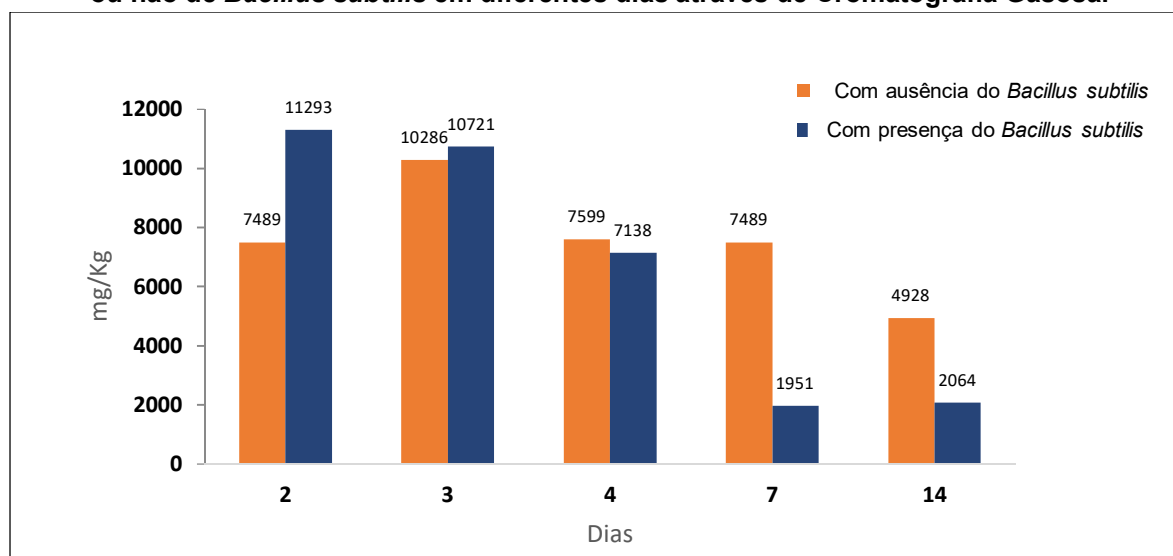
Figura 21. Análise da presença tolueno das amostras de solo contendo gasolina na presença ou não de *Bacillus subtilis* em diferentes dias através de Cromatografia Gasosa.



Fonte: Elaboração própria.

Assim como ocorreu com as amostras de etilbenzeno e benzeno, as amostras de tolueno nas idades de 2 e 3 dias com a presença do *Bacillus subtilis*, tiveram valores maiores do que as amostras sem a presença do *Bacillus subtilis*; pelo mesmo motivo. Conforme demonstra a Figura 21, o comportamento do tolueno a partir da idade de 4 dias já demonstra os efeitos da biorremediação. Após 14 dias os níveis de tolueno na presença do microrganismo diminuíram 85 vezes, saindo de 2.942 mg/kg ou ppm para aproximadamente 34 mg/kg ou ppm. Já sem os microrganismos, após 14 dias, os níveis de tolueno diminuíram 5 vezes.

Figura 22. Análise da presença xilenos das amostras de solo contendo gasolina na presença ou não de *Bacillus subtilis* em diferentes dias através de Cromatografia Gasosa.



