

Bioremediation of a sand soil contaminated by simulated spill of benzene, toluene and xylene Biorremediação de solo arenoso contaminado por derrame simulado com benzeno, tolueno e xileno

Títulos abreviados:

Bioremediation in a sand soil

Biorremediação em solo arenoso

Roque Lourenço Zilio¹, Jeferson Crizel Pinheiro Holz¹, Pâmela Gunder Goularte¹,
Elisangela Martha Radmann¹, Helen Treichel^{2*} e Jorge Alberto Vieira Costa¹

ABSTRACT

This study aimed at evaluating benzene, toluene and xylene (BTX) bioremediation in sand soil, as well as the percolation of these compounds, using a biosurfactant produced by *Corynebacterium aquaticum* and a final electron acceptor (NO₃⁻). Bioremediation was carried out *ex situ* in a non-sterile sand soil, using polyvinyl chloride (PVC) reactors at four different biosurfactant and final electron acceptor concentrations. Under the evaluated conditions the studied compounds did not percolate to a depth of 0.4 m and no risk of contamination of the groundwater stock (2 m from the surface) was verified.

Keywords: Biosurfactant, hydrocarbons, *Corynebacterium aquaticum*.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar a biorremediação de benzeno, tolueno e xileno (BTX) em solo arenoso, bem como avaliar a percolação destes compostos usando biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* e um receptor final de elétrons (NO₃⁻). A biorremediação foi avaliada *ex-situ* em um solo arenoso não estéril, usando reatores de cloreto de polivinila (PVC) usando quatro diferentes biossurfactantes e diferentes concentrações finais de aceptores de elétrons. Nas condições avaliadas, os compostos estudados não percolaram em uma profundidade de 0,4m, o que não oferece risco de contaminação de lençóis freáticos até 2m de profundidade.

Palavras-chave: Biossurfactante, hidrocarbonetos, *Corynebacterium aquaticum*.

¹ Laboratório de Engenharia Bioquímica, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Fax: +55-53-3233 8745.

² Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal da Fronteira Sul, Av. Dom João Hoffman, 313, Erechim, RS, Brasil.

* Corresponding author: helentreichel@gmail.com

INTRODUÇÃO

A grande preocupação mundial é a liberação de hidrocarbonetos para o meio ambiente, proveniente de atividades industriais e de derramamentos acidentais de petróleo e seus derivados. Micro-organismos que possam lisar, degradar, adaptar, crescer e proliferar em ambientes contendo hidrocarbonetos tem um papel importante no ensaio biológico deste tipo de poluição (ALEXANDER, 1999).

Biossurfactantes são emulsificantes naturais de hidrocarbonetos e podem ser produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras. São polímeros, total ou parcialmente extracelulares (BICCA; FLECK; AYUB, 1999; BANAT et al., 2010). Segundo Banat et al. (2000), estes compostos podem ser classificados quimicamente como glicolipídios, lipossacarídios, lipopeptídios, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros.

Em função da presença de grupos polares e apolares na mesma molécula, os biossurfactantes tendem a se distribuir nas interfaces (água/óleo ou ar/água) com diferentes graus de polaridade, reduzindo a tensão interfacial e superficial, o que os tornam adequados para diversas aplicações industriais, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (GOUVEIA et al.; 2003; NITSCHKE; PASTORE, 2002; MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000).

Os biossurfactantes vêm sendo testados em aplicações ambientais como na biorremediação, dispersão de efluentes oleosos, na otimização e recuperação de óleos. São compostos que podem substituir os surfactantes químicos no futuro, principalmente nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica, produtos de limpeza industrial, produtos químicos agroindustriais e no processo de biorremediação, já que são biodegradáveis, baixa toxicidade e possuem estabilidade em extremos de pH, temperatura e salinidade (CHEN et al., 2007; MAKKAR; CAMEOTRA, 1998)

A maioria dos surfactantes disponíveis no mercado são sintéticos, produzidos a partir dos derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes naturais (biossurfactantes) como uma alternativa aos produtos já existentes (BOGNOLO, 1999).

Os surfactantes, em particular, podem interagir com os compostos presentes nos hidrocarbonetos e aumentar a solubilidade dos mesmos em água.

Desta forma, a presença de surfactantes, naturais e ou sintéticos, aumenta a disponibilidade dos contaminantes aos microrganismos, e conseqüentemente à biorremediação (RIZZO et al., 2006).

Os micro-organismos anaeróbios estritos utilizam diferentes aceptores como, nitratos (NO_3^-), sulfatos (SO_4^{2-}) e íons férricos (Fe_3^+) para metabolizar hidrocarbonetos. Enquanto outros anaeróbios (aerotolerantes) crescem na presença de concentrações-traços de oxigênio dissolvido, porém não utilizam este gás metabolicamente (MADIGAM; MARTINKO, 1997; BERTHE-CORTI; FETZNER, 2002).

