



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**BIOENSAIOS COM BIOSSURFACTANTE PARA BIORREMEDIAÇÃO DE  
SEDIMENTO CONTAMINADO COM GASOLINA**

**GABRIEL DE FARIAS ARAUJO**

Rio de Janeiro  
2016

GABRIEL DE FARIAS ARAUJO

BIOENSAIOS COM BIODISSURFACTANTE PARA BIORREMEDIAÇÃO DE  
SEDIMENTO CONTAMINADO COM GASOLINA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Biociências da  
Universidade Federal do Estado do Rio de  
Janeiro como requisito para obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências Ambientais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Veríssimo Correia

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr. Natascha Krepsky

Rio de Janeiro  
2016

GABRIEL DE FARIAS ARAUJO

BIOENSAIOS COM BIODISSURFACTANTE PARA BIORREMEDIAÇÃO DE  
SEDIMENTO CONTAMINADO COM GASOLINA

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Biociências da  
Universidade Federal do Estado do Rio de  
Janeiro como requisito para obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências Ambientais.

Aprovado em 29 de junho de 2016.

---

(Prof.<sup>a</sup> Dr. Natascha Krepsky – UNIRIO)  
(ORIENTADORA)

---

(Prof. Dr. Fábio Veríssimo Correia - UNIRIO)  
(ORIENTADOR)

---

(Prof. Dr. Lazaro Luiz Mattos Laut - UNIRIO)

---

(Prof.<sup>a</sup> Dr. Maria Isabel de Almeida Rocha - UNIRIO)

---

(Prof.<sup>a</sup> Dr. Samira da Guia Mello Portugal - UNIRIO)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois, sem Ele eu não conseguiria ter chegado até aqui e não haveria o que estudar neste mundo.

À minha família, que me apoiou dando total suporte desde o início de tudo até o fim, com amor, doses de ânimo, consolo, recursos, sacrifícios, ótimas ideias e ajudas com estudos de disciplinas.

Aos queridos amigos, que foram importantíssimos desde o início com incentivo, bons momentos, grande generosidade, orações e suporte.

A meus professores e em especial a meus orientadores acadêmicos, Prof. Dr. Fábio Veríssimo e Prof.<sup>a</sup> Dr. Natascha Krepsky, por terem acreditado que este trabalho seria possível, por todo esforço, zelo ímpar, carinho e paciência.

À UNIRIO, pelo suporte com a bolsa de Iniciação Científica.

À FAPERJ e CNPq, pelo apoio financeiro concedido.

Aos professores Dr. Edwin Rojas, Dr. Eline Simões, Dr. Lazaro Laut e Dr. Samira Portugal, por gentilmente terem dado suporte aos experimentos deste trabalho.

À Deise Araujo, Vladimir Araujo (em memória), Benedicto Rosa, Leonardo de Farias, Viviane Araujo, Ilma Glória, Renato Landim, Renata Laura, William Diego, Diogo Prado, Franklin Santana, Thiago Dnardo, Thayane Moura, Luisa Lima, Amanda Bergh, Marcelo Duarte, Fernanda Silva, Patrícia Perez, Luiz Affonso, Iracema Prestes, Ana Luiza, Karine Peixoto, Ingrid Monteiro, Viviane Lino, Alessandra Sban, Clarissa Naveira, Patrícia Pereira, Roberta Valoura, Sidney Sales, Camila Figueiredo, à Edeilson Barbosa e a todos que participaram desta trajetória acadêmica.

## RESUMO

Vazamentos de derivados energéticos de petróleo de sistemas subterrâneos de armazenamento podem extravasar compostos BTEX para camadas superficiais dos perfis do solo e lençol freático. Biossurfactantes são substâncias anfifílicas que atuam nas interfaces de polaridades diferentes dos meios óleo-água, diminuindo a tensão superficial e promovendo a emulsificação do óleo em água. A biorremediação de áreas impactadas com derivados energéticos de petróleo, por ação de consórcio microbiano produtor de biossurfactante, seria uma alternativa viável e menos dispendiosa em relação a metodologias clássicas, como *pump and treat* e *soil washing*, que geralmente causam alterações no ambiente. O objetivo deste trabalho foi investigar a hipótese de que um consórcio microbiano isolado de manguezal impactado poderia ser utilizado em processo de biorremediação de sedimentos arenosos contaminados com gasolina. Para este propósito, foram propostas duas metodologias de bioensaio, em vidro e em aço inox. Os bioensaios consistiram na inoculação de consórcio microbiano isolado de mangue, produtor de biossurfactante, em sedimento arenoso contaminado com gasolina e disposto em colunas cilíndricas de vidro e aço inox. Um volume de água foi adicionado no sedimento para percolação da gasolina emulsificada pelo biossurfactante, sendo esta recuperação de gasolina medida por fluorimetria. Os resultados nas colunas de vidro mostraram uma recuperação de 14,07% de gasolina após inoculação do consórcio microbiano, 72% a mais que a média de seus controles negativos não inoculados. Nas colunas de aço inox foi observada recuperação de 0,23% de gasolina a partir da inoculação, 30% a mais que em seu controle negativo sem inoculação. O bioensaio em colunas de vidro foi o mais adequado à proposta de biorremediação e o uso do consórcio microbiano isolado de manguezal impactado foi confirmado como possível à biorremediação de sedimento arenoso impactado com gasolina.

Palavras-chave: Fluorimetria; Manejo de Sedimento Arenoso Contaminado; Bioaumentação.

## ABSTRACT

Leaks of fuel crude-oil-derived from underground storage systems can spill BTEX compounds to soil superficial layers and to water table. Biosurfactants are amphiphilic substances, which act in different polarity of oil-water interfaces, decreasing the surface tension and promoting the oil emulsification in water. The bioremediation of fuel crude-oil-derived impacted areas, through the action of a biosurfactant-producing microorganism consortium, could be a viable and less dispendious alternative than classic methodologies, like pump and treat and soil washing, those usually cause environment alterations. The purpose of this work was to investigate the hypothesis that an impacted mangrove-isolated microbial consortium could be used in a bioremediation process of gasoline-contaminated sand. In this propose, two bioassay methodologies were proposed, using a glass media and a stainless steel media. The bioassays consisted in the inoculation of a biosurfactant-producing mangrove-isolated microorganism in gasoline contaminated sand arranged in glass and stainless steel columns (sand-pack columns). A water volume was added to the sand-pack columns to promote the percolation of the emulsified gasoline, so this gasoline recuperation was measured by fluorimetry. The glass sand-pack columns results showed a gasoline recuperation of 14.07% after the inoculation of the microbial consortia, 72% more than the average of its negative non-inoculated controls. In the stainless steel sand-pack columns, a gasoline recuperation of 0.23% after the inoculation was observed, 30% more than its negative non-inoculated control. The glass sand-pack columns bioassay was the most suitable to the bioremediation proposal and the usage of the microbial consortia isolated from an impacted mangrove was confirmed as possible to be applied to bioremediation of gasoline impacted sand.

Key-words: Fluorimetry; Management of Contaminated Sand; Bioaugmentation.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Esquema da Metodologia Aplicada aos Bioensaios.	3
Figura 2: Valores de RFU (Relative Fluorescence Units) Referentes a Quantificação de Óleo de Cadeia Longa por Fluorimetria em Diferentes Alíquotas Amostrais.	11
Figura 3: Resultados de Fluorimetria em RFU (Relative Fluorescence Units) dos Percolados em Comparação com a Quantificação de Óleo de Cadeia Longa por Fluorimetria em Diferentes Alíquotas Amostrais.	14

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Porcentagens (%) de Gasolina Recuperada do Sedimento Contaminado; a) Bioensaio em Coluna de Vidro; b) Bioensaio em Coluna de Aço.	12
---	----

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>ABNT</b>	Associação Brasileira de Normas Técnicas
<b>ANP</b>	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
<b>BTEX</b>	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
<b>CETESB</b>	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional do Meio Ambiente
<b>DENATRAN</b>	Departamento Nacional de Trânsito
<b>GLP</b>	Gás Liquefeito de Petróleo
<b>IAD</b>	Índice Antidetonante (Índice de Octanagem)
<b>INEA</b>	Instituto Estadual do Ambiente
<b>Kg</b>	Massa em Quilograma
<b>MEOR</b>	Microbial Enhanced Oil Recovery
<b>mg</b>	Massa em Miligramas
<b>NBR</b>	Norma Brasileira
<b>PAH</b>	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>QAV</b>	Querosene de Aviação
<b>RFU</b>	Relative Fluorescence Units
<b>SASC</b>	Sistema de Armazenamento Subterrâneo de Combustíveis
<b>UV</b>	Ultra Violeta

