



Enero 2018 - ISSN: 1988-7833

ESTUDO DE CASO - BIORREMEDIAÇÃO DE LATOSSOLOS CONTAMINADOS EM JOÃO MONLEVADE- MINAS GERAIS

Renan Saldanha Linhares¹

Lucas da Silva Paiva²

Marcos Lima Reis³

Adriano José de Barros⁴

Jaquelline Carla Valamiel de Oliveira e Silva⁵

Para citar este artículo puede utilizar el siguiente formato:

Renan Saldanha Linhares, Lucas da Silva Paiva, Marcos Lima Reis, Adriano José de Barros y Jaquelline Carla Valamiel de Oliveira e Silva (2018): "Estudo de caso - biorremediação de latossolos contaminados em João Monlevade- Minas Gerais", Revista Contribuciones a las Ciencias Sociales, (enero-marzo 2018). En línea:

<http://www.eumed.net/rev/ccss/2018/01/latossolos-contaminados.html>

RESUMO

Acidentes envolvendo petróleo e seus derivados vêm frequentemente sendo observado ao redor do mundo. A descontaminação ambiental pode ser obtida por várias técnicas, entre elas a biorremediação, que utiliza microrganismos que metabolizam os contaminantes. O objetivo do presente trabalho foi avaliar em latossolos contaminados, a autodepuração e também a eficácia de microrganismos presentes na água da caixa separadora de água e óleo (CSAO) de posto de combustível, na biorremediação. Foram realizados três experimentos, com 3kg de latossolo em cada, a fim de analisar a eficiência dos microrganismos na remoção de hidrocarbonetos no solo. No experimento 1 foi adicionado o latossolo + 250mL de óleo lubrificante + 750mL de água da CSAO; no Experimento 2 utilizou-se latossolo + 250mL de óleo e no Experimento 3, utilizou-se somente o solo *in natura*. Ao longo do estudo, os solos foram submetidos a análises químicas (pH, acidez total, K⁺ CTC, P e matéria orgânica) e microbiológicas (exame a fresco, isolamento dos microrganismos em meio TSA, contagem de UFC/g e coloração Gram). Após 75 dias foi possível observar que os solos contaminados com óleo lubrificante tornaram menos ácidos. Solos contaminados com óleos lubrificantes apresentaram maior quantidade de microrganismos. Os experimentos 1 e 2 apresentaram maior UFC/g dos latossolos. O Experimento 1 apresentou, na maior parte do estudo, menor quantidade de microrganismos em relação ao Experimento 2, o que pode ter sido resultado da competição entre os microrganismos do solo e os da água da CSAO. No experimento 1 e 2 foi observado redução da matéria orgânica, CTC e fósforo pelos microrganismos, demonstrando que o óleo lubrificante acrescentado nestes solos serviu como fonte de nutrientes e estímulo para crescimento microbiano. Por possuírem grande quantidade de microrganismos, os experimentos 1 e 2 apresentaram alta e similar eficiência da biorremediação. Entretanto, no experimento 1, no qual foi acrescentado microrganismos da CSAO, foi observado biodegradação de cadeias carbônicas mais complexas, gerando expectativa no uso destes seres em latossolos contaminados acidentalmente com óleos lubrificantes.

Palavras-chave: Bactérias; Petróleo; CSAO.

¹ Engenheiro Ambiental /UEMG-João Monlevade

² Engenheiro Ambiental /UEMG-João Monlevade

³ Especialista em Administração –Professor Introdução a Economia UEMG João Monlevade –E-mail: minu0102@hotmail.com

⁴ Doutorando Geografia e Tratamento de Informação Espacial (PUC Minas/BH) – Professor Geoprocessamento UEMG João Monlevade –E-mail: adrianojosedebarros@gmail.com

⁵ Professora - UEMG João Monlevade –E-mail: jackvalamiel@yahoo.com.br

ABSTRACT

Accidents involving oil and its derivatives have often been observed around the world. Environmental decontamination can be achieved by various techniques, including bioremediation, which uses microorganisms that metabolize contaminants. The objective of the present study was to evaluate the presence of contaminated latosols, the autodepuration and also the efficacy of microorganisms present in the water of the oil separator box (CSAO), in the bioremediation. Three experiments were carried out, with 3kg of latosol in each, in order to analyze the efficiency of the microorganisms in the removal of hydrocarbons in the soil. In experiment 1 was added the latosol + 250mL of lubricating oil + 750mL of water of the CSAO; in Experiment 2, latosol + 250mL of oil was used and in Experiment 3 only the in natura soil was used. Throughout the study, the soils were submitted to chemical analyzes (pH, total acidity, K + CTC, P and organic matter) and microbiological (fresh examination, isolation of microorganisms in TSA medium, UFC / g count and Gram staining). After 75 days it was possible to observe that the soils contaminated with lubricating oil became less acidic. Soils contaminated with lubricating oils presented higher amounts of microorganisms. Experiments 1 and 2 showed higher CFU / g of the oxisols. Experiment 1 presented, in the majority of the study, a smaller amount of microorganisms in relation to Experiment 2, which may have been the result of the competition between the soil microorganisms and the water of the CSAO. In the experiment 1 and 2, a reduction of organic matter, CTC and phosphorus by the microorganisms was observed, demonstrating that the lubricating oil added in these soils served as a source of nutrients and a stimulus for microbial growth. Due to their large number of microorganisms, experiments 1 and 2 showed high and similar efficiency of bioremediation. However, in experiment 1, in which CSAO microorganisms were added, biodegradation of more complex carbon chains was observed, generating expectation in the use of these beings in latosols accidentally contaminated with lubricating oils.

Keywords: Bacteria; Petroleum; CSAO

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da economia tornou-se crescente o uso de automóveis, equipamentos e máquinas. Estes necessitam de manutenções adequadas e periódicas no intuito de prolongar a sua vida útil. Para isso, são utilizados óleos lubrificantes, que têm como principal função diminuir o atrito em peças móveis e semimóveis, controlar a temperatura interna, dentre outras funções secundárias, como, por exemplo, limpar os componentes internos móveis e semimóveis e proteger contra a corrosão.

O aumento do consumo dos óleos lubrificantes elevou o número de casos de vazamentos destes derivados do petróleo que podem acontecer desde a exploração até a sua disposição final. Estes acidentes tornam o solo impróprio para uso, além de trazer sérios prejuízos para a flora e fauna local, inclusive para o Homem, já que possuem características carcinogênicas e mutagênicas.

Solos contaminados podem ser remediados por técnicas físicas, químicas e biológicas. A biorremediação, foco deste estudo, é um processo que utiliza organismos vivos, tais como, bactérias, fungos, plantas, algas verdes ou enzimas de microrganismos no intuito de reduzir ou remover os contaminantes no meio ambiente. Essa técnica é uma alternativa prática, de baixo custo, não necessita de mão de obra especializada, nem do uso de reagentes químicos que podem ser agressivos ao meio ambiente e aos seres vivos que vivem no solo. É fundamental que o processo de biorremediação dos solos contaminados com óleo lubrificante seja eficaz. Portanto, os organismos devem degradar este composto do solo, sem produzir produtos perigosos e sem haver a necessidade de tratamentos secundários.

Sendo assim, para o desenvolvimento deste trabalho foi realizada a caracterização e classificação do solo utilizando técnicas físicas e químicas. A população microbiana presente na caixa separadora de água e óleo (CSAO) de um posto de combustível, localizado no município de Bela Vista de Minas - MG foi também avaliada e quantificada. Os solos de dois experimentos foram contaminados com óleos lubrificantes automotivos e posteriormente, em um deles foram adicionados os microrganismos da CSAO. As concentrações dos microrganismos dos solos foram quantificadas em meio de cultura e a concentração do contaminante foi também quantificada em diferentes períodos a fim de verificar a eficácia da biorremediação nos solos contaminados.

1.1 O uso dos óleos lubrificantes

Em jogos olímpicos na Grécia antiga, em meados de 776 a.C, rolamentos das Bigas de corrida eram lubrificadas com gordura animal. Com o passar dos anos e com o surgimento da revolução industrial surgiu a necessidade da constante lubrificação das máquinas e equipamentos, no intuito de diminuir o atrito das partes móveis aumentando assim a sua vida útil.

Em 1859, fontes abundantes de petróleo foram descobertas nos EUA por Edwin Drake, um ex-maquinista de locomotiva que perfurou o primeiro poço de petróleo onde extraía 3.200 litros de petróleo por dia. Este foi um marco importante, pois a partir destas descobertas, o petróleo começou a ser utilizado como matéria-prima para a produção de lubrificantes, devido ao seu melhor desempenho e vida útil maior quando comparado a outras matérias primas (BOZZA, 2016).

Com a produção de novas máquinas, surgiu a necessidade de lubrificantes mais eficientes. Desta forma, óleos lubrificantes sintéticos começaram a ser produzidos em laboratórios a partir de óleos minerais. Posteriormente, óleos compostos começaram também a ser produzidos, a partir da adição de aditivos em óleos lubrificantes sintéticos e minerais que permitem esses óleos tenham longa vida e trabalhem em temperaturas muito baixas ou altas sem que percam suas propriedades físicas e químicas.

Segundo Camara, Peres e Christianni (2010) os óleos lubrificantes foram introduzidos nos motores de combustão interna e sistemas de transmissão de veículos e equipamentos semi-móveis com a finalidade de diminuir o atrito, através da formação de uma película que impede o contato direto entre as peças metálicas em movimento. Os lubrificantes possuem ainda outras finalidades, como: Refrigerar, limpar e manter limpo, proteger contra a corrosão e vedação da câmara de combustão.

1.2 Vazamentos de óleos lubrificantes no ambiente

A contaminação por óleos lubrificantes é um fato comum devido ao descarte incorreto e vazamento, principalmente em oficinas mecânicas (DEON et al., 2012). Estes vazamentos causam sérios impactos ambientais, além de demandar elevados custos para a remediação do ambiente poluído.

Como exemplos de acidentes, temos o caso da contaminação do solo com hidrocarbonetos em Santos Dumont, Minas Gerais. Estes contaminantes estavam em um tanque desativado desde 1998, que era pertencente a uma linha férrea, sobre responsabilidade do Instituto Federal Sudeste de Minas Gerais (IF Sudeste MG). Este vazamento ocasionou a contaminação de uma rede de distribuição de água, gerando reclamações dos consumidores, devido à alteração nos padrões organolépticos da água (G1 ZONA DA MATA, 2015).

Segundo Senkovski (2013) em 16 de julho de 2000, houve um vazamento de óleo da Petrobrás em Araucária. Mais de um milhão de galões (quatro milhões de litros) de óleo foram derramados na bacia do Rio Iguaçu, sendo o segundo mega acidente provocado pela empresa nesse mesmo ano. O acidente ocorreu quando óleo cru era transportado do terminal marítimo de São Francisco do Sul para a Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar), na cidade da região metropolitana de Curitiba. Treze anos após a contaminação a empresa foi obrigada a fazer a recuperação da flora do local afetado e o monitoramento da sanidade dos peixes, assim como ficou também obrigada a fazer o monitoramento contínuo da área até que seja comprovada a recuperação total da área.