Os micro-organismos aeróbios precisam da presença de oxigênio molecular para seu crescimento e para converter os hidrocarbonetos em CO_2 , H_2O e biomassa. Já os micro-organismos facultativos podem crescer na presença (aerobiose) ou ausência (anaeróbios, fermentação) de oxigênio. (BERTHE-CORTI; FETZNER, 2002; PETERS; WALTERS; MOLDOWAN, 2005).

Segundo Alexander (1999), em certos ambientes contaminados a propagação de oxigênio nos solos é insuficiente para manter os níveis necessários da atividade aeróbica para a efetiva remediação. Na ausência de oxigênio, a biodegradação pode ocorrer numa variedade de meios anaeróbicos que incluem a desnitrificação, redutores de sulfato, metanogênicos redutores do ferro.

Assim, é importante avaliar os possíveis danos causados por misturas complexas de hidrocarbonetos com diferentes graus de volatilização, como compostos alifáticos (alcanos, cicloalcanos e alquenos), aromáticos (benzeno, etilbenzeno, tolueno e xilenos (BTEX)) e aditivos, com cadeias carbônicas compreendidas na faixa de 5 a 10 carbonos por molécula. Dentre os hidrocarbonetos, os monoaromáticos BTEX têm maior solubilidade em água e, portanto, são os poluentes que primeiro irão atingir o lençol freático (MORAIS; TAU-K-TORNISIELO, 2004). Os compostos BTEX podem causar sérios riscos à saúde humana, principalmente devido ao caráter tóxico, mutagênico e carcinogênico.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a biorremediação de solo arenoso contaminado por derrame simulado de benzeno tolueno e xileno (BTX) utilizando-se a bactéria *Corynebacterium aquaticum*. Neste estudo avaliou-se o efeito da adição de biossurfactante e doceptor final de elétrons (NO_3^-), além da percolação destes.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção do biossurfactante

Crescimento e manutenção do micro-organismo

Para a realização dos ensaios foi utilizada a bactéria *Corynebacterium aquaticum*, cedida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP).

As culturas de bactérias foram mantidas sob refrigeração, em tubos de ensaio e em erlenmeyers contendo ágar nutriente, que foi formulado conforme a seguir (g.L⁻¹): extrato de carne (1,0); extrato de levedura (2,0); peptona (5,0); NaCl (5,0) e ágar-ágar (15,0) (MAKKAR; CAMEOTRA, 1998).

A propagação dos inóculos foi realizada em frascos erlenmeyers contendo ágar nutriente, formulado conforme a seguir (g.L⁻¹): extrato de carne (1,0); extrato de levedura (2,0); peptona (5,0); NaCl (5,0), onde foi inoculada a cultura e seu crescimento foi acompanhado por 48 h a 30 °C. Após, foi realizada a raspagem da superfície do ágar com meio nutriente e ao atingir a densidade ótica 0,8-0,9 em comprimento de onda de 600 nm, as suspensões foram utilizadas como inóculos, sendo adicionadas ao meio de cultura na concentração de 2% (v/v) (MAKKAR; CAMEOTRA, 1998).