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Contextualização Geral	1
1.2 Gasolina como contaminante ambiental	2
1.3 Técnicas de remediação ambiental	3
1.4 Biorremediação com biossurfactantes	3
1.5 Recuperação de Gasolina	4
1.6 Hipótese	5
1.7 Objetivo	5
2 MATERIAIS E METODOS	6
2.1 Quantificação da Gasolina por Fluorimetria	6
2.2 Execução dos Bioensaios	6
3 RESULTADOS	12
3.1 Quantificação da Gasolina por Fluorimetria	12
3.2 Execução dos Bioensaios	13
4 DISCUSSÃO	17
5 CONCLUSÃO	22
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Contextualização Geral

Com o aumento das necessidades energéticas das cidades atrelado à intensificação da utilização da matriz petrolífera nas últimas décadas, questões ambientais decorrentes de passivos gerados por vazamentos e derrames de combustíveis e lubrificantes têm sido um desafio às instituições ambientais e à sociedade como um todo (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2000). Segundo a ABNT NBR 13.786/09, uma região continental que apresente passivo de matriz petrolífera por conta de atividades em Sistemas de Armazenamento Subterrâneo de Combustíveis (SASC) pode ter sua área de abrangência toxicológica chegando a um raio de até 100 metros ou maior em caso de águas subterrâneas utilizadas para abastecimento público. Segundo a Resolução CONAMA 273/00, o derrame ou vazamento de compostos provenientes do SASC pode atingir desde as camadas superficiais do perfil do solo até as águas subterrâneas. A mesma resolução CONAMA afirma que todo sistema de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis é configurado como empreendimento potencialmente ou parcialmente poluidor e gerador de acidentes ambientais. Segundo dados do Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2015), produzido pela ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis), o Brasil contava com cerca de 40 mil postos revendedores de combustíveis automotivos em 2014, sendo o principal foco na Região Sudeste, apresentando cerca de 16 mil postos revendedores (mais de 6 mil à frente do segundo colocado, Região Nordeste). O INEA (Instituto Estadual do Meio Ambiente), em seu relatório Gerenciamento de áreas Contaminadas do Estado do Rio de Janeiro 2ªEd. (2014), afirma que o Estado do Rio de Janeiro contava com cerca de 130 localidades classificadas como área contaminada sob investigação e 95 como área contaminada sob intervenção. Neste mesmo relatório do INEA, das 270 localidades do Cadastro de Áreas Contaminadas e [ou] Reabilitadas, 56% (151 áreas) correspondem a atividades de postos de combustíveis, sendo enfatizada a relevância da contaminação ambiental por vazamentos de combustíveis em atividades de SASC.

## 1.2 Gasolina como Contaminante Ambiental

Dentre os derivados de petróleo energéticos (Gasolina, Gasolina de Aviação, GLP, Óleo Combustível, Óleo Diesel, QAV e Querosene Iluminante), segundo o anuário estatístico da ANP, o maior destaque no consumo nacional é atribuído ao Óleo Diesel (60 mil m<sup>3</sup> em 2014), seguido da gasolina (44 mil m<sup>3</sup> em 2014). Segundo dados do DENATRAN (Departamento Nacional de Trânsito), o Município do Rio de Janeiro contava em 2015 com uma frota de 120.865 veículos movidos a Diesel, enquanto que a frota dos veículos que poderiam se utilizar de Gasolina chegava a 2.303.448, enfatizando o maior número de ações de abastecimento de veículos movidos à Gasolina, em detrimento dos movidos à Diesel.

A Gasolina, uma vez extravasada de um SASC, contaminando o ambiente, pode oferecer perigo à saúde humana em vias toxicológicas como a ingestão de água subterrânea, inalação de vapores e partículas provenientes do solo superficial e/ou da água subterrânea, ingestão de solo, contato dérmico com solo e/ ou água, segundo o relatório CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) em 2006, denominada ACBR (Ações Corretivas Baseadas em Risco - Aplicadas a Áreas Contaminadas com Hidrocarbonetos Derivados de Petróleo e Outros Combustíveis Líquidos).

Segundo Soares (2011), os compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) estão entre os componentes da Gasolina e possuem maior solubilidade em água em relação aos PAH's (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos), presentes no Óleo Diesel. Em seu trabalho sobre áreas contaminadas e águas subterrâneas, Soares (2011) também afirma que, devido a maior solubilidade em água, os BTEX são os primeiros a atingir o lençol freático. Segundo estudos (IPCS, 1997; ATDSR, 2000; ATSDR, 2007a; ATSDR, 2007b; ATSDR, 2007c apud LEUSH e BARTKOW, 2010), a principal via de exposição aos BTEX é através da inalação, sendo o benzeno o composto de maior toxicidade, podendo causar morte nos casos de exposição a concentrações acima de 10.000 ppm e no caso de concentrações de 700.000 a 3.000.000 ppb, pode causar tumores, inconsciência e taquicardia. A exposição ao benzeno pela via de ingestão pode causar taquicardia, irritação do trato estomacal, coma e morte. Quanto ao tolueno, etilbenzeno e xileno, são prontamente absorvidos pelo organismo após inalação e entre suas consequências individuais conhecidas estão os efeitos nos rins, fígado, cérebro, sistema nervoso, ouvido interno e irritação do trato respiratório e olhos.

### 1.3 Técnicas de Remediação Ambiental

O emprego de modelos clássicos de remediação vem sendo comumente operado como resposta a casos de vazamento de SASC. Dentre estes modelos clássicos, são empregadas técnicas como *pump and treat* (bombeamento e tratamento de águas subterrâneas), *air sparging* (semelhante ao *pump and treat*, porém acrescido de injeção de ar para volatilização de contaminantes da água), *air stripping* (bombeamento de água subterrânea, transferindo seus compostos voláteis para o ar por meio de uma torre de aeração), *soil washing* (remediação por meio de escavação de solo contaminado e posterior tratamento com aditivos), *soil flushing* (contaminantes no subsolo movidos para determinada área por meio de injeção de “água de lavagem” para então serem removidos), entre outras (BARROS, et al., 2008; SANTOS, 2011; NETO; SANTOS; GOMES, 2000). No entanto, uma vez que estes modelos clássicos de remediação alteram o ambiente (pelo revolvimento de solo, alteração no nível do lençol e devido ao alto custo, cientistas vêm desenvolvendo alternativas viáveis e menos dispendiosas a partir dos estudos no campo da biorremediação. Conforme afirma Dias (2000) apud Oliveira (2008), “a biorremediação pode ser definida como um conjunto de tecnologias, que utilizam processo (s) biológico (s), aplicadas à recuperação ou remediação de áreas contaminadas, ou ao tratamento de compostos orgânicos voláteis tóxicos ou efluentes, contendo resíduos tóxicos”. Oliveira (2008) informa que a biorremediação pode ser compreendida em dois tipos de tratamento, *in situ* (ocorrendo no local contaminado) e *ex situ* (ocorrendo fora do local contaminado, geralmente em uma unidade de tratamento ou em laboratório). Oliveira (2008), citando Skipper (1999) e Sarkar et al. (2005), informa sobre as técnicas de biorremediação, como a bioaugmentação (introdução de microrganismos exógenos em um ambiente, obtidos a partir de ambiente contaminado ou de estoque) e a bioestimulação (otimização de condições como nutrientes, oxigênio e umidade, visando aumentar atividade da população microbiana existente naquele ambiente). Dentre as técnicas de biorremediação de áreas contaminadas com gasolina (e outros derivados energéticos de petróleo), estão as que fazem uso de biossurfactantes.