1.3 Impactos ambientais causados pelo lançamento de hidrocarbonetos no solo

De acordo com a Lei Nº 12.305, que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos, os óleos lubrificantes são classificados com resíduos perigosos, que são aqueles que, em razão de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade, patogenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e mutagenicidade apresentam significativo risco à saúde pública ou à qualidade ambiental (BRASIL, 2010). Desta forma, medidas de controle devem ser tomadas durante o seu armazenamento, transporte, utilização e descarte para que sejam evitadas contaminações ambientais e consequentes impactos na saúde pública.

Durante a contaminação dos solos com petróleo e seus derivados ocorre a inserção de substâncias nestes locais, como por exemplo, o BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), compostos orgânicos voláteis (COV) totais e hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP).

Segundo Andrade, Augusto e Jardim (2010) os compostos HTP, BTEX e HPA são compostos com alta toxicidade, mobilidade e persistência ao meio ambiente. Logo após a ocorrência de chuvas, esses compostos podem ser carregados pela água, podendo infiltrar no solo, lixiviando até aquíferos, ou serem carregados pelo escoamento superficial em direção a curso da água, que mais tarde será utilizado como fonte de água potável para uma determinada população.

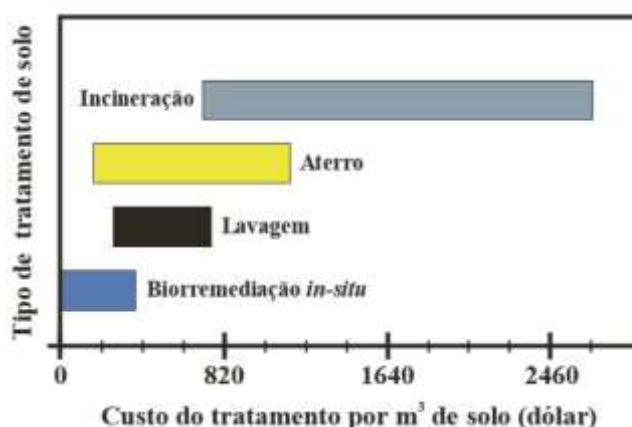
Essa situação pode gerar uma contaminação aguda ou crônica, dependendo da concentração do poluente, e ainda pode produzir gases devido aos compostos orgânicos voláteis, que se inalados podem causar prejuízo à saúde. Desse modo, contaminações ambientais com óleo merecem atenção, já que podem prejudicar tanto o meio ambiente como os seres vivos que vivem nele, incluindo o ser humano.

1.4 Técnicas de remediações de solos contaminados com hidrocarbonetos

Segundo Andrade, Augusto e Jardim (2010) as técnicas mais empregadas atualmente na remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos são a oxidação química *in-situ* (técnica química), atenuação natural (técnica biológica), biorremediação (técnica biológica) e a extração de vapores no solo (técnica física). A aplicação dessas técnicas depende de vários fatores, tais como: condições físicas, químicas e biológicas do local contaminado, concentração do contaminante e tempo requerido para a extração ou remediação do contaminante. A análise em conjunto destes fatores auxiliam na escolha da técnica que melhor se aplica para a situação em questão.

Essas técnicas variam de preço e aplicabilidade, tendo uma relação de custo total com o tempo necessário para a remediação da área. Sendo assim, quanto mais rápido for o processo de remediação maior será o custo total do investimento. Conforme mostrado na Figura 1, a incineração é a técnica mais cara, seguida do uso do aterro, lavagem e biorremediação.

Figura 1: Comparação de custos para diferentes técnicas de remediação



Fonte: Modificado de EPA por Andrade, Augusto e Jardim (2010).

Apesar da biorremediação apresentar o menor custo para tratamento do m³ de solo contaminado, a velocidade de remediação do solo é mais rápida na incineração, aterro e lavagem do solo. Entretanto, estes tipos de remediação são restritos, uma vez que seria muito difícil, por exemplo, a incineração de uma grande quantidade de solo que lançaria uma quantidade grande de contaminantes na atmosfera. Já o envio de solo para aterros reduziria muito rápido a vida útil destes e seria necessário a criação de aterros para resíduos classe I, onde o custo chega ao dobro dos aterros de classe II; e a lavagem, além de gastar uma grande quantidade de água, faz com que ela se torne contaminada após o processo.

1.4.1 Oxidação química *in-situ* (ISCO)

De acordo com Andrade (2016), a oxidação química *in-situ* (do inglês *In-Situ Chemical Oxidation* (ISCO)) consiste na aplicação de oxidante no solo, propiciando o contato destes com os contaminantes, utilizando o próprio solo como meio de degradação. O processo tem como objetivo a mineralização do contaminante, porém a degradação do contaminante apresenta a reações em diversas etapas, podendo formar compostos intermediários (ITRC, 2005).

A ISCO vem sendo explorada como alternativa principalmente devido ao curto tempo de remediação da área e pela não formação de resíduos (ITRC, 2005). Segundo Andrade (2016), essa técnica pode ser utilizada para uma ampla gama de contaminantes, tais como: BTEX, MtBE (Metil Terciário Butílico), hidrocarbonetos de petróleo, solventes clorados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e fenóis.

Porém, essa técnica não seria ideal para lugares que possuem solos porosos, uma vez essa porosidade garante a recarga de aquíferos, permitindo que a água percole lentamente por esses poros e seja filtrada até o lençol freático. Além disso, esta técnica pode aumentara chance do contaminante percolar mais rápido para o lençol freático, contaminando todo o lençol freático, aumentando assim a área de contaminação.

1.4.2 Atenuação natural

O termo “atenuação natural” tem sido empregado para descrever a remediação passiva de solo que envolve a ocorrência de diversos processos, de origens naturais, como a biodegradação, a volatilização, a dispersão, a diluição e a adsorção que ocorrem na sub superfície (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). Dentre estes, somente a biodegradação, facilitada por microrganismos, destrói fisicamente os contaminantes de interesse.

A atenuação natural ocorre principalmente devido ao processo de adaptação natural da microbiota nativa existente no solo, que passam a utilizar em seu metabolismo os compostos orgânicos poluentes como fonte de carbono, provocando assim a redução das concentrações dessas substâncias ao longo do tempo (Robb; Moyer, 2001).

A atenuação natural com monitoramento é vista como uma alternativa para áreas contaminadas com substâncias orgânicas biodegradáveis, nas condições naturais do meio (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010), uma vez que outras técnicas possuem elevados custos de aplicação. Todavia não é aconselhável sua utilização para áreas contaminadas por substâncias tóxicas, carcinogênicas, inflamáveis, patogênicas e corrosivas (Classe I) devido ao longo período necessário para a total remediação da área, colocando em risco a saúde e o bem-estar da população.

1.4.3 Extração de vapores no solo (SVE)

A extração de vapores no solo (do inglês *Soil Vapor Extraction*– SVE) baseia-se na aplicação de vácuo em pontos estratégicos do solo, a fim de conduzir o fluxo controlado de ar e, então, remover os contaminantes presentes no solo, sobretudo, nas regiões da superfície (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

Segundo Andrade, Augusto e Jardim (2010) a aplicação da SVE exige duas condições chaves: a primeira que o solo possua uma fase gasosa, ou seja, só é aplicável na zona não saturada do solo, que se encontra entre a superfície topográfica e o lençol freático (zona saturada); e a segunda condição é que os contaminantes devem ser capazes de mudarem de outras fases para a fase gasosa sobre a aplicação de vácuo, limitando assim essa técnica ao tratamento de compostos voláteis ou semivoláteis.

A técnica é muito limitada à camada do solo não saturado e possui alta eficiência apenas em solos com alta permeabilidade, o que torna a técnica inadequada para solos que possui em sua constituição altas concentrações de silte e argila.

1.5 Biorremediação

Sabe-se que existe uma dificuldade no tratamento de solos contaminados por óleos lubrificantes já que a matéria prima utilizada para a sua fabricação, o petróleo, é uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e naftênico com vinte ou mais átomos de carbono (CRUZ; MARSAIOLI, 2012), o que eleva o seu custo de remediação por métodos convencionais.

Por isso, a biorremediação, uma alternativa biotecnológica capaz de degradar compostos tóxicos, tem se tornado uma ferramenta atrativa e acessível para a limpeza de ambientes poluídos (MUTECA, 2012), oferecendo a possibilidade de transformar diversos contaminantes em compostos menos prejudiciais (CO₂, água e biomassa), através da atividade biológica. Esta técnica vem sendo muito utilizada devido a seu baixo custo, eficiência e por ser uma tecnologia limpa, diferente de outros tratamentos que utilizam agentes químicos agressivos, que são caros e causam danos secundários ao ambiente.

No processo de biorremediação podem ser utilizados microrganismos autóctones ou alóctones. Os autóctones são aqueles isolados e selecionados a partir de amostras do próprio ambiente a ser tratado e os alóctones são adquiridos em meio de cultura ou outras fontes. A biorremediação pode ser realizada por meio de bioestimulação, atenuação natural ou bioaugmentação (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

A bioestimulação consiste em uma técnica que visa aumentar a atividade microbiana pela adição de nutrientes e/ou aceptores finais de elétrons (BAPTISTA; CAMMAROTA; FREIRE, 2003); já atenuação natural é a degradação do poluente pela ação de microrganismos presentes no meio (BARROS, 2010). A bioaugmentação, que é o foco deste trabalho, consiste na introdução de microrganismos para

degradar os contaminantes, metabolizando-os em outros compostos, dentro de um sistema natural contaminado (BARROS; LEMOS, 2006).

Segundo Mariano (2006) a bioaumentação consiste em um processo que utiliza microrganismos alóctones, muitas vezes encontrados em produtos biotecnológicos comercializados. Estes devem ser aprovados pelo órgão ambiental responsável, sendo feitos vários testes para testar possíveis danos que podem trazer ao meio ambiente. Porém, esses compostos possuem um alto preço de aquisição e uma baixa eficiência de remediação, o que não justifica sua utilização no processo de recuperação de uma área.

1.6.1 Fatores que influenciam no desempenho da biorremediação

Koning (2002) ressalta a importância dos fatores ambientais abióticos, tais como a textura do solo, o teor de oxigênio, a temperatura, o teor de nutrientes e o pH para o sucesso da biorremediação.

A classe do solo é determinada pelas suas características físico-químicas e biológicas. Conforme pode ser observado na Figura 2, os solos mais comuns no Brasil são o Argissolo e o Latossolo. O Argissolo apresenta acúmulo de argila em profundidade e presença agravante dos altos teores de alumínio trocável, que apresenta parte da acidez potencial do solo, além de ser um elemento fitotóxico em qualquer uma de suas formas iônicas solúveis (CARVALHO, 2008).

Figura 2: Mapa de solos do Brasil



Fonte: LAB UEMG

Durante o processo de biorremediação do solo, os microrganismos utilizam os hidrocarbonetos como fontes de carbono e energia (doadores de elétrons), já os nutrientes do solo são utilizados na atividade microbiana como receptores de elétrons (CRUZ; MARSALOLI, 2012), o que faz com que o processo de biorremediação dependa da classe do solo e os nutrientes encontrados nessas classes.