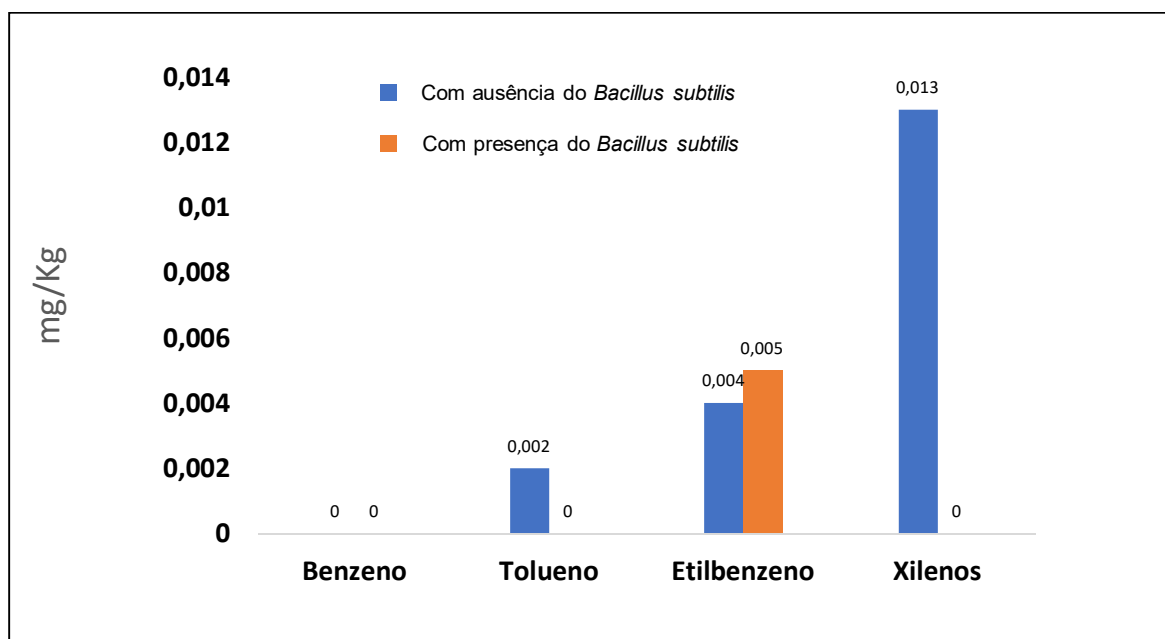
Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 22 observamos o mesmo comportamento do *Bacillus subtilis* nas idades de 2 e 3 dias, sendo a quantidade do xileno maior nas amostras com a presença do *Bacillus subtilis* do que com a ausência. Com as idades de 4, 7 e 14 dias, a biorremediação começa a ser relevante e após 14 dias os níveis de xileno na presença do microrganismo diminuíram 5 vezes, saindo de 11.293 mg/kg ou ppm para a aproximadamente 2.064 mg/kg ou ppm. Já sem o microrganismo, após 14 dias, os níveis de xileno diminuíram 1,5 vezes.

5.3.2 Gasolina em água

Podemos observar na Figura 23 que a bactéria foi capaz de degradar os BTEX, exceto o etilbenzeno.

Figura 23. Análise da presença BTEX das amostras de água contendo gasolina na presença ou não de *Bacillus subtilis* em diferentes dias através de Cromatografia Gasosa.



Fonte: Elaboração própria.

De acordo com as normas de vigilância à saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno, publicado pelo ministério da saúde, o benzeno é um mielotóxico regular, leucemogênico e cancerígeno, mesmo em baixas concentrações. Outras alterações podem também ocorrer. Além disso, não existem sinais ou sintomas patognomônicos da intoxicação (BRASIL, 2004).

É possível observar que os níveis BTEX diminuem e voltam a ser detectados após alguns dias. Alguns autores afirmam que embora os BTEX possam ser biodegradados anaerobicamente, eles têm diferentes suscetibilidades à biodegradação anaeróbica e podem formar outras substâncias, como por exemplo o etilbenzeno ser degradado na forma de tolueno e xileno (FOGHT 2008; HARMS et al. 1999; WEELINK et al., 2010).

5.3.3 Análise da biodegradação da gasolina em solo e comparação com valores orientadores da CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

Comparando-se os resultados obtidos em laboratório, nas amostras de 48 horas e 14 dias, observamos uma redução percentual dos BTEX mínima de 79,86% e máxima de 100%, conforme Tabela 3.

Tabela 3. Análise da biodegradação da gasolina em solo.

Contaminante	Concentração inicial (mg kg ⁻¹)	Remoção (%)	Tempo (dias)
Benzeno	98,8	100	14
Etilbenzeno	1116	85,04	14
Tolueno	2942	98,58	14
Xileno	11293	79,86	14

Fonte: Elaboração própria.

Algumas publicações, citadas na Tabela 4, relatam a eficiência de tratamentos biológicos com redução de até 95% para diferentes tipos de contaminantes, incluindo os hidrocarbonetos, resíduos de petróleo e solventes clorados (DCE, TCE, PCE). Comparando com os nossos resultados (Tabela 3) observamos que os percentuais de remoção são equivalentes, porém em períodos bem menores (14 dias).