### 1.4 Biorremediação com Biossurfactantes

Segundo Banat (1995) apud Nitschke e Pastore (2002), Biossurfactantes (surfactantes naturais) são subprodutos metabólicos produzidos por microrganismos (bactérias, fungos e leveduras). Os biossurfactantes (compostos tensoativos) são moléculas

anfífilas (que contém uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica), que atuam em interfaces de polaridades diferentes dos meios água-óleo e ar-água, reduzindo a tensão superficial (MARTINS, 2008; GUDIÑA et al., 2013). Por este motivo os biossurfactantes são considerados de ampla aplicação por conta de suas propriedades de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade molhante, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (BANAT 1995 apud NITSHKE e PASTORE 2002). Assim, a interação destes compostos tensoativos com contaminantes hidrofóbicos, decorre em um aumento da solubilidade destes contaminantes em água, promovendo aumento da metabolização e da possibilidade de biodegradação do contaminante (RIZZO et al, 2006 apud CERQUEIRA 2007). Dessa forma, os biossurfactantes, viabilizam a biodegradação de frações de óleos de cadeia longa em cadeias menores (cadeias mais leves), reduzindo a viscosidade do óleo e beneficiando sua mobilidade do meio onde estaria agregado (GUDIÑA et al., 2013), beneficiando a recuperação desse óleo. Além disto, as moléculas de biossurfactante sintetizadas pelos microrganismos apresentam baixa toxicidade, alta degradabilidade, boa compatibilidade ambiental, alta capacidade de emulsão, alta seletividade, atividade específica a altas temperaturas, pH e salinidade, sendo, portanto, vantajosas em relação ao uso de surfactantes sintéticos como alternativa ambiental (KHOPADE, 2012; CERQUEIRA, 2007).

### **1.5 Recuperação de Gasolina**

No campo de estudos da biorremediação por meio de biossurfactantes, estão os estudos de técnicas laboratoriais de recuperação de óleo de sedimento contaminado. Em seu trabalho, Yan et al. (2012) aplicaram meio de cultura com crescimento de microrganismo produtor de biossurfactante (isolado de solo contaminado com petróleo) em tanques com *oily sludge* de refinaria, uma “lama oleosa” com sedimento, hidrocarbonetos de petróleo e metais pesados. A recuperação de óleo residual foi acima de 91,5% ao final de 72 horas de incubação. Ainda nesta área, o trabalho de Gudiña et al. (2013) apresentou uma técnica de simulação de MEOR (*Microbial Enhanced Oil Recovery*) em escala laboratorial. Gudiña et al. (2013) inocularam meio de cultura com crescimento de microrganismo (isolado de campo de petróleo) produtor de biossurfactante em colunas cilíndricas com sedimentos arenosos contaminados com amostras de óleo. A recuperação de óleo residual, após 14 dias de inoculação, foi de 6–25% para *heating oil* (combustível para aquecimento), 16–24% para *viscous paraffin*, 13–18% para *Arabian Light oil* e 15–17% para petróleo bruto. Desta forma, bioensaios com uso de

biossurfactantes para recuperação de óleo residual adsorvido a sedimentos seriam preponderantes no estudo de ações de biorremediação de áreas impactadas com derivados energéticos de petróleo, beneficiando “limpezas” de substratos contaminados.

## **1.6 Hipótese**

Visto o quadro apresentado de periculosidade operada por vazamentos de derivados energéticos de petróleo dos SASC, visando oferecer alternativas viáveis e menos dispendiosas em relação à metodologias de remediação ambiental clássicas apresentadas e expansão dos limites do conhecimento na área de bioensaios com uso de biossurfactantes, apresentamos a hipótese de que um consórcio microbiano isolado de uma região de manguezal impactado poderia ser utilizado no processo de biorremediação de sedimentos arenosos contaminados com gasolina, por meio da ação de biossurfactante.

## **1.7 Objetivo**

Comparar duas metodologias de bioensaio desenvolvidas para verificação da hipótese, e verificar a eficiência do biossurfactante produzido por consórcio microbiano no processo de biorremediação.

## 2 MATERIAIS E METODOS

A metodologia foi executada em duas etapas. A primeira etapa consistiu na quantificação da gasolina por fluorimetria e, a segunda, a execução dos bioensaios com sedimentos contaminados por gasolina.

### 2.1 QUANTIFICAÇÃO DA GASOLINA POR FLUORIMETRIA

Com o propósito da aferição de gasolina emulsificada em água ao final do processo de biorremediação, foram realizados testes de quantificação de gasolina por fluorimetria.

As medidas no fluorímetro *Turner Trilogy Laboratory Fluorimeter* (EUA) utilizando o módulo de óleo de cadeia longa foram realizadas em cubetas (2,0 mL), e expressas em RFU (*Relative Fluorescence Units*), no comprimento de onda de 365 nm e emissão na faixa entre 410 e 660 nm.

As intensidades de fluorescência foram verificadas para alíquotas de água destilada, gasolina comum, hexano, e em misturas de frações de gasolina:hexano em diferentes concentrações (15:85, 35:65, 50:50 % V/V). As medidas foram realizadas em três repetições, e os resultados finais apresentados são as médias e os desvios padrão das leituras. As intensidades de RFU encontradas nas alíquotas amostrais foram usadas como curva padrão para identificar a quantidade de gasolina presente na água oleosa percolada nos bioensaios.

### 2.2 EXECUÇÃO DOS BIOENSAIOS

#### 2.2.1 Amostra de Sedimentos

Foram adquiridas comercialmente amostras de areia quartzosa para simular depósitos de sedimentos inconsolidados não vegetados, comumente de granulometria grossa-fina (2-0,05 mm), que constituem os sedimentos de praias e rios, e se estendem desde a linha de baixa-mar até alguma feição geomorfológica.

No laboratório, as amostras de sedimentos foram submetidas à esterilização por calor úmido, em autoclave a 121° C, por 15 minutos. As espátulas utilizadas na preparação dos bioensaios também foram submetidas à esterilização. Os materiais de vidro, como Bécheres,

Bastão de Vidro e Colunas de Vidro, foram lavados com álcool 70 %, e esterilizados por luz UV em Fluxo Laminar (FUV 06, Grupo VECO, BRA) por 20 minutos.

### **2.2.2 Contaminante**

A gasolina comum (IAD = 87) foi utilizada como contaminante por ser a mais consumida no país e facilmente encontrada em qualquer posto de gasolina. Esta gasolina não recebe nenhum tipo de aditivo que contenha compostos à base de ferro ou metais pesados; sem corante, possuindo assim, a coloração natural das gasolinas (incolor a amarelada); teor de enxofre de 50 ppm; com adição de álcool etílico anidro apenas, conforme legislação vigente (Resolução ANP nº 40/ 2013).

Segundo o portal PETROBRAS (2015), na Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (FISPQ), a gasolina utilizada neste trabalho possui as seguintes concentrações (%):75-87 para gasolina; 18 – 27,5 (p/p) para álcool etílico anidrido combustível; e benzeno menor que 1,0 (p/p). Além disto, a gasolina comum apresenta densidade 0,73 – 0,77, parte volátil 100% (V/V), ponto de ebulição inicial e faixa de temperatura de ebulição maiores que 35°C e ponto de fulgor menor que - 43°C.

### **2.2.3 Contaminação dos Sedimentos**

Após esterilização, os sedimentos foram contaminados com gasolina dentro de um Fluxo Laminar (FUV 06, Grupo VECO, BRA). Os materiais foram cuidadosamente homogeneizados de forma que, independentemente da quantidade de sedimento utilizado nos diferentes bioensaios, fosse distribuído uma relação 4:1 entre sedimento e contaminante. Esta relação foi estabelecida em testes preliminares que determinaram a quantidade máxima de gasolina adsorvida no sedimento.

### **2.2.4 Preparação dos Bioensaios**

Para determinar a quantidade de gasolina percolada em colunas de sedimentos, foram executados dois tipos de metodologias, bioensaio em colunas de vidro e em colunas de aço inox. Os bioensaios foram realizados em triplicatas e acompanhados de controle negativo. Cada bioensaio consistiu primeiramente no preenchimento das colunas com sedimento contaminado com gasolina, seguido da adição de água na coluna para percolação da gasolina

não adsorvida às partículas do sedimento, inoculação da cultura microbiana produtora de biossurfactante para biorremediação e, finalmente, nova adição de água para percolação da gasolina emulsificada pelo biossurfactante. Os controles negativos (Branco 1) foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos acima, recebendo apenas o meio de cultura estéril sem inoculação microbiana. O bioensaio com coluna de vidro também foi acompanhado de um segundo controle negativo (Branco 2), semelhante ao branco 1 sem adição do meio de cultura. A Figura 1 apresenta um esquema da metodologia aplicada aos bioensaios.