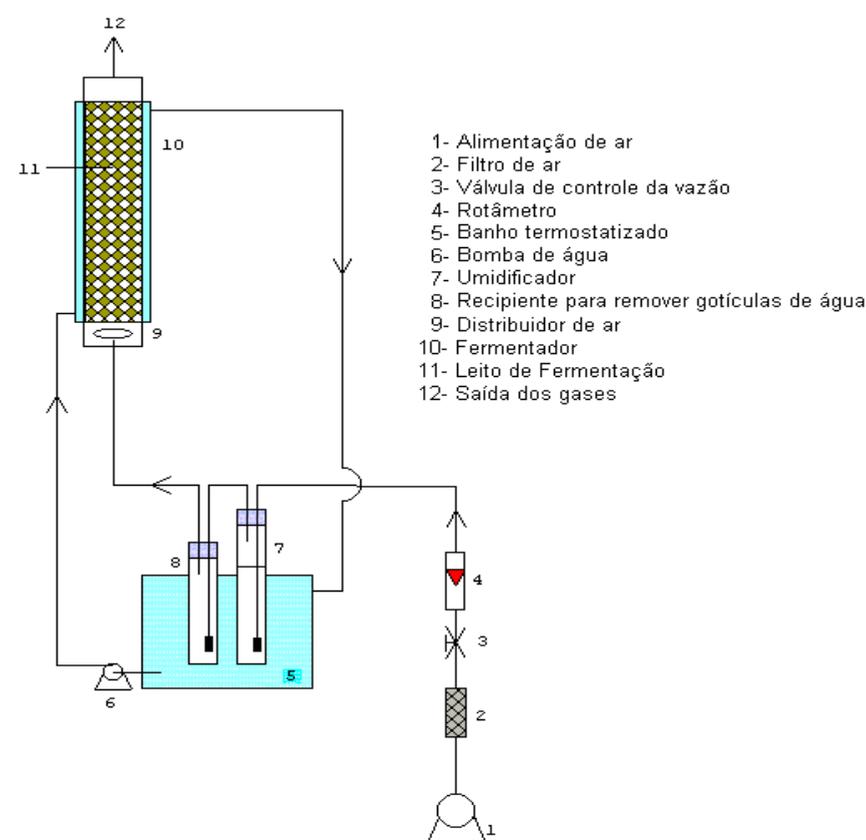
Cultivo em processo aeróbio

O cultivo aeróbio foi realizado em estado semi sólido em biorreatores de coluna de leito fixo, com dimensões internas 50 x 250 mm (diâmetro e altura). O ar do compressor (Schulz, Modelo: Bravo CSL 20, Brasil) que alimentou às colunas passou primeiramente por filtros preenchidos com lã de vidro, e sua vazão foi regulada por rotâmetros (Cole-Parmer Instrument Company, EUA) previamente calibrados. A corrente de ar foi umidificada, e em seguida, realizada a remoção das gotas, sendo posteriormente injetado nas colunas. A temperatura de incubação do meio foi mantida constante em 30 °C por um banho termostatzado (modelo Q 214m2, Quimis, Brasil), pela circulação de água através do encamisamento do biorreator. O material utilizado foi todo esterilizado a 121 °C por 15 min em autoclave (modelo AY 137, Phoenix, Brasil). A umidade foi fixada em 65%. Os cultivos aeróbios foram conduzidos durante 144 h.

O meio de cultivo foi composto de casca de arroz e farelo de trigo nas

proporções 15 e 85%, respectivamente, com adição de solução nutriente composta por: 4 g de NH₄NO₃; 0,822 g de KH₂PO₄; 0,0008 g de CaCl₂; 10,7182 g de Na₂HPO₄; 0,1971 g de MgSO₄; 0,0011 g de FeSO₄ e 0,0015 g de EDTA, e elevado ao volume final de 1 L (adaptado de COOPER; GOLDENBERG, 1987). Não foi adicionada fonte de carbono, visto que esta é proveniente do farelo de trigo e casca de arroz. O farelo de trigo a ser utilizado foi recolhido em peneiras de diâmetros 0,42 a 0,50 mm. A Figura 1 mostra o esquema do cultivo em estado sólido em biorreator de coluna.

Figura 1. Esquema de cultivo em estado sólido em biorreator de coluna (COSTA, 1996).



Extração do biossurfactante

A extração do biossurfactante foi realizada com água a 90 °C na proporção 1:9 (farelo fermentado:solvente). (MARTINS, 2007). Após a adição do solvente, a amostra foi submetida à agitação em shaker (B. Braun Certomat BS-1, USA) a 160 rpm e 50 °C por 30 min, sendo após filtrada à vácuo para a retirada de excesso

de sólidos presentes. O filtrado foi centrifugado (Presvac,CT12,Argentina) a 7000 rpm por 15 min, o sobrenadante foi recolhido e utilizado para o processo de biorremediação (MARTINS, 2005).

Tensão superficial do biossurfactante

A tensão superficial foi determinada em tensiômetro (Kruss Processor Tensiometer K-9, Alemanha), usando o método do anel Du Nouy. Este tensiômetro determina tensões superficiais e interfaciais com a ajuda de um anel suspenso e fixado em um tensiômetro. A amostra a ser analisada sempre líquida é colocada em um recipiente específico do aparelho, o anel é mergulhado no líquido e zerado. A amostra é então abaixada, de forma que o filme líquido produzido abaixo do anel é alongado. Quando o filme líquido é estendido, uma força máxima é determinada e medida, obtendo-se a tensão superficial. A tensão superficial foi determinada com a amostra em contato com o ar (COSTA et al. 2006; RODRIGUES et al., 2006)

Biorremediação

Coleta da amostra de solo

A coleta do solo arenoso foi realizada em um terminal marítimo de armazenamento de produtos químicos junto ao terminal portuário de Rio Grande (RS) latitude 32°04'09"S e longitude 52°05'15"W.