Tabela 4. Aplicações das técnicas de biorremediação para remoção de hidrocarbonetos no solo em condições de campo.

Técnica	Contaminante	Concentração inicial (mg kg ⁻¹)	Remoção (%)	Tempo (dias)	Referencia
Biorremediação passiva	Petróleo	18.000	56	480	CHINEAU et al. (2003)
Bioaugmentação	Resíduo Petroquímico	69.700	92	360	MISHIRA et al. (2001)
Bioestimulação	Resíduo Petroquímico	69.700	90	360	MISHIRA et al. (2001)
Compostagem	HAPs	10.960	70	150	AHTIANEN et al. (2002)
Biorreator	Resíduo Petroquímico	50.000	99	12	WARD et al. (2003)
Fitorremediação	Pireno	488,70	36,13 ¹ (85,02)	45	LING & GAO (2004)
landfarming	Hidrocarbonetos	46.000	55	60	MAIN et al. (2005)

¹Remoção dos contaminantes ao final do período de avaliação em relação ao tratamento sem plantas. Entre parênteses, a remoção dos contaminantes em relação ao início do período de avaliação.

Fonte: adaptado de JAKUES et al. (2007, p. 1199).

Segundo o Decreto do Estado de São Paulo nº 50.263/2013, existem definições dos valores de referência que devem ser observados em todo gerenciamento de áreas contaminadas, conforme descritos:

Valor de referência de qualidade (VRQ) = Concentração de determinada substância que define solo limpo ou qualidade natural da água subterrânea;

Valor de prevenção (VP) = Concentração de determinada substância, acima do qual podem ocorrer alterações prejudiciais do solo e da água subterrânea;

Valor de intervenção (VI) = Concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea, acima da qual, existem riscos potenciais diretos ou indiretos, à saúde humana considerando cenário e exposição genérico.

Tabela 5. Comparação dos valores obtidos, com os valores orientadores da CETESB.

Contaminante	Concentração final (mg kg ⁻¹)	Valor de intervenção CETESB VI (mg kg ⁻¹)
Benzeno	0,0	0,2
Etilbenzeno	167	1,4
Tolueno	41,8	80
Xileno	2274	19

Fonte: Elaboração própria.

Utilizando os valores estipulados pela CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo como referência, podemos observar que a biodegradação em nossas análises não atingiu os valores orientadores, exceto para o benzeno. Os valores ficaram muito próximos aos dos níveis de intervenção para solo, como indicado na Tabela 5. Esses valores podem ser melhorados se aumentado o tempo de contato do microrganismo com a amostra, como sugerido nas Tabelas 3 e 4.

De acordo com a CETESB (2016), os valores de referência de qualidade estabelecidos são conforme descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo, 2016.

Susbtância	Solo (mg kg ⁻¹ peso seco)					Água subterranea (ug L ⁻¹) (VI)
	Valor de referencia de qualidade (VRQ)	Valor de prevenção (VP)	Valor de intervenção (VI)			
			Agrícola	Residencial	Industrial	
Benzeno	zero	0,002	0,020	0,080	0,200	5,000
Etilbenzeno	zero	0,030	0,200	0,600	1,400	300,000
Tolueno	zero	0,900	5,600	14,000	80,000	700,000
Xilenos	zero	0,030	12,000	3,200	19,000	500,000

Fonte: adaptado de Decisão de Diretoria nº 256/2016/E, de 22/11/2016, CETESB.

Especificamente sobre as limitações da aplicação da biorremediação *in situ*, Lima (2005, p. 64) faz algumas observações, a saber:

Uma limitação é o fato de que a biorremediação só ocorre em fase aquosa, portanto, a remediação direta não é aplicável para fontes contendo NAPLs em fase livre. Adicionalmente, a decloração de hidrocarbonetos altamente clorados produz metabólitos que, se não forem autodegradáveis, são mais móveis que o composto tóxico original. A biorremediação *in-situ* também é limitada pela dificuldade na distribuição de nutrientes e receptores ou doadores de elétrons para zonas heterogêneas ou com baixa permeabilidade. Outra possível limitação se refere aos custos do trabalho e manutenção dos sistemas que requerem longo tempo de tratamento.