De acordo com Andrade, Augusto e Jardim (2010) o processo de biorremediação dos solos pode ocorrer mesmo sem a adição de nutrientes no solo ou qualquer adequação natural, o que o torna um processo barato, sem a necessidade da utilização de ativos e adubos especiais.

De acordo com Betancur-Galvis et al (2006), citado por Andrade, Augusto e Jardim (2010), o nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) são nutrientes básicos para o desenvolvimento da maioria das culturas de microrganismos no solo. Para a biorremediação, estes elementos são utilizados na forma de nitrato de amônia (NH_4NO_3) e nitrato de potássio (KNO_3).

Segundo Vidali (2011), pH com valores próximos a neutralidade tornam o processo mais eficiente, uma vez que neste pH, existe uma melhor relação entre bactérias e fungos, formando uma microbiota com um melhor potencial para a biorremediação.

A faixa de temperatura ideal para microrganismos metabolizarem os contaminantes com eficiência ótima está entre 25 e 30 °C na qual se encontra a média anual brasileira (TATE, 1995 *apud* ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010), demonstrando o privilégio de países da zona tropical para a remediação de solos através de microrganismo. Segundo a Environmental Protection Agency (EPA)

(1995) os microrganismos têm suas funções prejudicadas em temperaturas menores que 10°C e temperaturas acima de 45°C.

Há vários parâmetros ou técnicas que podem ser utilizados para avaliar o processo de biorremediação em ambientes contaminados. Entre os métodos de análise de degradação de hidrocarbonetos, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua eficiência em efetuar a separação, a identificação e a quantidade de espécies químicas (COLLA, 2012). Recentemente, a espectroscopia na região do infravermelho vem sendo explorada em estudos de biorremediação (LIAO; GENG; HUANG, 2009; WANG et al, 2010 *apud* COLLA, 2012). Segundo Guarieiro et al. (2008), trata-se de uma metodologia simples, rápida, de baixo custo e que pode ser utilizada para quantificar misturas de biodiesel. O parâmetro HTP (Hidrocarbonetos Totais de Petróleo) tem sido também aceito pelas agências reguladoras ambientais para avaliação dos processos de monitoramento e remediação, bem como para critérios de remediação de solos impactados por óleo diesel (DOUGLAS et al., 1994; HUESEMANN; TRUEX, 1994 *apud* KOLESNIKOVAS, 2006).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de biorremediação (bioaumentação) em latossolos contaminados experimentalmente com óleos lubrificantes automotivos e verificar a aplicabilidade desta tecnologia como uma alternativa viável para a remediação deste tipo de solo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e caracterização do latossolo

Foram coletadas três amostras de Latossolo entre 0 a 20 cm de profundidade. Estas foram misturadas e homogeneizadas para compor uma amostra única representativa da área.

A coleta foi realizada em uma área próxima à UEMG, Unidade João Monlevade, localizada no bairro Baú, no município de João Monlevade, MG, cujas coordenadas medidas com o GPS foram Sul 19°49.153' Norte 43°9.133' (Figura 3). As amostras coletadas foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia da UEMG, Unidade João Monlevade e para o Laboratório Campo Análises, situado na cidade de Paracatu, Minas Gerais.

Figura 3: Mapa do local de coleta de amostras de latossolo.



Fonte: Google Earth (2017)

2.2 Experimentos

A amostra única do latossolo coletada foi separada em três partes iguais, (cada uma com 3kg). Os experimentos foram realizados da seguinte maneira:

- a) **Experimento 1:** 3kg de solo + 250mL de óleo lubrificante automotivo + 750 mL água da CSAO de posto de combustível contendo microrganismos;
- b) **Experimento 2:** 3kg de solo + 250mL de óleo lubrificante automotivo;
- c) **Experimento 3:** 3kg de solo *in natura* (amostra testemunha)

Os solos dos três recipientes foram revolvidos a cada dois dias e uma vez por mês foram acrescentados 500mL de água no intuito de manter a oxigenação e a umidade dos solos.

O primeiro dia de experimento foi aquele em que foi realizada a contaminação dos solos dos Experimentos 1 e 2. Vale ressaltar que durante a contaminação com óleo lubrificante (experimentos 1 e 2) e durante o acréscimo da água da CSAO (experimento 1) os solos foram misturados até completa homogeneização. O estudo foi finalizado 75 dias após o início dos experimentos.

2.3 Análises químicas do latossolo

Da amostra total de latossolo coletada foram retiradas ainda 500g deste solo *in natura* que foram encaminhados ao Laboratório Campo na cidade de Paracatu, Minas Gerais para a realização de análises químicas, tais como pH, acidez total (H^+ e Al^{3+}), K^+ , CTC (Ca^{2+} , Al^{3+} e Mg^{2+}) e P. Além destas, foram realizadas análises de matéria orgânica no laboratório de Química da UEMG, Unidade João Monlevade.

Vale ressaltar que o estudo inicial da análise da matéria orgânica foi realizado na amostra inicial de latossolo coletada (sem contaminação com óleo lubrificante). Esta análise inicial não foi realizada separadamente para cada experimento, já que o intuito era conhecer esta característica do latossolo conforme ele é encontrado no ambiente.

No final do estudo (após 75 dias) foram pesados separadamente 500g de latossolo de cada um dos 3 experimentos para a realização das análises químicas.

Além dessas análises, amostras de solo do Experimento 1 e 2, contaminados com óleos lubrificantes, foram submetidas à análise de HTP no intuito de analisar o processo de biorremediação.

As análises químicas, descritas abaixo, foram executadas segundo metodologia descrita pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (1997).

2.3.1 Análises químicas

2.3.1.1 Análise do pH do latossolo

Para determinação do pH do solo foram realizados ensaios baseados conforme descrito pela EMBRAPA (1997). Em um béquer com capacidade para 50mL, foram adicionados 10g de solo a 25mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada durante 30 minutos com auxílio de agitador magnético. Após o período de repouso, para separação das fases, o decantado foi transferido para um béquer com capacidade para 25mL e o pH foi determinado em potenciômetro, previamente ajustado com soluções tampão padronizadas de pH.

2.3.1.2 Análise da acidez total (H^+ e Al^{3+})

Para a determinação de acidez total do solo (H^+ e Al^{3+}) foram pipetados 100mL de solução sobrenadante obtida com acetato de cálcio e transferido para o erlenmeyer de 200mL onde foram adicionadas 5 gotas de fenolftaleína a 3% e titulada com solução de 0,0606N de NaOH até o desenvolvimento da cor rósea persistente. Onde foi utilizada a fórmula abaixo:

$$H^+ + Al^{3+}_{(cmolc/Kg)} = (a-b)$$

Onde “a” é o volume em ml de NaOH da amostra e “b” é o volume de NaOH da prova em branco.

2.3.1.3 Análise do CTC (Ca^{2+} , Al^{3+} e Mg^{2+})

Para a determinação da CTC (Ca^{2+} e Mg^{2+}) foi utilizado o método de KCl N. Foram pesados 7,5g do solo e colocados em erlenmeyer de 250mL e adicionado 150mL de solução KCl que foi fechado com rolha de borracha e agitado com movimentos circulares, evitando molhar a rolha, várias vezes no dia. Após a última agitação foi desfeito o montículo que se forma na parte central do erlenmeyer e foi deixado em repouso por uma noite. Posteriormente, foi pipetado em erlenmeyer de 200mL duas alíquotas de 50mL da parte sobrenadante da solução, para determinar o cálcio + magnésio e cálcio trocáveis e alumínio trocável.

Em uma das alíquotas foram adicionadas três gotas de indicador azul de bromotimol e titulado com solução NaOH 0,025N até a coloração verde-azulada persistente, onde a quantidade de Al^{3+} (cmol/Kg) é igual ao volume de NaOH gasto na titulação em mL.

Posteriormente, foi adicionada uma gota de água de bromo para destruir o azul bromotimol e adicionados 6,5mL de solução tampão pH 10 e 4 gotas de indicador eriochrome black e titulado imediatamente com solução de EDTA 0,0125N, até a viragem de cor vermelho-arroxeadada para azul puro ou esverdeada obtendo conjuntamente Ca^{2+} e Mg^{2+} , onde $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ (cmol/Kg) é igual ao volume de EDTA gasto na titulação em mL.

No segundo erlenmeyer foram adicionados 2mL de trietanolamina a 50%, 2mL de KOH a 10% e uma pitada de murexida ($\pm 50\text{mg}$), e titulada com solução de EDTA 0,0125N até a viragem da cor rosa para roxa, o volume de EDTA corresponde ao cálcio existente. E a diferença entre os valores de Ca^{2+} e ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) corresponde ao magnésio existente.

2.3.1.4 Análise da concentração de K^+

Para a determinação do K^+ foram pesados 10g de solo e colocado em erlenmeyer de 200mL, onde foram adicionado 100mL da solução de ácido clorídrico 0,05N, que foi fechado com rolha de borracha e agitado com movimentos circulares, evitando molhar a rolha, várias vezes no dia. Depois da última agitação foi desfeito o montículo que se forma na parte central do erlenmeyer e foi deixado em repouso por uma noite, depois foi filtrado e determinado o K^+ em alíquotas diluídas conforme os teores de K^+ existentes na amostra.

2.3.1.5 Análise do fósforo (P)

Para a determinação de P foi pesado 1g de solo e colocado em erlenmeyer de 500mL onde foram adicionados 20mL de ácido sulfúrico diluído 1:1 e foi fervido durante meia hora, utilizando condensador de refluxo para evitar evaporação. Após o resfriamento foram adicionados 50mL de água e filtrado para balão aferidor de 250mL lavando o resíduo com água até completar o volume, depois foi utilizado um filtro para a determinação de fósforo.

2.3.1.6 Determinação do teor da matéria orgânica (carbono)

Para a determinação de carbono foram utilizados 20g de solo, que foram triturados em gral e passado em peneira de 80 mesh. Posteriormente, foram pesados 0,5g do solo triturado e colocado em erlenmeyer de 250mL, onde foram pipetados 10mL de solução de dicromato de potássio 0,4N.

Foi incluído um branco com 10mL da solução de dicromato de potássio e anotado o volume de sulfato de ferroso amoniacal gasto. No erlenmeyer foram adicionados um tubo de ensaio de 25mm de diâmetro e 250mm de altura cheio de água, agindo com condensador, a solução foi aquecida em placa elétrica até a fervura branda, durante 5 minutos.

Após resfriar foram adicionados 80mL de água destilada, medida com proveta, 2mL de ácido ortofosfórico e três gotas de indicador difenilamina, que foi titulada com solução de sulfato ferroso amoniacal 0,1N até que a cor azul desapareça cedendo lugar à verde, onde será anotado o volume de sulfato ferroso gasto na titulação. Foi utilizado a fórmula:

$$C_{(\text{g/Kg})} = (40 - \text{volume gasto}) \times f \times 0,6$$

Onde f é 40/ pelo volume de sulfato ferroso gasto na prova em branco.