Montagem dos ensaios

Os ensaios foram realizados na parte externa do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Rio Grande (FURG), em ambiente aberto expostos às condições ambientais naturais, tanto de temperatura quanto umidade e suas variações. A biorremediação ocorreu durante 57 dias em biorreatores de Policloreto de Vinila (PVC) com diâmetro interno de 100 mm e 2 m de altura, posicionados na vertical com a parte inferior vedada e a superior aberta, um total de 4 reatores foram preparados para recolher o drenado e outros 28 reatores que foram sacrificados para a retiradas das amostras.

Os quatro biorreatores usados para a coleta do drenado foram adaptados com uma tela de 200 mesh na parte inferior do reator vedada com um tampão externo e instalado um dreno para a coleta da água proveniente da lixiviação,

quando de precipitação pluviométrica. As amostras drenadas eram recolhidas para posterior análise.

No processo de biorremediação, cada biorreator com diâmetro de 100 mm e 2 m de altura foi totalmente preenchido com 22 kg de areia não estéril. Posteriormente foi realizada a contaminação utilizando 15 mL de mistura benzeno, xileno e tolueno (BTX) na proporção de 1:1:1. A seguir foi adicionado a estes o extrato de biossurfactantes extraído da *C. aquaticum* e a quantidade do acceptor de elétrons (NO_3^-) estequiometricamente calculados.

A quantidade de água inicial foi ajustada para que os ensaios apresentassem o teor máximo de umidade de 15%, sem ajuste até o seu final dos ensaios.

As amostras foram retiradas dos biorreatores através de cisões axiais destrutivas de 50 mm cada uma, abaixo da superfície e acima da base e mantendo o centro para as outras amostragens nas distâncias 0,40 m, 0,80 m, 1,20 m e 1,60 m, totalizando 6 amostras para cada experimento.

A Tabela 1 apresenta os valores reais das variáveis de concentração do acceptor de elétrons e do biossurfactante que foram estudadas para o solo arenoso. A umidade inicial foi 15% para todos os ensaios.

O cálculo para 100% do acceptor nitrato (NO_3^-) foi referenciado com relação ao número de carbono existente na amostra através de balanceamento estequiométrico.

Tabela 1. Valores reais das variáveis de concentração do acceptor de elétrons e do biossurfactante.

Ensaio	Concentração do acceptor (%)	Concentração de biossurfactante (%)
1	0	0
2	100	0
3	100	200
4	0	200

Adição do biossurfactante

O solo foi tratado com concentrações de 200% de biossurfactantes extraído do farelo proveniente do crescimento aeróbio da *C. aquaticum* calculados após a análise, de emulsão dos compostos em análise, benzeno, tolueno e xileno (BTX) na proporção de 1:1:1.

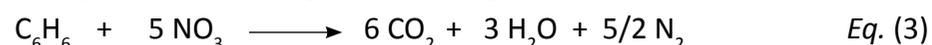
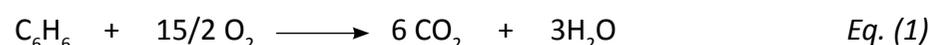
Foram testados os biossurfactantes produzidos pela *C. aquaticum*. A

quantidade (200%) de biossurfactante adicionada foi calculada com base na atividade emulsificante determinada no início dos ensaios.

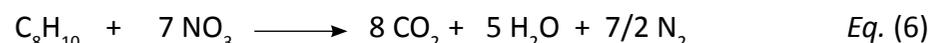
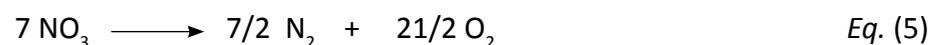
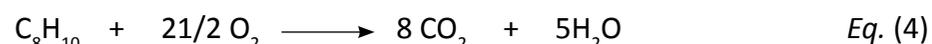
Aceptor de elétrons

Foi testado o aceptor nitrato (NO_3^-) na proporção de 100%, o mesmo foi referenciado com relação ao número de carbono existente na amostra através de balanceamento estequiométrico conforme Equações 1,2 e 3 (adição de benzeno); 4,5 e 6 (adição de xileno) e 7, 8 e 9 (adição de tolueno).

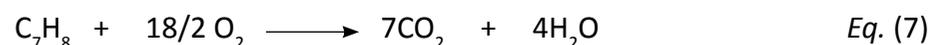
Benzeno



Xileno



Tolueno



A concentração do aceptor e do biossurfactante utilizada foi de 0,05 % sobre a massa de carbono constante no somatório entre benzeno, xileno e tolueno. Em todos os experimentos foi considerado um volume de 5mL de cada solvente para que fosse obtido 0,05 % de biossurfactante e o mesmo foi despejado sobre o solvente simulando um derrame.