6 CONCLUSÃO

A biorremediação pode ser uma alternativa eficiente, econômica e versátil para o tratamento de poluentes de hidrocarbonetos de petróleo (BTEX) de ambientes impactados. Este trabalho é um indicativo de que poderá ser utilizado tanto os microrganismos como os seus subprodutos para controlar ou degradar esses poluentes e restabelecer o equilíbrio ecológico.

É evidente que além da degradação dos poluentes, o microrganismo utiliza o óleo diesel e a gasolina, como substrato para a produção do biossurfactante, pois os picos identificados são semelhantes aos picos de surfactina padrão encontrada na literatura. Constatou-se que o microrganismo *Bacillus subtilis* é capaz de degradar os BTEX e produzir biossurfactante, sendo o biossurfactante uma molécula que pode atuar no processo de biorremediação, além de outras aplicações industriais.

O método FTIR mostrou-se indicado para a realização de análises apenas em meio líquido. O mais indicado para análises em solo é a Cromatografia Gasosa, através do método EPA 8260 C, 2006 que foi realizado pelo laboratório terceirizado, que mostraram a total remoção de alguns compostos do BTEX pelo *Bacillus subtilis*.

Este trabalho contribui para a popularização da tecnologia de biorremediação, e incentiva os proprietários de áreas que são contaminadas por solventes aromáticos, a investirem nessa técnica. Permitindo assim, os meios impactados retornarem aos patamares dos valores de referência de qualidade indicados pela CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.

Apesar dos resultados obtidos nesta pesquisa serem satisfatórios, atingindo altos percentuais de biodegradação, equiparando-os com a bibliografia estudada, ainda não foram atingidos os valores orientadores para solos, da CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.

Sugere-se para trabalhos futuros, a ampliação deste estudo, em maior tempo de tratamento, que neste trabalho foi no máximo de 14 dias. E também, estudos onde se façam a caracterização de vários tipos de solos (argila, areia, silte, com maior e menor quantidade de matéria orgânica, etc.) com posterior contaminação controlada para a verificação e comparação da biodegradabilidade do *Bacillus subtilis* nestes diferentes tipos de solos.

7 REFERÊNCIAS

ABBASIAN, F., LOCKINGTON, R., MALLAVARAPU, M., NAIDU, R. **A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria.** Appl. Biochem. Biotechnol. New York: Springer Science + Business Media, 2015. 1–30 <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5>.

AHIMOU, F. **Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity.** R. Enzyme and Microbial Technology: December 2000. Volume 27, Issue 10, Pages 749-754.

ALBUQUERQUE, I. L., ALVES, L.A., LEMOS, T.L.G., MONTE, F.J.Q. **Ácido Canárico (3,4- seco derivado do lupano) em própolis do Ceará.** Química Nova. 2007

ANDRADE, J. D. A.; AUGUSTO, F. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados.** Eclética Química: 2010. Scielo, n.35, p17 - 43 p.

BARROS, F. F. C. **Estudos das variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* em manipueira.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007, p. 117.

BUENO, S. M.; SILVA A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. **Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação.** Química Nova, 2010. v. 33, n. 7, p. 1572-1577.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria MS Nº 776 DE 28/04/2004.**

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 273, de 29 de novembro de 2000.** Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009.** Brasília, 2009.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro, 2017.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD. I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. **Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects**. Sci Total Environ, 2009. n. 407, p. 3634-3640,

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. **Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules**. Curr Opin Microbiol., 2004. n. 7, v. 3, p. 262-266.

CHANDRA, S.; SHARMA, R.; SINGH, K.; SHARMA, A. **Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon**. Annals of Microbiology, Milano, v. 63, n. 2, p. 417-431, 2013.