2.3.2 Análises microbiológicas da água da CSAO e dos latossolos

A seguir serão apresentadas as análises microbiológicas realizadas com a água proveniente da CSAO do posto de combustível. Estas análises foram também realizadas nos latossolos dos três experimentos.

2.3.2.1 Exame a fresco da água da CSAO e dos latossolos

Após homogeneização, uma amostra de aproximadamente 600mL de água foi retirada da caixa separadora de água e óleo do posto de combustível. Logo em seguida, esta amostra foi levada para o Laboratório de Biologia da UEMG Unidade João Monlevade para a realização do exame a fresco. Para tal, aproximadamente 10 microlitros (μL) da água foram retiradas da amostra com auxílio de uma pipeta. A água foi colocada sobre uma lâmina de vidro e coberta com uma lamínula e observada no microscópio óptico (modelo 077085, marca QUMIS), com aumento de 40X. Vale ressaltar que exames a fresco da água da caixa separadora de água e óleo foram realizados apenas no momento inicial, já que o intuito era verificar a presença ou ausência de microrganismos.

Para execução do exame a fresco dos latossolos dos três experimentos foi realizada a diluição de uma pequena quantidade do solo com água deionizada. Após diluição, foi retirado aproximadamente $10\mu\text{L}$ com uma pipeta, colocado em uma lâmina de vidro e coberta com uma lamínula e observada no microscópio óptico (modelo 077085, marca QUMIS) com aumento de 40X. Esta análise foi executada quinzenalmente para os três experimentos a fim de analisar a variação da quantidade e da diversidade dos microrganismos.

2.3.2.2 Isolamento de microrganismos da água da CSAO em meio TSA e contagem das unidades formadoras de colônias

Com o auxílio de uma pipeta foi coletado 1mL da amostra da água da CSAO e posteriormente foi colocada em um béquer com 9mL de solução salina (0,9%-p/v NaCl). A solução foi agitada durante 5 minutos, à temperatura ambiente, para a homogeneização.

Após a homogeneização iniciou-se uma diluição seriada até 10^{-3} . Aliquotas de 0,1mL de cada diluição foram adicionadas separadamente em placas de Petri contendo meio rico TSA (*Trypticase Soy Agar*, marca Merck). Estas foram incubadas à temperatura de 30°C e após 5 dias foi feita a observação da diversidade de microrganismos presentes na água e posterior contagem das colônias para o cálculo do índice das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro de água (UFC/mL).

Para o cálculo de UFC/g de solo, placas com menos de 30 colônias e com mais de 300 colônias foram descartados. Estes cálculos de UFC foram importantes para quantificar o número de microrganismos que foram adicionados ao latossolo do Experimento 1 no início do estudo.

2.3.2.3 Isolamento de microrganismos dos latossolos em meio TSA e contagem das unidades formadoras de colônias

Assim como o exame a fresco, o isolamento dos microrganismos dos latossolos dos três experimentos foi realizado de 15 em 15 dias após o início dos experimentos.

Para tal, um total de 1g do solo, de cada experimento, foi colocado em um béquer separadamente e diluídos em 9mL de solução salina (0,9%-p/v NaCl). Estes béqueres foram agitados durante 5 minutos, a temperatura ambiente para a homogeneização da suspensão do solo.

Cada suspensão obtida foi então submetida a uma diluição seriada até 10^{-6} e alíquotas de 0,1mL dessas diluições foram colocadas em placas de Petri contendo meio rico TSA (*Trypticase Soy Agar*, marca Merck). Estas foram incubadas à temperatura de 30°C e após 5 dias foi feita a observação da diversidade de microrganismos presentes nos latossolos dos experimentos e posterior contagem das colônias para o cálculo do índice UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por grama de solo.

Para o cálculo de UFC/g de solo, placas com menos de 30 colônias e com mais de 300 colônias foram descartados. Desta forma, foi estipulado que, nos experimentos seguintes, seriam realizadas plaqueamento apenas das diluições de 10^{-1} a 10^{-3} .

2.3.2.4 Análise morfológica das colônias crescidas em meio TSA

Colônias individuais da água da CSAO e dos latossolos crescidas em placas de Petri contendo meio de cultura TSA foram identificadas através de técnicas clássicas de microbiologia. Para a identificação através da observação de parâmetros clássicos, foram analisadas características morfológicas, usando os esquemas taxonômicos do “Manual Bergey de Bacteriologia Sistemática” (Holt et al., 1994).

Para tal, foram confeccionadas lâminas utilizando fragmentos das colônias crescidas para a observação dos caracteres morfológicos básicos, como motilidade, forma e arranjo colonial utilizando microscópio óptico (modelo 077085, da marca QUMIS).

2.3.3 Análise do processo de biorremediação

O processo de biorremediação foi avaliado pela análise da biodegradação do HTP de acordo com a Norma ISSO/DIS 16703. Desta forma, a quantidade inicial de HTP existente nos latossolos dos Experimentos 1 e 2 foram comparados com a quantidade detectada no final do estudo (75 dias após a contaminação).

Para tal, 500g de latossolo do Experimento 1 e 2 foram encaminhadas ao Laboratório Campo Análises, em Paracatu, Minas Gerais, para análise de HTP.

Análises físicas, químicas e microbiológicas realizadas em latossolos dos três experimentos (citados no item 4.3) foram também muito importantes para fornecer informações sobre o processo de biorremediação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados de todas as etapas realizadas no presente estudo.

3.1 Análises químicas

3.1.1 Análise do pH do latossolo

O pH inicial do latossolo foi de 4,8 para o Experimento 1; 4,6 para o Experimento 2 e 4,8 para o Experimento 3. Desta forma, os três experimentos apresentaram valores bem semelhantes de pH, a adição de óleo não afetou significativamente o pH no início (Tabela 1).

Nas análises realizadas no final do estudo (75 dias após o início dos experimentos) foi observado que o pH nos Experimentos 1 e 2 aumentou para 5,1 e no Experimento 3 diminuiu para 4,3 (Tabela 1). Pode-se então dizer que o pH dos experimentos pouco alterou ao longo do estudo, permanecendo ácido.

Sabe-se que os microrganismos possuem sensibilidade à variação do pH (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992). Desta forma, mudanças no pH podem causar alterações nas comunidades microbianas, uma vez que cada espécie possui um pH ótimo específico. O pH do solo afeta diretamente a atividade dos microrganismos através dos efeitos dos íons H^+ na permeabilidade celular e na permeabilidade enzimática. Além disso, o pH influencia, indiretamente, a disponibilidade de macro e micronutrientes e também na solubilidade de metais pesados no solo (JAQUES et al., 2007), demonstrando assim a importância de se trabalhar com valores ideais de pH durante o processo da remediação.

O pH ótimo para a ação de muitos microrganismos é usualmente próximo da neutralidade (CORSEUIL; ALVAREZ, 1996). Jacques et al. (2010) demonstraram que as maiores degradações de hidrocarbonetos no solo ocorreram nos pH 6,5 e 7,0, demonstrando assim que, quanto mais próximo da neutralidade o pH do solo estiver, melhor será a atividade microbiana do solo, melhorando assim a eficiência da biorremediação.

3.1.2 Análise da acidez total (H^+ e Al^{3+})

Análises de acidez total (H^+ e Al^{3+}) no início do estudo demonstraram que o solo do Experimento 1 apresentou valor de $6,6 \text{ cmolc/dm}^3$, e os Experimentos 2 e 3 apresentaram valores iguais a $6,8 \text{ cmolc/dm}^3$ (Tabela 1). Desta forma, os três experimentos apresentaram valores bem semelhantes de acidez total (H^+ e Al^{3+}).

Análises realizadas no final do estudo (75 dias após o início dos experimentos), demonstraram que o valor da acidez total diminuiu para $4,4 \text{ cmolc/dm}^3$ no Experimento 1; $4,0 \text{ cmolc/dm}^3$ para o Experimento 2 e $6,2 \text{ cmolc/dm}^3$ para o Experimento 3 (Tabela 1).

Embora a acidez total (H^+ e Al^{3+}) do experimento 3 sofrer pouca alteração, os Experimentos 1 e 2 tiveram uma diminuição maior da acidez total (H^+ e Al^{3+}) que o Experimento 3. Assim, pode-se concluir que a contaminação com o óleo dos solos do experimento 1 e 2 os tornou menos ácidos, corroborando com os resultados obtidos na análise do pH demonstrado no item anterior.

Esta diminuição de acidez verificada ao longo do estudo nos experimentos pode ter refletido diretamente na biorremediação dos solos contaminados (Experimento 1 e 2), uma vez que a variação da acidez pode interferir nas populações de microrganismos presente nestes solos.

3.1.3 Análise do CTC (Ca^{2+} , Al^{3+} e Mg^{2+})

As análises iniciais demonstraram valores bem próximos nos três experimentos, já que o solo do Experimento 1 apresentou valor $8,5 \text{ cmolc/dm}^3$; o Experimento 2 apresentou $8,6 \text{ cmolc/dm}^3$ e o Experimento 3 apresentou $8,3 \text{ cmolc/dm}^3$ (Tabela 1).

Análises realizadas no final do estudo (75 dias após o início dos experimentos) apresentaram o valor de $6,4 \text{ cmolc/dm}^3$ para o Experimento 1; $6,2 \text{ cmolc/dm}^3$ para o Experimento 2 e $12,1 \text{ cmolc/dm}^3$ no Experimento 3 (Tabela 1).

Sendo assim, durante os 75 dias do estudo foi observado um aumento da concentração de CTC no Experimento 3 e uma diminuição nos Experimentos 1 e 2. Essa diminuição pode ter acontecido devido à contaminação com o óleo lubrificante, que pode ter reduzido o potencial de troca catiônica do solo. Com a diminuição da CTC ocorre a redução da disponibilidade de Ca^{2+} e Mg^{3+} para os microrganismos, uma vez que esses nutrientes ficam retidos nas partículas de argila presentes no solo, o que pode afetar, negativamente, o processo de biorremediação, uma vez que esses macronutrientes são utilizados pelos microrganismos para sintetizar componentes celulares (MARIANO, 2006). Outro fator que pode ter levado à redução da CTC é o crescente número de microrganismos nestes solos com óleo lubrificante que possui grande oferta de nutrientes. Assim, estes seres, consumidores de Ca^{2+} , Al^{3+} e Mg^{2+} poderiam contribuir também com a redução do CTC total do solo. Sabe-se que bactérias utilizam o cálcio para estabilizar a parede celular e o magnésio para estabilizar os ribossomos (MARIANO, 2006), em contrapartida o alumínio poder ser tóxico para os microrganismos presente no solo (CALDWELL, 2000), o que pode influenciar negativamente na variedade da população de microrganismos presentes no solo.

3.1.4 Análise da concentração de K^+ (potássio)

Análises da concentração de K^+ no início do estudo demonstraram que os solos dos Experimentos 1 e 3 apresentaram valores iguais a $39,5 \text{ mg/dm}^3$. Já o Experimento 2 apresentou $44,1 \text{ mg/dm}^3$ de concentração de K^+ . Desta forma, os três experimentos apresentaram valores iniciais bem semelhantes da concentração de K^+ .