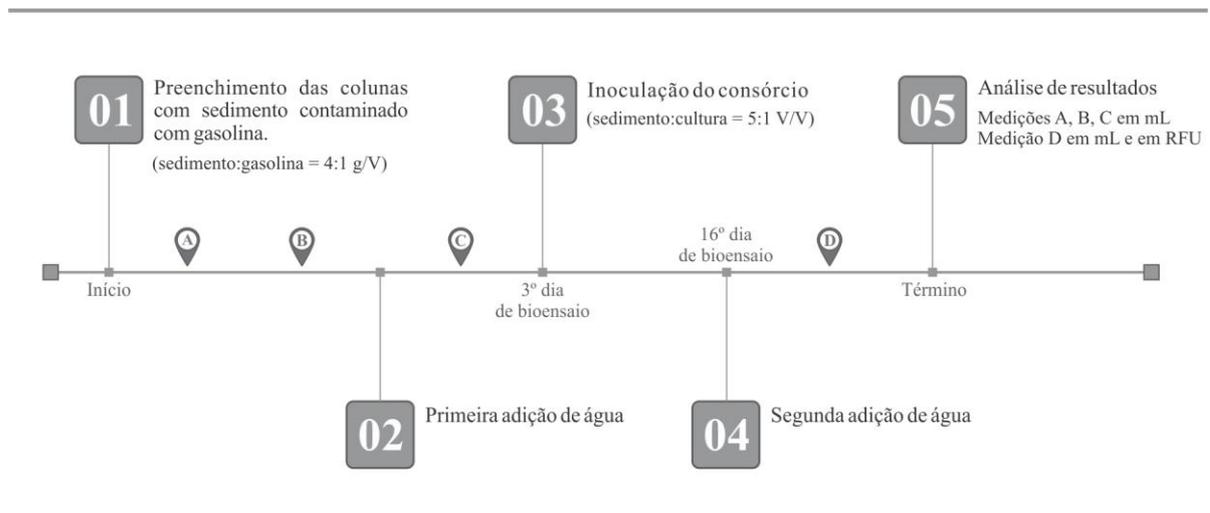


Figura 1: Esquema da metodologia aplicada aos bioensaios.

Legenda: 1, 2, 3, 4 e 5 – Fases de execução dos bioensaios; A, B, C e D – Medições da gasolina percolada do sedimento ao longo dos bioensaios; g – Massa em gramas; V – Volume em mL; RFU (*Relative Fluorescence Units*) – Medida utilizada para aferição da fluorimetria da fase hidrofóbica do percolado final.

### 2.2.5 Bioensaio em Colunas de Vidro

Cem gramas de sedimento arenoso contaminado com gasolina foram inseridos em colunas de vidro com as seguintes dimensões: 4,8 cm de diâmetro interno e 15 cm de comprimento na parte superior e 1 cm de diâmetro interno e 15 cm de comprimento na parte inferior das colunas. Para evitar a perda do sedimento, a ponta inferior da coluna foi

preenchida com lã de vidro. As colunas foram cuidadosamente preenchidas com o objetivo de evitar a formação de bolhas de ar no sedimento e mantidas em repouso por 10 minutos para percolação do excesso de gasolina. A gasolina percolada foi coletada em um frasco e seu volume aferido (Medição A). Após 24 horas de repouso, foi realizada a segunda medição de gasolina percolada (Medição B). O mesmo procedimento descrito acima foi executado para os controles negativos.

### **2.2.6 Bioensaio em Colunas de Aço Inox**

As colunas em aço inox com 15 cm de diâmetro interno e 36,5 cm de comprimento foram preenchidas com 2 kg de sedimento contaminado com gasolina. Para evitar a passagem do sedimento na extremidade inferior de cada coluna, foram fixadas seis telas de polietileno com malha de 2 mm, e acoplada à um funil. O conjunto “coluna-tela-funil” foi fixado com fita adesiva e amarras, sendo vedado com fita teflon e silicone. Após 10 minutos de repouso, a quantidade de gasolina excedente percolada através do sedimento foi medida (Medição A). Uma segunda medição foi realizada após 48h de repouso (Medição B). O mesmo procedimento descrito acima foi executado para os controles negativos.

### **2.2.7 Primeira Adição de Água nos Bioensaios**

Imediatamente após medição da gasolina excedente (Medição B) nos diferentes bioensaios, as colunas de sedimentos contaminados foram submetidas a adição de água, simulando a quantidade de chuva do Estado do Rio de Janeiro. O volume de água adicionada nas colunas foi determinado a partir de dados do portal SISTEMA ALERTA RIO (2015). Este portal indica que uma hora de chuvas fortes equivale a 50 mm/h (5 cm/h). Desta forma, foi calculado o volume de água de chuvas fortes em 5 cm de coluna, conforme a fórmula  $V_{ch}=(H).(A_b)$ , sendo  $V_{ch}$  o volume de água adicionada; H, a altura da parede da coluna correspondente a 1 h de chuvas fortes (5 cm) e  $A_b$  a área da base da coluna. Este procedimento foi realizado com o objetivo de promover a percolação da gasolina ainda presente entre as partículas do sedimento.

As colunas de vidro e de aço receberam, conforme suas áreas de base (18,86 cm<sup>2</sup> e 165,04 cm<sup>2</sup>), respectivamente 95 e 825 mL. A adição de água nas colunas foi realizada

por gotejamento sobre o sedimento. Após a passagem de água pelo o sedimento, foi medido o volume de gasolina no percolado resultante (Medição C).

### **2.2.8 Inoculação de Microrganismos Produtores de Biossurfactante**

Foram utilizados consórcios microbianos produtores de surfactante isolados a partir de sedimento de manguezal do Município de Magé, RJ (OLIVEIRA, 2015). Uma alíquota do consórcio (M4) foi inoculada em 200 mL de meio de cultura nutriente salgado contendo 30 g de NaCl, 3 g de extrato de carne, 5g de Peptona de carne e 1 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1M/L). Em seguida, este meio nutriente foi incubado a 37 °C por sete dias, quando recebeu 0,05 mL de petróleo API 28°, visando o estímulo da produção de biossurfactantes. A amostra foi incubada por mais dez dias, com o objetivo da produção de biossurfactante. Este consórcio foi utilizado no procedimento de biorremediação nos diferentes bioensaios com colunas conforme descrição abaixo.

As colunas com sedimento contaminado foram inoculadas com o meio de cultura com o crescimento microbiano do consórcio M4. A proporção do volume de consórcio inoculado em cada coluna foi de 5:1 (sedimento/cultura, V/V) a partir do volume ocupado pelo sedimento nas colunas. Desta forma, as colunas de vidro (80,17 mL) e de aço (1.320,32 mL) preenchidas com sedimento, foram acrescidas de 16 e 265 mL de meio de cultura, respectivamente. Após a inoculação, o sistema ficou em repouso por quatorze dias para a ação do consórcio sobre a gasolina no sedimento.

### **2.2.9 Segunda Adição de Água nos Bioensaios**

Quatorze dias após a inoculação, foi realizada nova adição de água nos bioensaios, conforme descrição da primeira adição de água, para promover a percolação da gasolina emulsificada pelo biossurfactante.

### **2.2.10 Extração de Gasolina da Amostra Aquosa**

Esta análise apresenta o resultado imediato das amostras oleosas após segunda adição de água nos bioensaios, através de extração com n-hexano em funil de separação (portal ufsc.br, 2015). As quantidades de hexano (mL) utilizadas na extração foram baseadas na adaptação dos experimentos de Urum et al (2003), que utilizou a proporção 2:1 do volume de

hexano em relação à massa total do sedimento. Neste trabalho foi utilizada a proporção 2:1 do volume de hexano em relação ao volume de gasolina remanescente no sedimento após Medição A.