COELHAS, A. M. B. **Caracterização de produtos petrolíferos por técnicas espectroscópicas**. Diss. Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2013.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Avaliação de Benzeno; Tolueno; o-Xileno; m, p-Xileno e Etilbenzeno na Atmosfera da Estação de Monitoramento de Pinheiros - Município de São Paulo – SP 2013 – 2014**. 2013. Disponível em: <<http://ar.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/37/2013/12/Relatorio-BTEX.pdf>>. Acesso em: 10 de agosto 2017.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Decisão De Diretoria Nº 256/2016/E, de 22 de novembro de 2016**. São Paulo. 2016. Disponível em: <<https://www.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2014/12/DD-256-2016-E-Valores-Orientadores-Dioxinas-e-Furanos-2016-Intranet.pdf>>. Acesso em: 02 de abril de 2019.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Relação de Áreas Contaminadas e Reabilitadas**. São Paulo. 2018b. Disponível em: <<http://areascontaminadas.cetesb.sp.gov.br/relacao-de-areas-contaminadas/>>.

Acesso em 05 de abril de 2019.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Relatório de Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado de São Paulo**. Dezembro, 2018a. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/wp-content/uploads/sites/17/2019/04/Texto-explicativo_dez-2018.pdf>. Acesso em 05 de abril de 2019.

COOPER D.G., GOLDENBERG, B.G. **Surface-Active agents from two Bacillus species**. Applied Environmental Microbiology, 1987.v.53, ed. 2, p.224-229.

CROZERA, E. H. **Identificação das áreas Contaminadas no Município de Ribeirão Pires - São Paulo**. Universidade de São Paulo: Instituto de Geociências: 2001, 189p.

DAS, P., MUKHERJEE, S., SEN, R. **Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine Bacillus circulans**. Journal of Applied Microbiology. 2008, v. 104, n.6, p. 1675-1684.

DECESARO, A.; BERTICELLI, R.; MAGRO, F.G.; COLLA, L.M. **Biossurfactantes em Processos de Biorremediação**. Revista Ciências Exatas e Naturais, 2015.Vol. 17, n°1,

DEON, M. C. et al. **Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural**. Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, 2012. v. 33, n. 1, p. 73-82.

DONAIRE, P. P. R. **Tratamento de Água Subterrânea Contaminada com BTEX Utilizando Fotocatálise Heterogênea**. Dissertação (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007. Disponível em: <<http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtls000430542.pdf>>. Acesso em: 12 de agosto de 2017.

ENRIQUE, J. B.; VIEIRA, I.; TORRE, M. H. **Vibration spectra of the Cu complexes of asparagine and glutamine**. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 66, p. 114-117, 2007.

FAUST, B. **Modern Chemical Techniques: An Essential Reference for Students and Teachers**. 1997. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/ebook/978-1-87034-319-0>>. Acesso em: 01 de janeiro de 2018.

FOGHT J, **Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects**. J Mol Microbiol Biotechnol 15:93–120, (2008).

GARCIA, V. H. V.; RIBEIRO, M. V. F.; CHINELATTO, M. A.; GREGO JR, P. C. **Verificação da Aplicabilidade de Tecido de Balões de Ar Quente e Paraquedas em Balões Atmosféricos Superpressurizados**. Conem, 2012.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. **Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos**. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, n. 34, p. 26-46. 2005 Disponível em: <<http://www1.esb.ucp.pt/twt/olimpiadasbio07/MyFiles/MyAutoSiteFiles/FontesInformacao253906202/samorais/Biorremediacao.pdf>>. Acesso em: 27 de agosto de 2017.

GONZAGA, L.V., **Surfactina desidratada como agente potencializador da biorremediação de solos contaminados com petróleo**. – Viçosa, MG, 2013.

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

HARMS, G.; ZENGLER, K.; RABUS, R.; AECKERSBERG, F.; MINZ, D.; ROSSELLO-MORA, R.; WIDDEL, F. **Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria.** Appl Environ Microbiol 65:999–1004, (1999).

HERCULANO, J. et al. **Biossíntese e propriedades de lipopeptídeos de Bacillus subtilis produzidos em meios de cultura alternativos.** 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). **Oil Market Report: World Oil Supply.** 2018. Disponível em: <<https://www.iea.org/OILMARKETREPORT/OMRPUBLIC/>>. Acesso em: 20 de setembro de 2018.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 37, n 4, p. 1192-1201, jul - ago, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v37n4/a49v37n4.pdf>>. Acesso em 21 de agosto de 2017.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. **Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.** *Ciência e Natura*, UFSM, v. 29, n. 1, p. 7-24, 2007.