Análises realizadas no final do estudo (75 dias após o início dos experimentos), demonstraram que houve aumento da concentração de K^+ nos Experimentos 2 e 3 (Tabela 1). Entretanto, o solo do Experimento 3 apresentou maior aumento na concentração de K^+ quando comparado aos solos contaminados (Experimentos 1 e 2).

As análises do CTC (Ca^{2+} , Al^{3+} e Mg^{2+}) descritas no item anterior, demonstraram uma diminuição da concentração destes elementos nos solos contaminados (Experimentos 1 e 2). Essa situação favorece a liberação de potássio pelo solo. Porém, por se tratar de um sistema fechado, ele fica acumulado no solo, explicando o aumento de K^+ nestes dois experimentos, sendo que no Experimento 2 este acúmulo foi mais evidente (Tabela 1). Por outro lado, pode-se observar que o solo do experimento 3 apresentou aumento do CTC (Ca^{2+} , Al^{3+} e Mg^{2+}), o que favorece a adsorção do potássio ao solo, contribuindo com o seu acúmulo no solo com o passar do tempo (Tabela 1). Esta adsorção do potássio no solo pode dificultar a utilização deste elemento químico pelos microrganismos presentes neste experimento. Vale ressaltar, que o solo deste experimento não foi contaminado com óleo lubrificante, e assim apresentou menor quantidade de microrganismos, que não contribuíram de maneira significativa, na utilização do potássio e sua consequente diminuição.

Segundo Andrade, Augusto e Jardim (2010) o potássio normalmente é utilizado pelos microrganismos na forma de di-hidrogênio fosfato de potássio (KH_2PO_4) e nitrato de potássio (KNO_3), influenciando assim diretamente na biorremediação do sítio contaminado. Castro et al. (2005), demonstraram que solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo e no qual foi adicionado nitrato de potássio em quantidades adequadas, obtiveram uma eficiência na redução de HTP de 91,68% durante o processo de biorremediação *in-situ*, enquanto o tratamento controle obteve uma eficiência de apenas 38,07% de redução.

3.1.5 Análise da concentração de fósforo (P)

Análises da concentração do P no início do estudo detectaram valor de 11,8mg/dm³ no Experimento 1; 12,1mg/dm³ no Experimento 2 e 3,8mg/dm³ no Experimento 3 (Tabela 1). Desta forma, pode-se observar que os solos contaminados com óleo apresentaram maiores concentrações de P, o que pode ser explicado pela adição de óleo lubrificante ao solo, uma vez esses compostos possuem aditivos com presença de fósforo e enxofre para melhorar sua eficiência, e adicionar características aos óleos.

Análises realizadas no final do estudo (75 dias após o início dos experimentos) demonstraram valor igual a 2,8mg/dm³ no Experimento 1; 2,4mg/dm³ no Experimento 2 e 2,1mg/dm³ no Experimento 3 (Tabela 1). Sendo assim, durante os 75 dias após o início do estudo, foi detectada uma diminuição da concentração de P nos 3 experimentos. Foi observado uma redução de 76,27% na concentração de fósforo no Experimento 1 e 86,16% no Experimento 2, enquanto que o Experimento 3 apresentou uma redução de 44,73%. Estes resultados mostram uma maior redução de P nos solos dos experimentos 1 e 2, o que pode estar associado ao maior número de microrganismos neles existentes. Estes seres vivos utilizam componentes do óleo lubrificante como fonte de nutriente, inclusive os compostos que possuem fósforo, favorecendo assim a sua reprodução.

Sabe-se que o fósforo é necessário para a produção de ATP (adenosina trifosfato) pelos microrganismos durante o seu metabolismo, além de fazer parte da constituição de moléculas, como os ácidos nucleicos, fosfolipídios e ácidos tecóicos (FRANKENBERGER, 1992; SPINELLI, 2008). Sendo assim, os microrganismos requerem fósforo para o incremento de biomassa.

Estudos demonstraram que a deficiência de nutrientes no solo limita a biodegradação dos hidrocarbonetos presentes nos derivados do petróleo. Sendo assim, efeitos benéficos da fertilização do solo com nutrientes, como o fósforo têm sido demonstrados (PRITCHARD; COSTA, 1991). Os microrganismos necessitam de carbono, nitrogênio e fósforo para a formação de sua biomassa, sendo necessária a existência desses nutrientes no solo em condições favoráveis.

3.1.5 Análise do teor da matéria orgânica (C)

Análises do teor de matéria orgânica no início do estudo detectaram concentração de 12% na amostra *in natura* do latossolo (Tabela 1).

Análises realizadas no final do estudo (75 dias após o início dos experimentos) demonstraram valor igual a 7,5% nos Experimentos 1 e 2, e 10% no Experimento 3 (Tabela 1). Desta forma, o teor de matéria orgânica diminuiu em todos os experimentos, sugerindo que ela foi utilizada no metabolismo dos microrganismos presentes no latossolo. Uma maior diminuição da matéria orgânica foi observada nos Experimentos 1 e 2, o que pode ser explicado pelo aumento de microrganismos adicionados juntamente com a água da CSAO (no Experimento 1) e pelo aumento de microrganismos estimulado pelo acréscimo de óleo lubrificante (adicionado em ambos os experimentos).

Segundo Andrade, Augusto e Jardim (2010), cerca de 50% da matéria orgânica são incorporadas a biomassa dos microrganismos presentes no solo e os outros 50% são transformados em dióxido de carbono (CO_2). Isso pode ter contribuído para a redução de 37,5% do teor de matéria orgânica observada nos Experimentos 1 e 2; e de 16,6% no Experimento 3.

Sendo assim, a matéria orgânica serve como uma fonte carbono e energia para os microrganismos do solo, o que contribui para a biorremediação de solos contaminados. Além disso, sabe-se que o baixo teor de matéria orgânica reduz a capacidade de agregação de partículas e adsorção de nutrientes, tornando o solo muito suscetível à erosão e à perda de nutrientes por lixiviação, como mostram estudos de Reatto e Martins. (2005).

Tabela 1: Resultados dos Parâmetros Físico-Químicos

Identificação da Amostras		Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
		Resultados		Resultados		Resultados	
Parâmetros	Unidade	Início	75 dias	Início	75 dias	Início	75 dias
pH em água		4,8	5,1	4,6	5,1	4,8	4,3
Acidez Total	cmolc/dm ³	6,6	4,4	6,8	4	6,8	6,2
K	mg/dm ³	39,5	39,6	44,1	52,4	39,5	89,5
CTC Total	cmolc/dm ³	8,5	6,4	8,6	6,2	8,3	12,1
P	mg/dm ³	11,8	2,8	12,1	2,4	3,8	2,1
Materia Orgânica ©	%	12	7,5	12	7,5	12	10

Fonte: Autoria Própria

Legenda: pH: Potencial Hidrogeniônico; K: Potássio; CTC: Capacidade de Troca Catiônica; P: Fósforo.

3.2 Análises microbiológicas da água da CSAO e dos latossolos

Conforme comentado anteriormente, amostras da água da CSAO foram submetidas, no início do estudo, às análises microbiológicas, como o exame a fresco, crescimento em meio de cultura TSA, contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/grama de solo) e coloração de Gram. Além das análises químicas, os solos dos Experimentos 1, 2 e 3 foram também submetidos às mesmas análises microbiológicas citadas acima.

3.2.1 Exame a fresco da água da CSAO e dos latossolos

O exame a fresco da água da CSAO permitiu visualizar vários tipos de microrganismos. Foi observada uma predominância de bactérias espiraladas. Além destes microrganismos foram também detectadas bactérias em formatos de cocos e protozoários. Diante destes resultados, foi então proposto o estudo de biorremediação de latossolos utilizando estes microrganismos presentes na CSAO, uma vez que eles estão adaptados neste ambiente repleto de óleos lubrificantes.

Análises de exame a fresco dos latossolos, realizadas ao longo dos 75 dias do estudo nos 3 experimentos, detectaram a presença de microrganismos, sendo a maioria bactérias em formato de cocos. Além disso, foi possível identificar também em todos os solos, protozoários e fungos que podem estar também associados ao processo de biorremediação destes solos. Apesar da maioria dos trabalhos desenvolvidos em processos de biorremediação avaliarem apenas bactérias, estudos das últimas décadas vêm demonstrando que os fungos são também capazes de degradar vários poluentes orgânicos (SINGLETON, 2001). Lima, Oliveira e Cruz (2011), comprovaram uma maior eficiência dos fungos em degradar as frações de saturados e aromáticos em relação a bactérias.

3.2.2 Isolamento de microrganismos da água da CSAO em meio TSA e contagem das unidades formadoras de colônias

No intuito de isolar os microrganismos observados no exame a fresco foi utilizado o meio de cultura TSA. Foi possível observar o crescimento de bactérias nas três diluições avaliadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), sendo identificadas colônias de bactérias brancas e marrons.

A contagem de colônias permitiu verificar a presença de 3×10^6 UFC/mL de água, ou seja, para cada mL de água da CSAO existiam 3 milhões de unidades formadoras de colônias.

Sendo assim, considerando que foi adicionado 750mL da água da CSAO ao solo do Experimento 1, pode-se então dizer que a quantidade de UFC adicionada foi de $2,25 \times 10^9$, ou seja, foram adicionadas neste latossolo 2 bilhões e 250 milhões de Unidades Formadoras de Colônias.

Vale ressaltar que o objetivo de acrescentar estes microrganismos existentes na água da CSAO ao latossolo do Experimento 1 foi observar se a remediação deste solo contaminado com óleo iria ser mais eficiente em relação ao solo que recebeu apenas óleo lubrificante (Experimento 2) e ao solo *in*

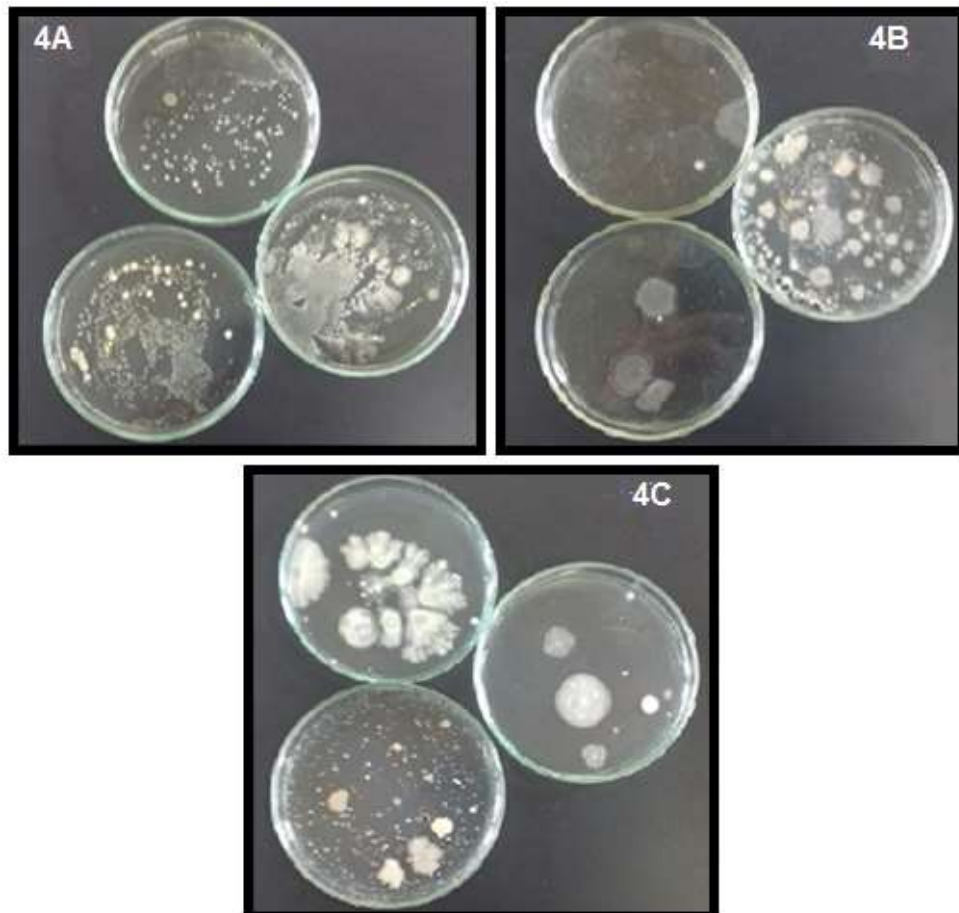
natura (sem contaminação). Desta forma, seria então avaliado o comportamento em conjunto dos microrganismos já existentes no solo com os existentes na água da CSAO.