O volume da fase hidrofóbica obtida na extração foi quantificado (Medição D) e, em seguida, a proporção gasolina:hexano foi verificada no fluorímetro (Turner Trilogy Laboratory Fluorimeter, EUA), conforme descrito anteriormente no método de quantificação de gasolina por fluorimetria.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 QUANTIFICAÇÃO DA GASOLINA POR FLUORIMETRIA

A Figura 2 apresenta os resultados da quantificação de óleo de cadeia longa por fluorimetria nas alíquotas de água destilada, gasolina comum, hexano, e em misturas de frações de gasolina e hexano. Os resultados demonstram que o aumento do índice RFU foi diretamente relacionado ao aumento da concentração de gasolina na mistura.

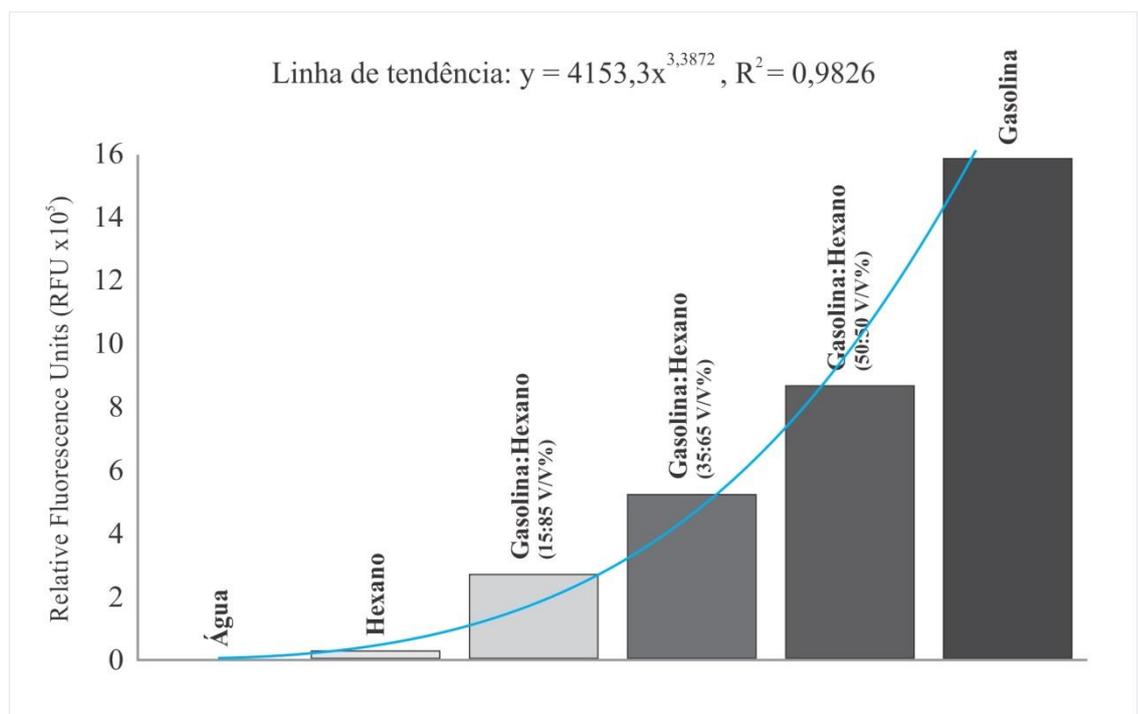


Figura 2: Valores de RFU (*Relative Fluorescence Units*) referentes à quantificação de óleo de cadeia longa por fluorimetria em diferentes alíquotas amostrais.

Estes resultados apresentaram um padrão de distribuição de aumento ajustado a uma linha de tendência de uma equação potencial ( $R^2 = 0,98$ ), significando que o aumento da quantidade de gasolina nas amostras reflete no aumento potencial dos índices de RFU.

### 3.2 EXECUÇÃO DOS BIOENSAIOS

As porcentagens de gasolina recuperada nas quatro medições durante a execução dos dois diferentes bioensaios são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Porcentagens (%) de Gasolina Recuperada do Sedimento Contaminado; a) Bioensaio em coluna de vidro; b) Bioensaio em coluna de aço.

<b>a) Coluna de vidro</b>			
	Branco 1 (n=1)	Branco 2 (n=3)	Biovidro (n=3)
Medição A	8,40	2,29 ±0,54	9,47 ±4,39
Medição B	8,00	2,57 ±0,50	9,73 ±4,64
Medição C	4,80	2,80 ±1,75	4,80 ±0,80
Medição D	7,02	0,84 ±0,89	14,07 ±11,94
Total C+D	11,82	3,64	18,87

<b>b) Coluna de aço inox</b>		
	Branco 1 (n=1)	Bioaço (n=3)
Medição A	13,00	20,67 ±5,77
Medição B	9,20	11,27 ±4,11
Medição C	7,80	10,13 ±3,64
Medição D	0,16	0,23 ±0,08
Total C+D	7,96	10,36

Legenda: Biovidro – Amostras inoculadas das colunas de vidro; Bioaço – Amostras inoculadas das colunas de aço inox; Medição A – Quantidade de gasolina percolada após preenchimento das colunas com sedimento contaminado; Medição B – Quantidade acumulada de gasolina percolada antes da primeira adição de água; Medição C – Quantidade acumulada de gasolina percolada após primeira adição de água; Medição D – Quantidade de gasolina percolada após segunda adição de água e extração da gasolina emulsificada; Branco 1 – Bioensaio com adição de meio de cultura estéril; Branco 2 – Bioensaio sem adição de meio de cultura; Total C+D – Somatório entre Medição C e Medição D.

Os valores de gasolina recuperada na medição A do bioensaio em colunas de vidro foram semelhantes nos percolados do Branco 1 e no Biovidro, e maiores que os valores obtidos no Branco 2. Com exceção do Branco 1, na Medição B foi observado aumento nos valores de gasolina percolada em relação à medição A, de 2,29% para 2,57% no Branco 2 e, no Bioensaio, de 9,47% para 9,73%. Na medição C, com exceção do Branco 2, que apresentou um pequeno aumento (2,29, 2,57 e 2,80% respectivamente nas medições A, B e C), foram verificados menores valores de gasolina recuperada, no Branco 1 e no Biovidro, em relação às medições A e B. Na medição D, os resultados das amostras de Biovidro apresentam

maior recuperação de gasolina em relação aos controles negativos, Branco 1 e Branco 2. Comparando os resultados do Branco 2 com demais resultados (Branco 1 e Biovidro), podemos observar valores até 94,03% menores de gasolina recuperada. Esta diferença do Branco 2 foi observada em todas as medições.

Nos percolados das colunas de aço inox, foi observada diferença entre os valores da Medição (A), sendo Branco 1 (13%) e Bioaço (20,67%). Na Medição B houve uma redução na gasolina recuperada em reação à medição A, tanto no Branco 1 quanto no Bioaço. Nas medições B e C os valores observados nas amostras do Branco 1 como no Bioaço, e entre eles, são considerados iguais. A medição D apresentou valores menores que a Medição C, valores estes considerados como zero para ambos os tratamentos Branco 1 e Bioaço.

Comparando resultados dos dois diferentes bioensaios, podemos observar que as colunas de aço inox apresentaram valores iniciais na recuperação de gasolina maiores que os das colunas de vidro. Estes valores nas colunas de aço variaram de 20,67% na Medição A até 0,23% na Medição D, de forma decrescente. As colunas de vidro apresentaram valores constantes, iniciando em 9,47% na Medição A e terminando com 14,07% na Medição D. Este comportamento também é observado ao compararmos os resultados das amostras do Branco 1 nos dois bioensaios.

Nas Medições D, a média entre os resultados de todas as amostras das colunas de vidro (7,32%) foi 97,33% maior que a gasolina recuperada na média entre os resultados de todas as amostras das colunas aço inox (0,2%). Ainda na Medição D, a média entre os resultados de Biovidro e Bioaço (7,15%) foi 62,61% maior que a média entre os resultados dos controles negativos dos dois bioensaios (2,67%). Os resultados das amostras de Biovidro e Bioaço indicaram maiores valores de recuperação de gasolina em relação aos controles negativos, tanto para colunas de vidro, quanto para de aço, representando respectivamente 72 e 30% a mais de recuperação.