JIAO, F. P. et al. **Synthesis and structural characterization of L-(-)-malic acid pillared layered double hydroxides.** Latin American Applied Research, v. 39, n. 2, p. 127-130, 2009.

JUNQUEIRA, P. G.; MOREIRA, C. A. **Estudo de Área Contaminada por Hidrocarboneto por Aplicação do Método Polarização Induzida.** XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS. 2016. Campinas, SP.

KANG, S. W.; KIM, Y. B.; SHIN, J. D.; KIM, E. K. **Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid.** Appl Biochem Biotechnol, n. 160, v. 3, p. 780-790, 2010.

KANNAN, S. **FT-IR and EDS analysis of the seaweeds *Sargassum wightii* (brown algae) and *Gracilaria corticata* (red algae)**. J Curr Microbiol Appl Sci, n. 3, p. 341-351, 2014.

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

LIMA, S. D.; OLIVEIRA, A. F.; GOLIN, R.; CAIXETA, D. S.; LIMA, Z. M.; MORAIS, E. B., **Gerenciamento de áreas contaminadas por postos de combustíveis em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil**, Revista Ambient. Água vol. 12 n. 2 Taubaté – Mar. / Apr. 2017.

LIMA, V. E. **Eletrosmose Aplicada à Remediação de Solos Contaminados com Derivados da Indústria de Petróleo**. Dissertação (Doutorado em Engenharia) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos. Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2005. Disponível em: <http://www.prodep.cct.ufcg.edu.br/teses/Veronica_EL_2005.pdf>. Acesso em: 19 de agosto de 2017.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. **Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production**. AMB Express, v. 1, 2011.

MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação** – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

MAZZUCO, M. L. **Atenuação Natural de Hidrocarbonetos Aromáticos em Aquíferos Contaminados com Óleo Diesel**. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004. Disponível em: <http://rema.ufsc.br/wp-content/uploads/2014/10/2005_disserta%C3%A7%C3%A3o_lilian_maria_mazzuco.pdf>. Acesso em 12 de agosto de 2017.

MORAIS, E. B.; TORNISIELO, S. M. T.; KATAOKA, A. P. A. G.; **Biodegradação de Resíduos Oleosos Provenientes de Refinaria de Petróleo Através do Sistema de Biopilhas**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Microbiologia Aplicada, 2005.

MIHALY, J.; STERKEL, S.; ORTNER, H. M.; KOCSIS, L.; HAJBA, L.; FURDYGA, L.; JANOS, M. **FTIR and FT-Raman Spectroscopic Study on Polymer Based High Pressure Digestion Vessels**. Croat. Chem. Acta. 79(3): 497-501, 2006.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. **Towards commercial production of microbial surfactants**. Trends Biotechnol., n. 24, p. 509-515, 2006.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. **Enhanced production of biosurfactant by a marine bacterium on statistical screening of nutritional parameters**. Bio Eng J., n. 42, p. 254-260, 2008.

MULLIGAN, C. N. **Recent advances in the environmental applications of biosurfactants**. Cur Opin Coll Inter Sci. n. 14, p. 372-378, 2009.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. **Biossurfactantes: propriedades e aplicações**. Quim. Nova, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. **Optimization and characterization of biosurfactant production by Bacillus subtilis isolates towards microbial enhanced oil recovery applications**. Fuel, n. 111, p. 259-268, 2013.

QASIM, M., ANSARI, T. M. e HUSSAIN, M. **Combustion, Performance, and Emission Evaluation of a Diesel Engine with Biodiesel Like Fuel Blends Derived From a Mixture of Pakistani Waste Canola and Waste Transformer Oils**. Int journal of energies, pp1-16, 2017.

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

RANGEL, M. A. **Química Ambiental - Conceitos, Processos e Estudo dos Impactos ao Meio Ambiente.** NOWACKI, C. D. B.: Érica 2014.

RIBEIRO, D. L. R., VERAS, S.T.S., PACHECO FILHO, J. G. A., CAMPOS, G. M. e PALHA, M. de L. A. P. F. **Acompanhamento por espectroscopia de infravermelho (FTIR) da degradação do diesel e do biodiesel por pseudomonas aeruginosa.** Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014.