Amostragem

Os ensaios de biorremediação tanto para as amostra sólidas como para as amostras líquidas (drenado) foram analisados durante 57 dias, sendo as mesmas

coletadas em 0, 2, 7, 14, 21, 30 e 57 dias para as determinações de benzeno, tolueno e xileno (BTX), nitrogênio, umidade, tensão superficial, temperatura e pH.

Determinações analíticas para a biorremediação

Os máximos e mínimos valores de temperatura foram verificados diariamente no local da biorremediação, através de um centro de aquisição de dados (Fieldchrt, Novus, 8C, U.S.A). Dados foram coletados desde o fundo do reator até a superfície com uma distância de 40 cm entre os pontos, totalizando seis (6) pontos de medição. A amostragens foram realizadas em intervalos de tempo de 30 min em cada tomada de temperatura, com o uso do referido registrador.

No processo de biorremediação, a medição do pH foi realizada em todos os pontos de amostragens, nos tempos 0, 2, 7, 14, 21, 30 e 57 dias, através de potenciômetro digital (modelo Q-400PM, Quimis, Brasil) utilizando eletrodo combinado tipo espada (modelo V627, Analion, Brasil).

O teor de umidade foi determinado segundo metodologia da AOAC (2001), baseada na perda de peso após a secagem em estufa a 105 °C até peso constante.

O teor de nitrogênio dos ensaios foi determinado pelo método Macro-kjeldahl segundo Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1995).

As análises de benzeno, tolueno e xileno (BTX) foram realizadas por cromatografia a gás utilizado Cromatógrafo gasoso (Autosystem, U.S.A) equipado com coluna capilar HP5 Cross Linked Metil Silicone - 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro, filme de 5% metil-fenil-silicone com espessura de 0,25 μm usando amostrador *Headspace* Perkin Elmer HS 40xl, (EPA 5021-96,1996) com gás de arraste Nitrogênio, fluxo de 6mL min^{-1} e modo de injeção por *Headspace*: A concentração dos compostos foi realizada diretamente pelo software, *Totalchrom* ou pelo cálculo das áreas obtidas dos cromatogramas.

A classificação geral do solo foi realizada segundo metodologia proposta por Suguio (SUGUIO, 1973). O peneiramento do solo foi realizado utilizando peneiras com Tyler entre 8 e 200 (4,0 e 0,062 mm, respectivamente), sendo a massa retida em cada uma das peneiras comparada à Escala de Wentworth. (BORDEN; GOMEZ; BECKER, 1995).

As análises de tensão superficial foram realizadas em tensiômetro (Kruss

Processor Tensiometer K-9, Alemanha) usando o método do anel Du Nouy, sendo a tensão medida com a amostra em contato com o ar (COSTA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Com o peneiramento do solo, este foi classificado como areia média por atingir um percentual de 74,83% em massa retido em peneira de 0,250 mm. Foram utilizadas peneiras de 4,00 a 0,062 mm, sendo a massa retida em cada uma das peneiras conforme Tabela 2, comparada à Escala de Wentworth (SUGUIO, 1973).

Os ensaios de biorremediação foram realizados durante 57 dias em sistemas abertos expostos às condições ambientais e naturais, tanto de temperatura quanto umidade. A temperatura foi monitorada ao longo do processo de biorremediação, sendo a mínima detectada no local 2,5 °C e a máxima 28,1 °C conforme Tabela 3.

Tabela 2. Classificação do solo arenoso (SUGUIO, 1973).

Tyler	Abertura (mm)	Classificação	Solo retido (%)
-5+9	4,00 a 2,00	Grão	0,00
-9+16	2,00 a 1,00	Areia muito grossa	3,11
-16+32	1,00 a 0,50	Areia grossa	1,45
-32+60	0,50 a 0,250	Areia média	74,83
-60+115	0,250 a 0,125	Areia fina	19,05
-115+250	0,125 a 0,062	Areia muito fina	1,50

Tabela 3. Temperaturas máximas e mínimas registradas durante o período de biorremediação.

Tempo (dia)	$T_{\max \text{ média}}$ (°C)	T_{\max} (°C)	$T_{\min \text{ média}}$ (°C)	T_{\min} (°C)
0	17,15±2,6	21,0	6,6±1,3	5,3
2	19,05±2,6	23,1	7,8±1,7	5,5
7	16,72±0,8	18,2	13,2±0,4	12,5
14	16,55±1,8	18,8	5,7±1,7	4,2
21	17,45±1,3	19,8	7,2±1,6	5,3
30	24,3±1,9	28,1	13,2±1,0	12,1
57	14,5±1,5	16,7	3,5±0,7	2,5

$T_{\max \text{ média}}$: temperatura máxima média do dia ± desvio padrão; T_{\max} : temperatura máxima alcançada no dia; $T_{\min \text{ média}}$: temperatura mínima média do dia ± desvio padrão; T_{\min} : temperatura mínima alcançada no dia.