O total de gasolina recuperada no final dos bioensaios foi superior para as colunas de vidro em relação às de aço inox, representando respectivamente 18,87 e 10,36% da gasolina inicialmente adicionada ao sedimento contaminado. Além disto, foi observado que nas colunas de vidro e de aço inox, as amostras dos Bioensaios inoculados (Biovidro e Bioaço) apresentaram maior recuperação de gasolina em relação a seus controles negativos, sendo

respectivamente em média, 11,14% e 2,41% a mais que nos controles negativos. O total de gasolina perdida durante o processo, isto é, remanescente no sedimento e/ou volatilizada, em comparação com a adicionada na contaminação foi de 88,18, 96,36 e 81,13% para o bioensaio com colunas de vidro (Branco 1, Branco 2 e Biovidro, respectivamente). Os dados de gasolina não recuperada durante o processo para bioensaio com colunas de aço inox foi de 92,04 e 89,64% para Branco 1 e Bioaço respectivamente.

### 3.2.1 Resultados de Fluorimetria do Percolado Final (Medição D)

As medições de fluorimetria do percolado seguem apresentadas na Figura 3, associados aos valores das alíquotas amostrais com diferentes valores de gradientes de concentração gasolina:hexano. Os resultados foram dispostos do menor ao maior índice de RFU.

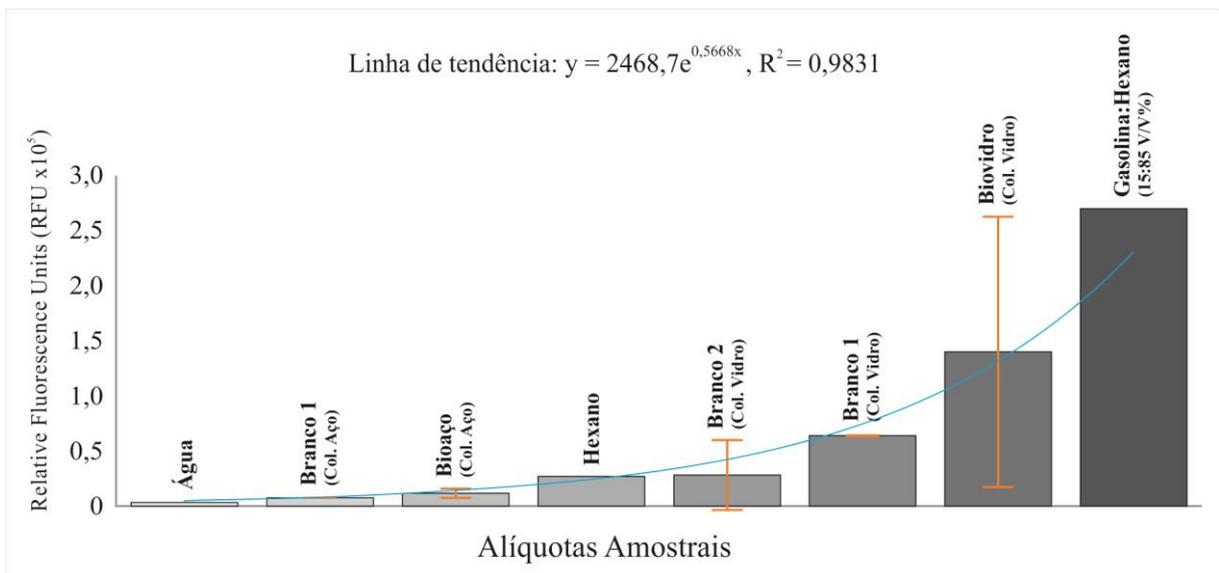


Figura 3: Resultados de fluorimetria em RFU (*Relative Fluorescence Units*) dos percolados em comparação com a quantificação de óleo de cadeia longa por fluorimetria em diferentes alíquotas amostrais.

Para o bioensaio em colunas de vidro, os valores de fluorimetria em RFU se encontram entre os valores do hexano puro e da mistura de gasolina e hexano (15:85 V/V).

Estes índices representaram volumes de gasolina de 1,75, 0,21 e 3,52 mL na fase hidrofóbica resultante da extração nos percolados do Branco 1, Branco 2 e Biovidro, respectivamente. Para o bioensaio em colunas de aço, estes dados apresentaram índices de RFU entre a fluorimetria da água e a do hexano puro, representando 0,78 e 1,14 mL de gasolina presente na fase hidrofóbica resultante da extração no Branco 1 e Bioaço, respectivamente.

A fase hidrofóbica resultante da extração nos bioensaios em colunas de vidro e de aço respectivamente, apresentaram 72 e 31 % a mais de gasolina em relação a seus controles negativos. Os resultados das amostras de Biovidro para fase hidrofóbica resultante da extração foram 67% maiores que os encontrados em colunas de Bioaço.

## 4 DISCUSSÃO

A fluorimetria se mostrou um método adequado para a quantificação da gasolina, uma vez que apresentou resultados de RFU proporcionais ao aumento da concentração de gasolina na cubeta, sinalizando uma tendência de aumento potencial (Figura 3).

Comparando o desempenho das duas metodologias de bioensaios empregadas, foi observado que as colunas de vidro apresentaram maior tempo para percolação de água (24 horas) que as colunas de aço inox (20 minutos). A diferença significativa no tempo necessário para passagem da água adicionada pode ser explicada possivelmente por conta da quantidade e disposição da lã de vidro nas colunas. A lã de vidro associada às partículas mais finas do sedimento nas colunas estaria dificultando a passagem da água. Além disto, a média dos valores da Medição A nas colunas de aço inox foi 60,08% maior que a média destes valores nas colunas de vidro, indicando uma vantagem no sistema de retenção de sedimento com telas em relação ao com lã de vidro quanto à livre percolação de líquido. Em contraponto, por oferecer maior tempo de retenção de líquido, as amostras de Biovidro podem ter sido beneficiadas no tocante à biorremediação, uma vez que o meio de cultura com inóculo permaneceu mais tempo em contato com o sedimento quando comparado às colunas de aço inox.

Os menores valores de recuperação de gasolina observados no Branco 2 em relação às demais amostras nas colunas de vidro ocorreu possivelmente pelas dificuldades na passagem de líquido através da lã de vidro como descrito acima; como também, por esta amostra de controle negativo não receber adição de meio de cultura. A adição do meio de cultura sobre a coluna aumenta a pressão sobre o material subjacente, beneficiando assim a percolação de gasolina ainda presente nos sedimentos após a primeira adição de água.

Uma vez que as medições A, B e C nos frascos de captação foram cumulativas, os menores valores observados na Medição B em relação à Medição A, indicam a perda de gasolina por volatilização. De modo semelhante, na Medição C, os valores de recuperação de gasolina menores que os das medições A e B, indicam que a volatilização da gasolina foi superior a um possível volume remanescente de gasolina no sedimento, que teria sido percolado pela ação da água. A maior recuperação de gasolina na medição D foi de apenas

14,07% da gasolina adicionada na contaminação, sendo este dado possivelmente influenciado pela volatilização de gasolina durante os bioensaios.

A quantidade de água inserida nas colunas foi proporcional à área de captação de água de chuvas nas colunas dos dois bioensaios, 95 e 825 mL para colunas de vidro e aço inox respectivamente. Portanto, estes volumes de água adicionada não foram proporcionais às massas de sedimento utilizadas, 100 g e 2 kg nas colunas de vidro e aço inox respectivamente. Dessa forma, as colunas de vidro receberam maior volume de água (56,32%) em relação às colunas de aço inox quanto à massa de sedimento. Apesar deste fato, os resultados de recuperação total de gasolina foram próximos, exceto para Biovidro, que estaria indicando maiores valores de gasolina recuperada por conta da presença do biossurfactante no sedimento. Os resultados de Branco 2 seguiram diferenciados em relação às demais amostras, uma vez que apresentaram menores valores de recuperação de gasolina, possivelmente por problemas de percolação de líquido na lã de vidro, como já citado.