ROCHA, M. V. P.; BARRETO, R. V. G.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. **Evaluation of Cashew Apple Juice for Surfactin Production by Bacillus subtilis** LAMI008. Appl. Biochem. Biotechnol., 155, 63-75, 2009.

ROCHA, P.M., **Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melaço de cana como substrato.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2017.

ROSA, G. S. **Avaliação do Potencial de Espécies Vegetais na Fitorremediação de Solos Contaminados por Petróleo.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, 2006. Disponível em: <<http://www.peamb.eng.uerj.br/trabalhosconclusao/2006/PEAMB2006GSRosa.pdf>>. Acesso em: 19 de agosto de 2017.

RUPPENTHAL, J. E. **Toxicologia** – Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Técnico Industrial de Santa Maria; Rede e-Tec Brasil, 2013.

SÁNCHEZ-SOTO, M.; PAGÉS, P.; LACORTE, T.; BRICEÑO, K.; CARRASCO, F. **Curing FTIR study and mechanical characterization of glass bead filled trifunctional epoxy composites.** Composites Science and Technology, 67, p.1974-1985, 2007.

SANTOS, L. G. dos. **Utilização de Consórcio Bacteriano para Biodegradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em Solo**. Dissertação (Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/254773/1/Santos_LigiaGibini_dos_M.pdf>. Acesso em: 27 de agosto de 2017.

SÃO PAULO. Decreto de Lei do Estado de São Paulo nº 50.263/2013. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/wp-content/uploads/sites/17/2013/11/decreto-59-263-05062013.pdf>>. Acesso em: 17 de abril de 2019.

Sigma-Aldrich Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3523?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em 20 de setembro de 2018).

SILVA, L. J. **Processo de Landfarming para tratamento de resíduos oleosos. Dissertação** (Mestrado em Processos químicos e bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SILVA, I. S. **Biodegradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos utilizando Consórcios Microbianos visando a Biorremediação de Solos Contaminados**. Dissertação (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Departamento de Ciências de Alimentos. Universidade Estadual de Caminas, Campinas, 2007. Disponível em: <<http://biblioteca.posgraduacaoredentor.com.br/link/?id=2592175>>. Acesso em 20 de julho de 2017.

SOUZA, E.C., VESSONI-PENNA, T.C., DE SOUZA OLIVEIRA, R.P., **Biosurfactantenhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. Int. Biodeterior.** Biodegrad. 89, 88 e 94, 2014.

SWAPNA, T. H.; PAPATHOTI, N. K.; KHAN, M. Y.; REDDY, G.; HAMEEDA, B. **Bioreduction of CR (VI) by biosurfactant producing marine bacterium *Bacillus subtilis* SHB 13**. Journal of Scientific & Industrial Research, v. 75, p. 432-438, 2016.

TAVARES, S. R. L. **Remediação de Solos e áreas Contaminadas por Metais Pesados: Conceitos Básicos e Fundamentos**. Rio de Janeiro, RJ: 2013. 147 p.

TEIXEIRA, A. S. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial. 95 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre.

VARJANI, S.J., **Microbial degradation of petroleum hydrocarbons**. Bioresource Technology 223, 277–286. 2017

VARJANI, S.J., UPASANI, V.N., **Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: production, characterization and surface active properties of biosurfactant**. Bioresour. Technol. 221, 510 e 516., 2016.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. **A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 120, p. 71 - 83, 2017.

XIE, W.; LI, R.; LI, X.; LIU, P.; YANG, H.; WU, T.; ZHANG, Y. **Different responses to soil petroleum contamination in monocultured and mixed plant systems**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 161, p. 763 - 768, 2018.

YADAV, S. P. R., SARAVANAN, C. G., KANNAN, M. **Influence of injection timing on DI diesel engine characteristics fueled with waste transformer oil**. Alexandria Engineering Journal 54, 881 – 888, 2015.

YOSHIKAZU INOH, Y; KITAMOTO, D; HIRASHIMA, N; NAKANISHI.M, **Biosurfactants of MEL-A Increase Gene Transfection Mediated by Cationic Liposomes**. Biochemical and Biophysical Research Communications 289, 57 – 61, 2001.

WEELINK, S.A.B., EEKERT, M.H.A.V., STAM, A.J.M. **Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application**. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology., 2010.