O pH do solo variou de 4,6 a 8,6. Para o líquido drenado o maior valor de pH detectado foi 10,2 e o menor valor 7,9. A Tabela 4 apresenta os valores máximos e mínimos para os parâmetros avaliados para benzeno, tolueno e xileno.

Tabela 4. Valores máximos e mínimos para os parâmetros avaliados para benzeno, tolueno e xileno.

Parâmetros	ENSAIO 1		ENSAIO 2		ENSAIO 3		ENSAIO 4	
	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín
pH	8,6	7,1	8,6	4,6	8,6	4,6	8,3	6,5
Umidade (%)	21,5	3,6	21,2	2,8	21,2	2,8	23,8	4,0
Nitrogênio (% em base seca)	0,11	0,02	0,11	0,01	0,10	0,01	0,11	0,02
Tensão superficial (mN.m ⁻¹)	71,5	59,2	71,8	53,5	71,8	53,5	71,5	56,6

Máx: valor máximo; Mín: valor mínimo

Nas amostras de solo, o nitrogênio não teve variação na concentração máxima nos diferentes ensaios. Nos ensaios 1 e 4 o nitrogênio foi reduzido em 5,5 vezes, e nos ensaios 2 e 3 seu consumo foi 10 vezes o seu valor máximo detectado.

A maior variação do pH ocorreu nos ensaios dois e três, quando foi utilizado nitrato como aceptor. Segundo Borden et al. (1995), o aumento nos valores de pH pode ser creditado ao consumo de íons H⁺ durante a redução de íons férricos ou de nitrato, o que não foi efetivado nestes ensaios.

Quando utilizou-se biossurfactante ensaio quatro a variação do pH foi menor e seus valores registrados foram de 8,3 a 6,5. Esta faixa de pH é o ótimo para o desenvolvimento de bactérias, o que torna a decomposição dos poluentes mais rápida.

Parr e Kla (1983), relataram que a atividade microbológica no solo é fortemente afetada pela disponibilidade de nutrientes, compostos tóxicos e pela tolerância dos próprios micro-organismos às variações do pH. Alguns micro-organismos têm uma maior tolerância a variações de pH enquanto outros suportam apenas pequenas variações. Bactérias têm seu pH ótimo próximo a 7,0.

Se o pH é ácido, normalmente os micro-organismos não conseguem competir com os fungos, devido aos nutrientes disponíveis.

A menor tensão superficial (TS) ocorreu quando foi utilizado apenas o acceptor, variando de 71,8 a 53,5 mN.m⁻¹. Quando consorciado acceptor e biossurfactante o valor da TS reduziu de 71,5 para 53,5 mN.m⁻¹. Para o ensaio realizado com biossurfactante a TS variou de 71,5 a 56,6 mN.m⁻¹ durante o processo de biorremediação. Uma provável situação para a menor TS quando se utilizou nitrato como acceptor é a existência de micro-organismos na biota nativa, já que a amostra utilizada não era estéril, ocasionando aumento no número de micro-organismos com características denitrificantes, e estes por sua vez produzirem biossurfactante extra ou intracelular, reduzindo assim a tensão superficial.

Valores acima de 0,01 mg.kg⁻¹ de BTX, pela toxicidade dos compostos aromáticos, são considerados elevados (CETESB, 2011). Os resultados obtidos estão associados à fração volátil, no entanto, há possibilidade de que uma quantidade destes aromáticos possivelmente tenha sido adsorvida pela sílica da matriz utilizada como adsorvente no experimento, tornando os valores reais maiores que os detectados.

Em todos os ensaios realizados, o benzeno, tolueno e xileno (BTX) foram detectados até o segundo dia de amostragem (apenas na superfície), não sendo detectado no segundo ponto de amostragem a 0,40 m abaixo da superfície. Isto sugere que a percolação nas condições de estudo não ocorreu em níveis detectáveis em nenhum dos 4 ensaios realizados, o que não significa que não viesse a ocorrer se os níveis de contaminantes fossem mais elevados.

Neste estudo as lixiviações provenientes das precipitações pluviométricas ocorridas no período de detecção, não proporcionaram o arraste dos compostos benzeno, tolueno e xileno para um possível lençol freático de 2 m de profundidade, possivelmente porque seus coeficientes de solubilidade em água são baixos (0,07%, 0,05% e insolúvel, respectivamente) (PERRY; CHILTON, 1980).

O biossurfactante age como redutor da tensão superficial e interfacial. O decréscimo dessa tensão faz com que haja um aumento da área de contato e a quebra dos compostos na forma de micela, diminuindo a área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e a água, facilitando a dispersão dos contaminantes no ambiente e sua consequente metabolização pelos micro-organismos presentes no meio.