Diante da possibilidade que o resultado de RFU nas Medições D estivessem sendo alterados pelo volume de hexano conforme as proporções baseadas no trabalho de Urum (2013), foram feitas pequenas modificações. Na extração da gasolina dos percolados das colunas de aço inox foi utilizada a proporção 1:1 (gasolina:hexano), baseada no volume de gasolina remanescente após a taxa de volatilização observada entre as medições A e B. Nas amostras de Branco 2 foi utilizada a proporção 1:0,6 (gasolina:hexano), baseada na gasolina restante no sedimento a partir da Medição A. Mesmo com as diferentes proporções de gasolina:hexano adotadas, os valores em RFU continuaram próximos do hexano puro, indicando que os resultados correspondiam a pequenas porcentagens de gasolina recuperada e não ao volume de hexano adicionado na extração, influenciando na medição. Os cálculos em mL da gasolina presente na Medição D levaram em consideração a quantidade de hexano adicionado na extração.

Com exceção do branco 2, que apresentou valores de 18,21%, as taxas de volatilização de gasolina, calculadas entre as medições A e C, apresentam valores semelhantes, uma vez que as perdas foram de 42,86 e 49,31 % para Branco 1 e o Biovidro nas colunas e vidro respectivamente. Nas colunas de aço, o Bioensaio (Bioaço) também apresentou perdas próximas a 45,48%; e um pouco menores no branco 1 (29,23%). Deste modo, as taxas de volatilização nos dois bioensaios foram equiparadas nos três primeiros dias

de início de experimento. No entanto, a verificação de um menor valor de gasolina recuperada nas amostras de Bioaço em relação às de Biovidro (0,23 e 14,07%, respectivamente) na Medição D, pode indicar uma maior volatilização de gasolina nas colunas de aço inox ao longo dos dezesseis dias de experimento. Esta perda de gasolina por volatilização pode ter sido favorecida pela maior superfície de contato da gasolina com o ar atmosférico nas colunas de aço inox. Este efeito também pode ter sido favorecido nos frascos de captação utilizados, sendo estes, Bécheres com capacidade para 1000 mL nas colunas de aço e Erlenmeyers com capacidade para 250 e 500 mL para as colunas de vidro. Os resultados de recuperação total de gasolina, ainda menores nas colunas de aço inox (9,16%, média entre Branco 1 e Bioaço) em relação às de vidro (15,35%, média entre Branco 1 e Biovidro), também sugerem a vulnerabilidade de um método em relação ao outro.

A possível influência do meio de cultura na percolação de gasolina não pôde ser descartada, uma vez que os valores da Medição D para Branco 2 foram 69,20% menores que para Branco 1 na coluna de vidro.

Nos resultados de fluorimetria da fase hidrofóbica extraída dos percolados das colunas de aço inox, foram observados valores entre o parâmetro indicado para hexano puro e a água destilada. Estes dados podem indicar que os volumes de gasolina recuperada na Medição D para as colunas de aço inox foi ainda menor que o apresentado, 0,78 e 1,14 mL de gasolina recuperada, respectivamente para Branco 1 e Bioensaio. Estes valores indicados na fluorimetria podem, portanto, se tratar da medição de outros elementos presentes na fase hidrofóbica extraída, possivelmente provenientes do meio de cultura. Isto pode significar que toda a gasolina havia sido volatilizada do frasco de captação na Medição D.

Os valores da Medição D para Branco 1 (7,02%), Branco 2 (0,84%) e Biovidro (14,07%) nas colunas de vidro, representam uma diferença mínima de 50,11% de recuperação de gasolina entre amostra inoculada e controle negativo (Branco 1). Esta diferença indicaria a biorremediação ocorrida na amostra de Biovidro a partir da presença de biossurfactante. Esta biorremediação pelo biossurfactante corroboraram com os trabalhos de Yan et al. (2012) e Gudiña et al. (2013). Yan et al. (2012) obtiveram resultados de recuperação de óleo residual acima de 91,5% ao final de 72 horas de incubação de *P. aeruginosa* (F-2) em *oily sludge*, isolada de solo contaminado com petróleo; e Gudiña et al. (2013) obtiveram resultados de recuperação de óleo residual de 6–25% para *heating oil* (combustível para aquecimento), 16–

24% para *viscous paraffin*, 13–18% para *Arabian Light oil* e 15–17% para petróleo bruto. Estes resultados de Gudiña et al. (2013) foram observados após 14 dias de inoculação de três cepas de *B. subtilis* em sedimento arenoso, isoladas de amostras obtidas em campos de petróleo à profundidade de 300-400 m. Desta forma, foi considerado que o biossurfactante adicionado nos bioensaios deste trabalho pode ter aumentado a solubilidade da gasolina do sedimento, resultando na diferença entre os valores de gasolina recuperada na amostra de Biovidro e nos controles negativos. A escolha por substrato quimicamente inerte (sedimento arenoso) teria favorecido a manutenção das condições ideais do meio nutriente salgado testadas no trabalho de Oliveira (2015), beneficiando o estabelecimento do consórcio microbiano. No entanto, substratos de menor granulometria como silte e argila apresentariam maior retenção de gasolina, logo, maiores volumes de gasolina biodisponível à atuação do consórcio microbiano. Jorge (1999) afirma que solos argilosos são os de maior capacidade de retenção de contaminante e que sua maior quantidade de matéria orgânica contribui para a imobilização de compostos orgânicos. Os trabalhos de Blott et al. (2004) e Brito et al. (2006) citados por Tonini (2011) informam que solos com texturas mais finas tendem a agregar partículas de matéria orgânica e a apresentar maior quantidade de bactérias degradadoras aeróbias. Segundo Jorge (2011), o fator que maior influência na atividade microbiana abaixo da superfície é o tamanho das partículas. O trabalho de Vogel e Walter (2001) apud Hosokawa et al. (2009) indica que dentre os fatores que afetam a proliferação de microrganismos usados em bioaumentação estão a estrutura química e a concentração de poluentes, a biodisponibilidade do contaminante, o tamanho e a natureza da população microbiana e o ambiente físico. Dessa forma, são sugeridos experimentos futuros com outros substratos, como argila e silte, para melhor investigação da influência da granulometria na ação do consórcio microbiano sobre a gasolina.

A diferença entre as medições D para Biovidro (14,07%) e Bioaço (0,23%) indica uma volatilização maior nas colunas de aço inox em relação às de vidro. Martins et al. (2003) apud Fioravanti (2013) indicam que a volatilidade da gasolina, por sua constituição em compostos voláteis como os BTEX, diminui sua concentração no meio, afetando sua biodisponibilidade e, assim, dificultando sua assimilação por microrganismos. Desta forma, a escolha pelo uso de gasolina como contaminante pode ter influenciado negativamente na atuação do consórcio microbiano. Ferreira et al. (2009) apud Fioravanti (2013), afirmam que sendo a composição da gasolina formada por grande número de hidrocarbonetos voláteis, esta

é considerada como um dos derivados de petróleo mais tóxicos aos microrganismos. O uso de outros derivados de petróleo como o óleo diesel, poderia propiciar crescimento maior de microrganismos em relação ao uso de gasolina, uma vez que este possui maior massa específica, cadeias maiores e menor toxicidade em relação gasolina, conforme indicado por Mariano (2006) apud Fioravanti (2013). A biorremediação por meio da biodegradação de gasolina não pôde ser confirmada neste trabalho, uma vez que esta atuação do consórcio microbiano seria indicada por valores menores de recuperação de gasolina nas amostras inoculadas em relação aos controles negativos.

Considerando que o maior valor total de recuperação de gasolina dentre todos os bioensaios foi 18,87% da adicionada na contaminação, é inferido que um volume de gasolina não recuperado teria permanecido retido no sedimento ou volatilizado, corroborando com o odor característico ao final dos bioensaios. Por este motivo, novos experimentos devem ser realizados para responder à hipótese apresentada, visando investigar se os 81,13% de gasolina não recuperada se deve à questões de ação do consórcio microbiano, à volatilização ou retenção da gasolina no sedimento. Para estes experimentos futuros ficam sugeridos a utilização de biossurfactante isolado do consórcio microbiano, sucessivas ações de inserção de meio de cultura nutriente, uso de derivado energético de petróleo menos tóxico aos microrganismos (como o óleo diesel) e uso de derivados energéticos de petróleo menos voláteis (como o querosene).