3.2.3 Isolamento dos microrganismos dos latossolos em meio TSA e contagem das unidades formadoras de colônias

Ao longo dos 75 dias do estudo foram realizadas quinzenalmente três diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) das amostras de solo dos experimentos 1, 2 e 3. Assim, foi possível fazer, o levantamento da quantidade de UFC no solo de cada experimento (Gráfico 1). Vale ressaltar que todas as diluições foram sempre realizadas no mesmo momento e nas mesmas condições.

Foi possível observar o crescimento de bactérias e fungos nos solos de todos os experimentos, nas três diluições avaliadas. A Figura 4 ilustra colônias de bactérias crescidas em meio de cultura TSA em diferentes momentos do estudo. Foram identificadas diferentes colorações de colônias crescidas nas placas, sendo elas, brancas, amarelas e marrons, demonstrando uma diversidade de microrganismos nos latossolos, sendo predominantes as colônias brancas.

Figura 4: Microrganismos crescidos em meio de cultura TSA (Tryptone Soya Agar)

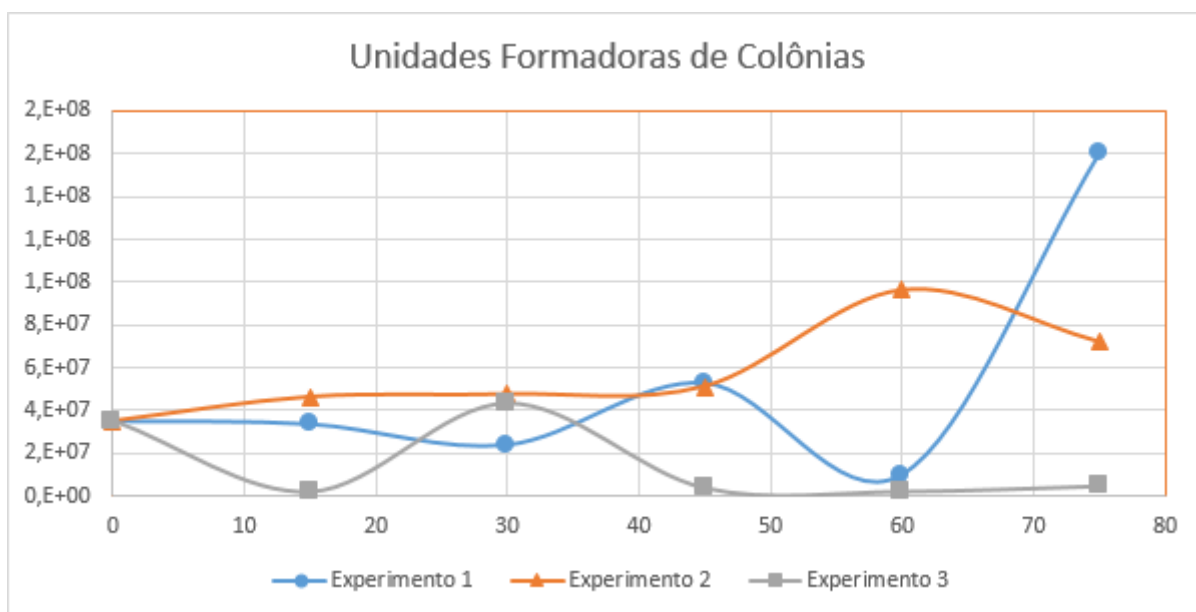


Fonte: Autoria Própria

Microrganismos isolados de latossolos - **4A**: Colônias do Experimento 1 (Solo + óleo lubrificante + água caixa separadora de água e óleo); **4B**: Colônias Experimento 2 (Solo + óleo lubrificante); **4C**: Colônias Experimento 3 (Solo *in natura*)

Após a observação da diversidade das colônias de microrganismos crescidas nas placas de Petri foi realizado o cálculo para definição do número de unidades formadoras de colônias por grama do solo (UFC/g) para cada experimento. Os resultados desta análise estão demonstrados no Gráfico 1.

Gráfico 1: Unidades Formadoras de Colônias nos latossolos



Fonte: Autoria Própria

A avaliação microbiológica realizada no início do estudo foi feita na amostra *in natura* do latossolo, ou seja, antes dele ter sido separado em 3 experimentos. O intuito era realizar a caracterização microbiológica do solo sem a contaminação com o óleo lubrificante, conforme ele é encontrado no meio ambiente. Desta forma, o valor inicial de UFC observado neste solo foi de 4.500.000 UFC/grama (Gráfico 1).

Posteriormente foram realizadas, no mesmo dia e nas mesmas condições, avaliações quinzenais nos três experimentos. Assim, ao longo dos 75 dias de duração do estudo, foram realizadas análises no 1º (ponto 0), 15º, 30º, 45º, 60º e 75º dia (Gráfico 1).

Analisando o Experimento 3 (solo *in natura*) pode-se observar que a quantidade de UFC oscilou ao longo do estudo, sendo que na última avaliação foi encontrada uma quantidade muito baixa de microrganismos. Esse experimento apresentou menor quantidade de microrganismos na maior parte do período avaliado quando comparado aos outros experimentos. A reprodução dos microrganismos pôde ter sido limitada pela menor disponibilidade de nutrientes, já que neste solo não foi adicionado o

óleo lubrificante. A menor quantidade de microrganismos refletiu na maior concentração de matéria orgânica não metabolizada identificada no final do estudo para este solo (Tabela 1).

Por outro lado, o número de UFC no Experimento 2 (solo + óleo lubrificante) manteve-se em grande quantidade na maioria das avaliações, sendo que na avaliação de 15 e 60 dias apresentou maior valor em relação aos outros experimentos. O crescente número de UFC observado neste experimento pode ter sido estimulado pela oferta de nutrientes ao meio, proporcionada pelo óleo lubrificante automotivo acrescentado ao solo. O aumento da população de microrganismos contribuiu na diminuição de nutrientes do solo, como a matéria orgânica, CTC e do fósforo na última avaliação (Tabela 1).

O fósforo é muito utilizado no processo de bioestimulação, uma vez que favorece o crescimento microbiano (LIEBEG; CUTRIGHT, 1999). Isso foi possível de ser observado, uma vez que a maior quantidade de microrganismos observada no Experimento 2 resultou em uma maior redução na concentração de fósforo quando comparado ao Experimento 1 (Gráfico 1). Vale ressaltar que a maior quantidade de fósforo observada no início do estudo nos Experimentos 1 e 2 foi devido ao acréscimo de óleo lubrificante nestes solos que possuem em sua composição este elemento químico.

A diminuição de UFC na avaliação de 75 dias no Experimento 2 pode ser explicado pela escassez de alimento, já que os microrganismos realizam a decomposição dos compostos oleosos, utilizando estes como fontes de nutrientes, carbono e geração de energia para seu crescimento e sobrevivência (GUSMÃO; RAQUEL; LEONIE, 2009; BANAT 1994). Isto foi comprovado pela diminuição da matéria orgânica observada neste solo ao longo do estudo e que pode ter sido então um fator limitante para a reprodução dos microrganismos no final do estudo (Tabela 1). Trabalhos têm demonstrado que o aumento da população bacteriana presente no solo contribuiu com a degradação de óleo diesel e outros hidrocarbonetos pelos microrganismos que consumiam o óleo como fonte de carbono para sobreviver (KATAOKA, 2001; BENTO et al., 2003).

O Experimento 1 (que continha óleo lubrificante e também água da CSAO) apresentou, na maior parte do estudo, uma menor quantidade de microrganismos quando comparado ao Experimento 2. Esta menor quantidade de microrganismos pode ter sido resultado da competição entre os microrganismos já existentes no solo com os existentes na água da CSAO. Além disso, assim como observado no experimento 1, no experimento 2 foi observado uma nítida metabolização da matéria orgânica, CTC e fósforo pelos microrganismos (Tabela 1), demonstrando que o óleo lubrificante acrescentado nestes solos serviu como fonte de nutrientes e estímulo para crescimento microbiano. Na avaliação de 75 dias, houve um aumento súbito da população de microrganismos no experimento 1, sugerindo que o período crítico de competição entre eles foi ultrapassado. Assim, neste período, pode ter ocorrido uma predominância de algumas populações de microrganismos em relação a outras, modificando desta forma, o perfil inicial da variedade e da quantidade de microrganismos presentes neste solo.

3.2.4 Análise morfológica

Análises microscópicas dos fragmentos das colônias diluídas em salina (0,9%-p/v NaCl) permitiram visualizar a morfologia das bactérias presentes no latossolo dos experimentos. No Experimento 3 (solo *in natura*) foi observado bactérias no formato de cocos e estreptococos. Já no Experimento 1 (solo + água da caixa separadora + óleo) e no Experimento 2 (solo + óleo) foram encontradas bactérias com o formato de cocos, bacilos e diplococos.

Quadro 1: Descrição morfológica e arranjo de colônias de bactérias crescidas em meio TSA.

Parâmetros Analisados	Experimento 1 Solo + Óleo + Água da Caixa separadora	Experimento 2 Solo + Óleo	Experimento 3 Solo In Natura
Morfologia	Cocos Estreptococos	Bacilos Cocos Diplococos	Bacilos Cocos Diplococos

Fonte: Autoria Própria

3.3 Eficiência dos microrganismos no processo de remediação dos latossolos contaminados com óleos lubrificantes

Para avaliação da eficiência da biorremediação foi realizado o teste de HTP (Hidrocarbonetos Totais de Petróleo) que informa a quantidade de cada cadeia carbônica encontrada em uma amostra do

solo. Como não foi acrescentado óleo lubrificante ao solo do Experimento 3 esta análise não foi realizada para este experimento.