Para metabolizar hidrocarbonetos, micro-organismos anaeróbios estritos utilizam diferentes aceptores, um deles o nitrato, cuja função é aumentar a ação redutora em uma série de etapas sucessivas. Com a oxidação dos contaminantes, na degradação dos compostos carbonados, o acceptor é reduzido a nitrito (óxido nitroso) e então gás dinitrogênio, aumentando assim a ação dos micro-organismos (ALEXANDER, 1999).

A Tabela 5 apresenta as concentrações de benzeno, tolueno e xileno, determinadas para os ensaios: (1) zero de acceptor e zero de biossurfactante, (2) 100% de acceptor e zero de biossurfactante, (3) 100% de acceptor e 200% de biossurfactante, (4) zero de acceptor e 200% de biossurfactante.

Analisando as propriedades físico-químicas dos contaminantes (Tabela 6) e os níveis detectados na cromatografia gasosa extraídos do *Headspace* (Tabela 5) foi observado que no caso do benzeno (menor ponto de ebulição) obteve menor concentração que o controle, visto que era esperado no caso de ser associado ao acceptor ou ao biossurfactante. O acceptor (ensaio 2) não afetou a distribuição dele na porção volátil, ou seja, estava em maior concentração que os demais em função de sua maior volatilidade. Em presença do acceptor/biossurfactante (ensaio 3) o efeito de volatilização do benzeno está reduzido, como mostra a sua menor concentração na mistura de vapores. No ensaio 4 (biossurfactante) a presença de benzeno na superfície volátil foi cerca de 10 vezes menor que o controle.

Tabela 5. Concentrações de Benzeno Tolueno e Xileno (mg.kg⁻¹), detectadas nos ensaios.

Ensaio	Benzeno	Tolueno	Xileno
1.1.0	980	2137	2938
1.1.2	< 1	< 1	27
1.1.7	< 1	< 1	< 1
1.1.14; 1.1.21; 1.1.30; 1.1.57	< 1	< 1	< 1
2.1.0	10609	2381	3315
2.1.2	< 1	< 1	28
2.1.7	< 1	< 1	< 1
2.1.14; 2.1.21; 2.1.30; 2.1.57	< 1	< 1	< 1
3.1.0	688	1382	1918
3.1.2	< 1	< 1	< 1
3.1.7	< 1	< 1	< 1
3.1.14; 3.1.21; 3.1.30; 3.1.57	< 1	< 1	< 1
4.1.0	97	488	1178
4.1.2	< 1	< 1	6
4.1.7	< 1	< 1	< 1
4.1.14; 4.1.21; 4.1.30; 4.1.57	< 1	< 1	< 1

Nomenclatura de cada ensaio i.ii.iii, onde (i) número do ensaio (ii) local da amostragem e (iii) tempo de coleta em dias.

A Tabela 6 apresenta as propriedades físico-químicas dos contaminantes benzeno, tolueno e xileno.

Tabela 6. Propriedades físico-químicas dos contaminantes.

	PF	PE (°C)	Viscosidade (cp, 20 °C)	PM (g.mol ⁻¹)
Benzeno	5,5	80,1	0,625	78,11
Tolueno	-95,0	110,8	0,590	92,14
Xileno	13,3	144,0	6,475	106,16

PF: ponto de fusão; PE: ponto de ebulição; PM: peso molecular. (Fonte: SILVA et al., 2009)

Os contaminantes tolueno e xileno por possuírem pontos de ebulição e massa molar maior que o benzeno, quando tratados com aceptor/biossurfactante (ensaio 3) e biossurfactante (ensaio 4) apresentaram concentrações menores que o controle o que não ocorreu quando estes foram tratados apenas com o aceptor de elétrons (ensaio 2), logo a possibilidade de retenção destes pela ação do biossurfactante quando analisados por *Headspace* tornou-se notória.

No ensaio 2, com aceptor de elétrons, todos os contaminantes estavam na camada volátil da superfície tratada. A concentração no ensaio 4 foi a que menos favoreceu a volatilização.

Considerando a viscosidade e a massa molar do contaminante xileno, fica evidente a associação deste com o biossurfactante, visto pela migração ao longo do tempo para as camadas mais profundas. Esperava-se que o xileno com uma viscosidade aproximadamente 10 vezes superior aos demais (benzeno e tolueno) e massa molar elevada, mostrasse maior migração, o que não foi verificado.