## 5 CONCLUSÃO

A fluorimetria se mostrou adequada quanto à quantificação de gasolina. O bioensaio em colunas de vidro foi o mais adequado à proposta de biorremediação de sedimento contaminado em relação às colunas de aço inox. Os valores de recuperação de gasolina foram considerados abaixo do esperado possivelmente devido a fatores como a volatilização da gasolina. Desta forma, é sugerida realização de bioensaios futuros com uso de contaminante menos volátil, como o querosene. Mesmo apresentando valores abaixo do esperado, o uso de consórcio microbiano isolado de manguezal impactado foi confirmado como possível na biorremediação de sedimento arenoso contaminado com gasolina por meio da ação de biossurfactante.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP), Resolução ANP nº40/2013, outubro de 2013;

ANP. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo e do Gás Natural, 2015. Rio de Janeiro, 2015. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Posto de serviço — Seleção dos equipamentos para sistemas para instalações subterrâneas de combustíveis. NBR 13786/09. Rio de Janeiro, 2009.

BARROS, D. et al.; Caracterização ambiental dos postos de revenda de Combustíveis no Rio de Janeiro. XV Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas. Natal – RN, 2008.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 273, de 29 de novembro de 2000. Estabelece diretrizes para o licenciamento ambiental de postos de combustíveis e serviços e dispõe sobre a prevenção e controle da poluição.

CERQUEIRA, V. S. Produção de biossurfactante e lipase por *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido e avaliação da biorremediação em derrames de óleos e derivados. Fundação Universidade Federal Do Rio Grande Departamento De Química. Rio Grande – RS, 2007.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. Ações corretivas baseadas em risco (ACBR) aplicadas a áreas Contaminadas com hidrocarbonetos derivados de petróleo e outros combustíveis líquidos – procedimentos. Anexo vii, a que se refere o artigo 1º, inciso VII, da Decisão de Diretoria nº 010/2006/C. São Paulo, 2006.

DENATRAN. Departamento Nacional de Trânsito. Quantidade de Veículos por UF Município e Combustível – Abril de 2015. Brasília (DF). DENATRAN, 2016. Disponível em: < <http://www.denatran.gov.br/frota2015.htm>>. Acessado em 18 mai. 2016.

FIORAVANTI, K. L.; Seleção de Consórcios Microbianos de Sedimentos de Manguezais com Potencial de Degradação de Hidrocarbonetos de Petróleo. Universidade Federal da

Bahia- UFBA. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente). Salvador, 2013.

GUDIÑA, E. J. et al.; Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns. Elsevier B.V. Journal of Hazardous Materials 261 (2013), p. 106– 113. Portugal, 2013.

HOSOKAWA, R. et al.; Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. World Journal of Microbiology and Biotechnology. V. 25 (2009), p. 1519-1528. Japão, 2009. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/46093303\\_Autochthonous\\_bioaugmentation\\_and\\_its\\_possible\\_application\\_to\\_oil\\_spills\\_World\\_J\\_Microbiol\\_Biotechnol](https://www.researchgate.net/publication/46093303_Autochthonous_bioaugmentation_and_its_possible_application_to_oil_spills_World_J_Microbiol_Biotechnol) >. Acessado em jun. 2016.

INEA. Instituto Estadual do ambiente. Gerenciamento de áreas Contaminadas do Estado do Rio de Janeiro 2ªEd. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: < <http://www.inea.rj.gov.br/cs/groups/public/documents/document/zwew/mdy4/~edisp/inea0068530.pdf> >. Acessado em 18 mai. 2016.

JORGE, C. R. R.; Contaminação / Descontaminação de Solos com Gasolina – Influência das Características dos Solos. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto - FEUP. Dissertação (Doutorado em Ciências de Engenharia). Porto, 2011.

JORGE, C. R. R.; Solos Contaminados com Gasolina – Possíveis Soluções. Palestra apresentada no Seminário sobre “Descontaminação dos Solos e das Águas Subterrâneas” organizado pela APEMETA (Associação Portuguesa de Empresas de Tecnologias Ambientais) em Fevereiro de 1999. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/274380078\\_SOLOS\\_CONTAMINADOS\\_COM\\_GASOLINA\\_-\\_POSSIVEIS\\_SOLUCOES](https://www.researchgate.net/publication/274380078_SOLOS_CONTAMINADOS_COM_GASOLINA_-_POSSIVEIS_SOLUCOES) >. Acessado em jun. 2016.

KHOPADE, A. et al.; Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. Elsevier B.V. Desalination 285 (2012), p. 198–204. Índia, 2012.

LEUSCH, F.; BARTKOW, M.; A short primer on benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) in the environment and in hydraulic fracturing fluids. Griffith University. Smart Water Research Centre. Austrália, 2010.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Coprodução de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 8, p. 1942-1947, 2008.

NETO, F. A. O.; SANTOS, P. R. P.; GOMES, Z. L. G. C.; Considerações sobre tecnologias para remediação de solos e águas subterrâneas contaminadas e suas aplicações em pólos industriais na região metropolitana de Salvador e na antiga fábrica da COBRAC em Santo Amaro. Monografia: Escola Politécnica DEA / DEQ, Departamento de Hidráulica e Saneamento. Universidade Federal da Bahia. Bahia, 2000.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M.;. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 5, 772-776, 2002.

OLIVEIRA, P.; Produção de Biossurfactante e Biomassa por Consórcios Bacterianos Ambientais Submetidos a Diferentes Condições de Crescimento. Monografia: Instituto de Biociências. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2015.

OLIVEIRA, R. C. G.; OLIVEIRA, M. C. K.; Remoção de contaminantes tóxicos dos efluentes líquidos oriundos da atividade de produção de petróleo no mar. *Boletim Técnico PETROBRÁS*. V. 43 (2), p. 129-136, abr./jun. Rio de Janeiro, 2000.

OLIVEIRA, S. D.; Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos e Bioquímicos). Escola de Química. Rio de Janeiro, 2008.

PETROBRAS. Gasolina Comum – Ficha de Segurança. Disponível em: <[http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/produtos/automotivos/gasolina!/ut/p/c4/04\\_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hLf0N\\_P293QwP3YE9nAyNTD5egIEcnQ4MgQ\\_2CbEdFAGTIInk!/?PC\\_7\\_9O1ONKG10GSIC025HRRAB10F400000\\_WCM\\_CONTEXT=/wps/wcm/connect/Portal+de+Conteudo/Produtos/Automotivos/Gasolina/Gasolina+Comum/>](http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/produtos/automotivos/gasolina!/ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hLf0N_P293QwP3YE9nAyNTD5egIEcnQ4MgQ_2CbEdFAGTIInk!/?PC_7_9O1ONKG10GSIC025HRRAB10F400000_WCM_CONTEXT=/wps/wcm/connect/Portal+de+Conteudo/Produtos/Automotivos/Gasolina/Gasolina+Comum/>)>. Acessado em 2016.

SANTOS, H. A. P.; Recuperação da Amônia Removida por Processo de Air Stripping Aplicado ao Tratamento de Lixiviados de Aterro Sanitário: Estudo em Escala Piloto.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Florianópolis, SC, 2011.

SISTEMA ALERTA RIO DA PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO. Mapa de Chuvas. Disponível em: < [http://alertario.rio.rj.gov.br/?page\\_id=314](http://alertario.rio.rj.gov.br/?page_id=314)>. Acessado em 15 jul. 2015.

SOARES, M. S.; Áreas Contaminadas e Águas Subterrâneas na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Alto Tietê. Universidade de São Paulo - USP. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, 2011.

TONINI, R. M. C. W; Prospecção e Análise da Diversidade de Bactérias com Potencial Para a Degradação de Compostos de Petróleo no Sedimento de dois Manguezais do Estado do Rio de Janeiro. Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF. Dissertação (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais). Campos dos Goytacazes, 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC. Núcleo de Química Orgânica e Catálise – NUQUIOCAT. Extração com Solventes Reativos – Descontínua. Disponível em: < <http://nuquiocat.quimica.blumenau.ufsc.br/files/2015/03/EXPERIE%CC%82NCIA-3.pdf>>.

URUM, K. et al.; Optimum Conditions for Washing of Crude Oil-Contaminated Soil With Biosurfactant Solutions. Trans IChemE - Institution of Chemical Engineers, Vol 81, Part B. UK, 2003.

YAN, P. et al.; Oil recovery from refinery oily sludge using a rhamnolipid biosurfactant-producing *Pseudomonas*. Elsevier B.V. Bioresource Technology 116 (2012), p. 24–28. China, 2012.