Conforme pode ser observado na Tabela 2, no momento inicial foram encontrados no Experimento 1, tetradecane (11,95mg/Kg) e hexadecane (23,07 mg/Kg) e desta forma, um total de 35,02mg/Kg de hidrocarbonetos foram detectados neste solo. Já no Experimento 2 foi encontrado, decane (1,58mg/Kg) e tetradecane (65,08mg/Kg) e desta forma, um total de 66,66mg/Kg de hidrocarbonetos foram detectados neste solo.

Após o período de 75 dias foi feito novamente a análise de HTP (Tabela 2) e foram encontrados no Experimento 1, hexadecane (0,64mg/Kg) em menor quantidade em relação ao início, o que já era esperado devido a adição de microrganismos da caixa separadora de água e óleo, além dos já existentes no solo que contribuem com a autodepuração do solo. Além disso, foi identificado no Experimento 1, octadecane (3,09mg/Kg) que não tinha sido identificado no início, o que pode ocorrer pelo próprio processo de biorremediação e/ou autodepuração, uma vez que cadeias carbônicas metabolizadas pelos microrganismos podem ser transformadas em outras cadeias que podem reagir entre si formando cadeias maiores. Outra explicação para este resultado observado pode ser que amostra de solo coletada para análise inicial não possuía esta cadeia carbônica, ao contrário da outra amostra coletada no final do estudo. Não foram encontrados tetradecane no final do estudo que provavelmente foi metabolizado pelos microrganismos presentes no solo.

Já no Experimento 2, após os 75 dias, foi observado hexadecane (0,94 mg/Kg) e octadecane (3,82mg/Kg) que não haviam sido identificados no início do estudo. Decane e tetradecane não foram mais observados, porém ainda existem cadeias carbônicas, demonstrado que essas cadeias são produtos que surgiram a partir da degradação microbiológica ou química das cadeias de decane e tetradecane.

Oliveira e Alves (2013) demonstraram que algumas cadeias de hidrocarbonetos são mais suscetíveis a degradação que outras e desta forma, a quantidade de hidrocarboneto e os tipos de cadeias que compõem esse contaminante interferem diretamente na eficiência da biorremediação (Quadro 2).

Quadro 2: Estrutura química e biodegradabilidade.

Biodegradabilidade	Exemplo de Constituintes	Derivados nos quais os constituintes são usualmente encontrados
Mais degradável	n-butano, n-pentano, n-octano	Gasolina
	Nonano	Óleo diesel
	Metilbutano, dimetilpentenos, metiloctanos	Gasolina
	Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos	Gasolina
	Propilbenzenos	Óleo diesel, querosene
	Decanos	Óleo diesel
	Dodecanos	Querosene
	Tridecanos	Óleos combustíveis para aquecimento
	Tetradecanos	Óleos lubrificantes
	Naftalenos	Óleo diesel
	Fluorantenos	Querosene
	Pirenos	Óleos combustíveis para aquecimento
Menos degradável	Acenaftenos	Óleos lubrificantes

Fonte: U.S Environmental Protection Agency (1995), citado por Oliveira e Alves (2013).

Considerando todos estes hidrocarbonetos juntos (Tabela 2), pode-se observar que o Experimento 1 (óleo + água da caixa separadora de água e óleo) apresentou menor concentração de hidrocarbonetos (35,02mg/Kg) no início do estudo em relação ao Experimento 2 (óleo), que apresentou 66,66 mg/Kg. Apesar de homogeneizar bem o óleo lubrificante antes de adicioná-lo aos solos, houve esta diferença da concentração de óleo em ambos no início do estudo. Além disso, estes resultados podem ser explicados pela amostra do solo que foi submetida à análise de HTP, ou seja, mesmo homogeneizando bem os solos antes de pegar a amostra, pode ser que a amostra de solo do Experimento 2 apresentava mais óleo que o Experimento 1.

Tabela 2: Quantidade de hidrocarbonetos presentes nos latossolos no início e no final do estudo.

Estrutura Química	Unidade	Experimento 1		Experimento 2	
		Início	Final	Início	Final
Decane (C10)	mg/Kg	0	0	1,58	0
Tetradecane (C14)	mg/Kg	11,95	0	65,08	0
Hexadecane (C16)	mg/Kg	23,07	0,64	0	0,94
Octadecane (C18)	mg/Kg	0	3,09	0	3,82
Total de Hidrocarbonetos	mg/Kg	35,02	3,73	66,66	4,76
Eficiência	%	89,34		92,85	

Fonte: Autoria Própria

Após 75 dias de estudo, observou-se que no Experimento 1, houve uma redução de 89,34% da quantidade de hidrocarbonetos (35,02 para 3,73) e no Experimento 2 houve uma redução de 92,85% (66,66 para 4,76), conforme observado na Tabela 2. Sendo assim, o presente estudo observou resultados similares em ambos os experimentos, demonstrando uma alta eficiência da biorremediação do latossolo (Tabela 2). Mariano (2006), estudando a biorremediação em latossolos observou 57,8% de eficiência de remoção de hidrocarbonetos.

Outro estudo, utilizando também a bioaugmentação em latossolos contaminados com óleos lubrificantes, detectou eficiência de 41,65% no experimento que possuía 50 mL de óleo lubrificante + 500g de solo+ microrganismos isolados de uma indústria de laticínios (Deon et al. 2012). Vale ressaltar que o experimento deste autor utilizou 50mL de contaminante em 500g de solo, e o período de avaliação foi de 21 dias. O presente experimento utilizou 250mL de contaminante em 3000g de solo, e o período de avaliação foi de 75 dias. Assim, a proporção de contaminante/solo foi similar em ambos os estudos, porém, pode-se dizer que o tempo do estudo influencia na eficácia da biorremediação, já que o presente estudo detectou uma eficácia maior na biorremediação. Desta forma, conclui-se ainda que se os dias de avaliação do presente estudo fosse superior a 75 dias, a chance de aumentar a eficiência da biorremediação seria grande, ainda mais que foi observado um aumento súbito de microrganismos no Experimento 1 (que recebeu água da CSAO e óleo lubrificante), conforme observado no Gráfico 1.

Ao analisar a redução de hidrocarbonetos ao longo dos 75 dias do estudo, foi possível concluir que o uso dos microrganismos da CSAO no solo do Experimento 1 (solo, óleo e água da CSAO) contribuiu para a redução de hidrocarbonetos do solo. Entretanto, essa diminuição foi praticamente a mesma observada no solo do Experimento 2 (solo e óleo), remediada apenas com os microrganismos do solo (atenuação natural).

Porém, o Experimento 1 possuía uma quantidade maior de hexadecane (cadeia com 16 carbonos) no início do estudo, o que não foi observado no Experimento 2. E conforme demonstrado no quadro 2, quanto maior a cadeia carbônica do composto químico presente no óleo lubrificante, mais difícil de ser biodegradada, diminuindo assim a eficiência da biorremediação. Entretanto, isso não foi observado, pois de alguma maneira, os microrganismos presentes na água da CSAO favoreceram a metabolização desta cadeia carbônica, garantido uma elevada eficiência do processo de biorremediação.

A redução de hidrocarbonetos presentes no óleo lubrificante foi favorecida pela grande população de microrganismos presentes no solo do Experimento 1 e 2 (Gráfico 1) que permitiram uma elevada eficiência da biorremediação em ambos os solos. Conforme comentado anteriormente, houve competição entre os microrganismos da CSAO e os encontrados naturalmente no solo no Experimento 1, o que pode ter refletido na menor quantidade de UFC observada ao longo do estudo neste experimento em relação ao Experimento 2. Sendo assim, mesmo acrescentando microrganismos da água da CSAO a eficiência da remediação não foi maior em relação ao experimento 2 que possuía apenas microrganismos indígenas presentes naturalmente no solo.

Deve ser levado em consideração que os microrganismos da CSAO aumentaram a eficiência da remediação do solo do Experimento 1, pois apesar da menor quantidade de microrganismos presentes neste solo, a eficiência foi praticamente a mesma da observada no Experimento 2 que apresentou maior quantidade de UFC na maior parte do estudo.

Ao final do período do estudo (75 dias) foi possível observar um pico na quantidade de microrganismos no Experimento 1, o que demonstra que se o período de estudo fosse maior, possivelmente a eficiência da biorremediação detectada no Experimento 1 seria maior.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação de solos por óleos lubrificantes trazem grandes danos ao solo, aumentando a sua acidez, causando desequilíbrio a sua biota e mudanças de suas propriedades físico-químicas, o que pode torná-lo um solo infértil. Além disso, pode propiciar a contaminação do lençol freático.

As técnicas de remediação convencionais geram danos secundários aos solos contaminados e por isso a biorremediação se torna uma prática interessante, uma vez que possui baixo custo e não gera prejuízos ao meio. O conhecimento das características físico-químicas dos solos pode ser muito útil durante este processo, uma vez que microrganismos sofrem interferências de fatores como pH, umidade, concentração de nutrientes, entre outros.

Este estudo demonstrou que solos contaminados com óleos lubrificantes possuem maior quantidade de microrganismos do que o solo não contaminado. Estes seres são muito importantes na degradação de hidrocarbonetos presentes no óleo lubrificante, contribuindo assim na remediação. A quantidade de microrganismos foi proporcional à taxa de redução dos hidrocarbonetos no solo.

A eficiência da biorremediação no experimento 1 e 2 foi alta e similar. Os microrganismos presentes no latossolo do Experimento 1 (solo+ óleo lubrificante+ água da CSAO) foram capazes de metabolizar cadeias carbônicas complexas, fortalecendo assim a hipótese do trabalho, ou seja, microrganismos presentes na água da CSAO do posto de combustível podem ser utilizados na biorremediação de locais contaminados com óleos lubrificantes. Assim, além destes microrganismos favorecerem uma elevada eficiência da remediação, proporcionaram ainda a metabolização de cadeias carbônicas mais complexas. O Experimento 2 apresentou também uma elevada eficiência na remoção de óleo lubrificante, porém as cadeias carbônicas presentes nesse experimento eram menores, o que as tornam mais fácil de degradar, quando comparadas com as cadeias encontradas no Experimento 1.

Desta forma, conclui-se que os microrganismos da CSAO, contribuíram para a redução de hidrocarbonetos no latossolo, e que apesar desta diminuição ter sido praticamente a mesma da observada no Experimento 2 (autodepuração), a sua participação na remediação gerou muita expectativa, uma vez que microrganismos da CSAO possibilitaram a degradação de hidrocarbonetos mais complexos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Juliano de Almeida; AUGUSTO, Fabio; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados**. Eclet. Quím., São Paulo, v. 35, n. 3, p. 17-43, set. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702010000300002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 31 out. 2016.

ANDRADE, Luiza Notini de. **Avaliação do uso da oxidação química in situ em solos ferríferos para a remediação de água subterrânea pela mistura gasolina/etanol**. 2016. 127 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Desa, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016. Disponível em: <<http://www.smarh.eng.ufmg.br/defesas/1194M.PDF>>. Acesso em: 28 mar. 2017.

BANAT, I. M. **Biosurfactants production and possible uses in Microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation**: a review. Bioresource Technology. v. 51, p. 1- 12, 1994.