CONCLUSÃO

Nas condições de contaminação, com mistura equivalente a 5 mL de cada solvente (benzeno, xileno e tolueno) por 22 kg de areia não estéril com 15% de umidade inicial. O ensaio com biossurfactante influenciou a concentração dos contaminantes. Dos contaminantes usados para a biorremediação, o xileno foi o que permaneceu por mais tempo na superfície contaminada. Um tempo maior de retenção deste contaminante deve-se ao fato deste possuir maior ponto de fusão 13,3 °C, ponto de ebulição 144 °C e viscosidade de 6,475 cp a 20 °C em

relação aos outros contaminantes, benzeno e tolueno.

Os contaminantes utilizados no derrame simulado não ofereceram risco de percolação, para uma profundidade de 0,40 m no reator utilizado e que com a proporção 1:1:1 totalizando 15 mL da mistura de benzeno tolueno e xileno (BTX), estes contaminantes não oferecem riscos de percolação até o lençol freático, neste caso situado a 2 m da superfície, pois não foram detectados nas amostras recolhidas pelo processo de lixiviação natural decorrente de chuvas coletadas no final do reator.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. Biodegradation and Biorremediation. Academic Press. 2ª Ed., New York, 453p., 1999.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. APHA, Washington, DC., 1995.
- AOAC- Association of Official Chemists. Official Methods of Analysis. 17th, 2001 CD-Rom.
- BANAT, I. N.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., MARTINOTTI, M. G., FRACCHIA, L., SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 87, p. 427-444, 2010.
- BERTHE-CORTI, L.; FETZNER, S. Bacterial Metabolism of n-Alkanes and Ammonia under Oxic, Suboxic and Anoxic Conditions. Acta Biotechnology. v. 3-4, p. 299-336, 2002.
- BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. Revista de Microbiologia, v. 30, p. 231-236, 1999.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids and Surfaces. v. 152, p. 41-52, 1999.
- BORDEN, R. C.; GOMEZ, C. A.; BECKER, M. T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. Ground Water, v. 33, n. 2, p. 180-189, 1995.
- CHEN, S. Y.; LU, W. B.; WEI, Y. H.; CHEN, W. M.; CHANG, J. S. Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. Biotechnology Progress, v. 23, p. 661-6, 2007.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. Applied and Environmental Microbiology. v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

COSTA, J. A. V. Produção de amiloglicosidase por fermentação em estado sólido em biorreator de coluna. Campinas, 1996. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP (UNICAMP).

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 483-488, 2006.

GOUBEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. M. Bactérias produtoras de biossurfactantes – Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 30, 2003.

CETESB. www.cetesb.sp.gov.br/soloarea_contaminados/anexo/6530, acessada em maio 2011.

MADIGAM, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms. 8ª ed. New Jersey, Prentice-Hall., 606-768, 1997.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v. 20, p. 48–52, 1998.

MARTINS, R. G.; PINTO, M. H.; SILVA, M. A.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Influência do teor de umidade e estudo da condição de extração na produção de biossurfactante pela bactéria *Corynebacterium aquaticum* em processo fermentativo em estado sólido. Resumo publicado no XIX Salão de Iniciação Científica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, 2007a.

MARTINS, R. G.; PINTO, M. H.; SILVA, M. A.; COSTA, J. A. V. Biossurfactante bacteriano e fúngico: produção através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais. Artigo publicado no XXII Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia. Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo-RS, 2007b.

JENSEN, G. K.; STAPELFELDT, H. Incorporation of whey proteins in cheese. Including the use of ultrafiltration. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Factors Affecting the Yield of Cheese**. 1993, Brussels: International Dairy Federation Special Issue, n. 9301, chap. 9, p. 88-105.

MAYER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 54, p. 625- 633, 2000.

MORAIS, E.B., TAU-K-TORNISIELO, S.M. Crescimento de bactérias isoladas de solo em gasolina. *Arquivos do Instituto biológico*, v. 71, p. 272-274, 2004.

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

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

PERRY, R. H.; CHILTON, C. H. Manual de engenharia química, 5ª ed., Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1980.

PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; MOLDOWAN, J. M. The Biomerker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History. vol. 1, 2nd Ed, Cambridge University Press. 2005.

RIZZO, A.C.L., LEITE, S.G.F., SORIANO, A.U., SANTOS, R.L.C., SOBRAL, L.G.S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. Série tecnologia Ambiental. STA-37, CETEM/MCT, 2006.

RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus strains*. *Biochemical Engineering Journal*.v. 28, p. 109-116, 2006.

Silva, F.L.N., Santos Jr., J.R., Moita Neto, J.M., Silva, R.L.G.; Flumignan, D.L., Oliveira, J.E. Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do estado do Piauí. *Química Nova* v. 32, p. 56-60, 2009.

SUGUIO, K. Introdução à Sedimentologia. Ed. Edgard Blücher, 1973.

Received 27 October 2012
Accepted 27 March 2013