BAPTISTA, Sandro J.; CAMMAROTA, Magali C.; FREIRE, Denise DC. **Avaliação da bioestimulação em solos argilosos contaminados com petróleo**. In: Congresso Brasileiro de PandD em Petróleo and Gás. Rio de Janeiro: UFRJ, 2003. Disponível em: <<http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/2/6098.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2016

BARROS, C. A.; LEMOS, J. L. S. **Estudo da degradação de petróleo em solo areno-argiloso com bioaumento fúngico utilizando casca de coco como material estruturante**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2006, Salvador. Anais... Salvador: CETEM, 2006. Disponível em: <<http://www.cetem.gov.br/images/congressos/2007/CAC00350007.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2016.

BARROS, Claudia Affonso. **Monitoramento da Atenuação Natural de Solos Artificialmente Contaminados com Óleo Diesel B0 e B4**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://tpqb.eq.ufrj.br/download/monitoramento-da-atenuacao-natural-de-solos-artificialmente-contaminados.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2016.

BENTO, F. M.; et al. **Bioremediation of soil contaminated by diesel oil**. Braz. J. Microbiol., 34:65-68, 2003.

BOZZA (Brasil). **História da Lubrificação**. 2016. Disponível em: <<http://www.bozza.com/institucional/historia>>. Acesso em: 27 ago. 2016.

BRASIL. Congresso. Câmara dos Deputados. Lei nº 12305, de 02 de agosto de 2010. **Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências**. Lei Nº 12.305, de 2 de Agosto de 2010. Brasília, DF, 02 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=636>>. Acesso em: 25 out. 2016.

CALDWELL, D.R. **Microbial physiology and metabolism**. 2.ed. Belmont: Star, 2000. 403p

CAMARA, Michel Araújo; PEREZ, Breno Roberto; CHRISTIANINI, Rafael Zagatto. **Óleos Lubrificantes Automotivos**. 2010. 11 f. Trabalho apresentando ao Curso de Engenharia Mecânica, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, 2010. Disponível em: <www.unesp.edu.br/engxxxxx>. Acesso em: 31 out. 2016.

CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do Solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do solo. 360p. 1992.

CARVALHO, Layla Cristina Teixeira. **Análise comparativa entre diferentes metodologias utilizadas para recomendação de gesso agrícola em solos cultivados com lavoura de café na região sul de Minas Gerais**. 2008. 39 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Cafeicultura, Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho, Muzambinho, 2008. Disponível em: <http://iftools.muz.ifsuldeminas.edu.br/attachments/221_analise_comparativa_entre_diferentes_metodologias_utilizadas.pdf>. Acesso em: 30 out. 2016.

CASTRO, Rodrigo A. et al. **Utilização de Nitrato de Potássio e Peróxido de Hidrogênio para Biorremediação**. "In Situ" de Solos Contaminados por Petróleo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS, 3., 2005, Salvador. Anais. Salvador: Ipb, 2005. p. 1 - 6. Disponível em: <http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0184_05.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2017.

COLLA, Tatiana S.. **Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura B10 por consórcio bacteriano**. 2012. 150 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, 2012. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/61774/000866621.pdf?sequence=1&locale-attribute=es>>. Acesso em: 31 out. 2016.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. **Natural bioremediation perspective for BTX contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol**. Wat. Sci. Tech., v. 34, p.311318, 1996.

CRUZ, Georgiana Feitosa da; MARSAIOLI, Anita Jocelyne. **Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios**. Quím. Nova, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1628-1634, 2012. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000800024&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 31 out. 2016

DEON, Maite Carla et al. **Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 33, n. 1, p.73-82, 26 abr. 2012. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0375.2012v33n1p73>. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/viewFile/10248/10381>>. Acesso em: 27 out. 2016

DOUGLAS, G. S.; PRINCE, E. L.; BUTLER, E. L.; STEINHAEUER, W. G. **The use of internal chemical indicators in petroleum and refined products to evaluate the extent of biodegradation**. In: HINCHEE, R. E., ALLEMAN, B. C., HOEPEL, R. E.; MILLER R.N.. Hydrocarbon Bioremediation. Lewis Publishers, Tokyo, p. 477, 1994.

EFE. **Califórnia entra em estado de emergência por vazamento de óleo.** 2015. Disponível em: <<http://g1.globo.com/natureza/noticia/2015/05/california-entra-em-estado-de-emergencia-por-vazamento-de-oleo.html>>. Acesso em: 30 out. 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) (Brasil). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Manual de Métodos de Análise de Solo.** 2. ed. Rio de Janeiro: Rev. Atual, 1997. 212 p. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Manual+de+Metodos_000fzvhotqk02wx5ok0q43a0ram31wtr.pdf>. Acesso em: 23 out. 2016.

EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. **How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers.** Chapter XII – Enhanced Aerobic Bioremediation, EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007 and EPA 510-R-04-002, 1995 73p. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-03/documents/tum_ch4.pdf>. Acesso em: 31 out. 2016. Tradução do autor.

FRANKENBERGER, JR.; W.T. **The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons.** In CALABRESE, E.J.; KOSTECKI, P.T. Hydrocarbon contaminated soils and groundwater, v. 2, p. 237-293, 1992.

G1 ZONA DA MATA (Santos Dumont). **Origem de óleo que contaminou solo em Santos Dumont, MG, é investigada.** 2015. Disponível em: <<http://g1.globo.com/mg/zona-da-mata/noticia/2015/02/origem-de-oleo-que-contaminou-solo-em-santos-dumont-mg-e-investigada.html>>. Acesso em: 31 out. 2016.

GUARIEIRO, Lílian Lefol Nani et al. **Metodologia Analítica Para Quantificar O Teor De Biodiesel Na Mistura Biodiesel:Diesel Utilizando Espectroscopia Na Região Do Infravermelho.** Quím. Nova, São Paulo, v. 31, n. 2, p.421-426, 14 jan. 2008. Disponível em: <http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol31No2_421_40-NT07080.pdf>. Acesso em: 31 out. 2016

GUSMÃO. A.C.B. DE, RAQUEL D. RUFINO, LEONIE A. SARUBBO. **Economics of Application of a Biosurfactant in Soil Contaminated With Petroleum Derivate.** In: XVII Simpósio nacional de bioprocessos. Anais... Natal RN, 2009.

HOLT, J. G. et al.: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 1134 p.

HUESEMANN, M. H. & TRUEX, M. J. **The role of oxygen diffusion in passive bioremediation of petroleum contaminated soils.** Journal Hazardous Materials, v. 51, pp. 93-113, 1996.

ITRC. **Technical and Regulatory Guidance for In Situ Chemical Oxidation of Contaminated Soil and Groundwater.** In: INTERSTATE TECHNOLOGY & REGULATORY COUNCIL (Ed.). Washington, DC, 2005. Disponível em <<http://www.itrcweb.org/Guidance/GetDocument?documentID=45>>. Acesso em: 28 mar. 2017.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti et al. **Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 40, n. 2, p.310-317, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n2/a468cr1426.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2017.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de "landfarming".** Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.

KOLESNIKOVAS, Celso. **Avaliação de risco toxicológico para hidrocarbonetos totais de petróleo em forma fracionada aplicada à gestão e monitoramento de água subterrânea em um complexo industrial.** 2006. 266 f. Tese (Doutorado) - Curso de Recursos Minerais e Hidrogeologia, Universidade de São Paulo Instituto de Geociências, São Paulo, 2006. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/44/44133/tde-18052007-105936/publico/CK.pdf>. Acesso em: 31 out. 2016.

KONING, M. (2002). **Optimierung in der biologischen ex situ Bodensanierung**. Stuttgart: Abfallaktuell.

LIEBEG, Elizabeth Ward; CUTRIGHT, Teresa J.. **The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil**. International Biodeterioration & Biodegradation, Londres, v. 44, n. 2, p.55-64, jul. 1999. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/223108815_The_investigation_of_enhanced_bioremediation_through_the_addition_of_macro_and_micro_nutrients_in_a_PAH_contaminated_soil>. Acesso em: 30 mar. 2017.

LIMA, Danusia Ferreira; OLIVEIRA, Olívia Maria Cordeiro de; CRUZ, Manuel Jerônimo Moreira. **Utilização Dos Fungos Na Biorremediação De Substratos Contaminados Por Petróleo: Estado Da Arte**. Cadernos de Geociências, Salvador, v. 2, n. 8, p.113-121, nov. 2011. Disponível em: <<https://portalseer.ufba.br/index.php/cadgeoc/article/view/5553/4041>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

MARIANO, Adriano Pinto. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS E DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS CONTAMINADOS COM ÓLEO DIESEL**. 2006. 163 f. Tese (Doutorado) - Curso de Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro, 2006. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/102864/mariano_ap_dr_rcla.pdf?sequence=1>. Acesso em: 25 out. 2016.

MUTECA, Felisberto Lucas Luís. **Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://186.202.79.107/download/biorremediacao-de-solo-contaminado-com-oleo-cru.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2016.

OLIVEIRA, Rosiane Martins; ALVES, Fabiana. **Diversidade microbiana utilizada na biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados**. 2013. 16 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Belo Horizonte, 2013. Disponível em: <<http://www3.izabelahendrix.edu.br/ojs/index.php/aic/article/view/399>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

PRITCHARD, P. H.; COSTA, C. F. EPA's **Alaska oil spill bioremediation project**. Environmental Science and Technology, v.25, p. 372–379, 1991.

REATTO, A.; MARTINS, E. S. **Classes de solo em relação aos controles da paisagem do bioma cerrado**. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C.; FEFILI, J. M. (Org.). Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005 p. 47-60

ROBB, J. & MOYER, E. **Natural attenuation of benzene and MTBE at four midwestern retail gasoline marketing outlets**. Contam. Soil Sed. Water, Spring: 67-71, 2001

SENKOVSKI, Antônio. **Petrobras é condenada a pagar cerca de R\$ 1,4 bi por derramamento de óleo**. 2013. Disponível em: <<http://www.gazetadopovo.com.br/vida-e-cidadania/petrobras-e-condenada-a-pagar-cerca-de-r-14-bi-por-derramamento-de-oleo-corgj02dyvox0v2d7qzkendqm>>. Acesso em: 30 out. 2016.

SINGLETON, I. **Fungal remediation of soils contaminated with persistent organic pollutants**. In G.M. Gadd (ed.) Fungi in bioremediation. v. 23, p. 79–96, 2001.

SPINELLI, L.F. **Biorremediação, Toxicidade e Lesão Celular em derrames de gasolina**. Tese (Doutorado em Engenharia/Civil)– Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. 218p. Sustentabilidade. Editora Atlas: São Paulo, SP, 2008.

VIDALI, M.. **Bioremediation. An overview**. Pure And Applied Chemistry, Londres, v. 73, n. 7, p.1163-1172, 04 ago. 2011. Disponível em: <http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/43833353/pdf.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAJ56TQJRTWSMTNPEA&Expires=1477944409&Signature=vLc54+iMMtDEAALs4oNFkFMww9A=&response-content-disposition=inline; filename=Bioremediation._An_overview.pdf>. Acesso em: 25 out. 2016.