

VI-019 - ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS PARA TRATAMENTO DE ÁGUA SUBTERRÂNEA DE ÁREAS CONTAMINADAS POR HIDROCARBONETOS

Karina Schu dos Santos Reschke

Bacharel Em Química, Universidade Luterana do Brasil (Ulbra). Mestre em Engenharia Civil na área de Gerenciamento de Resíduos – PPGEC/UNISINOS

Marcelo Oliveira Caetano

Professor Mestre da Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Luciana Paulo Gomes

Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Endereço⁽¹⁾: Laboratório de Saneamento Ambiental (6B 201) - Av. Unisinos, 950 – Cristo Rei – São Leopoldo - RS - CEP: 96022-000 - Brasil - Tel: +55 (51) 3592-1122 – R.1699 e-mail: lugomes@unisinos.br

RESUMO

A presente pesquisa avaliou, por métodos microbiológicos, como por exemplo: crescimento microbiano, meio seletivo para fungos, isolamento, detecção de ramnolipídios e teste de degradabilidade, os processos envolvidos com a recuperação de áreas degradadas por hidrocarbonetos. Foram testadas diferentes concentrações de diesel (1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 30% e 50%) para avaliação do crescimento de microrganismos indígenas de áreas contaminadas de postos de combustíveis, além de verificar-se o potencial de degradação de hidrocarbonetos. Acompanhamentos visuais e microscópicos, além do monitoramento do decréscimo do parâmetro TPH em diversos ensaios foram realizados. Os resultados mostraram que foi possível isolar e caracterizar os microrganismos presentes no local contaminado. Dentre os morfotipos 81,8% eram bactérias Gram negativas, 4,5% bactérias Gram positivas e 13,7% fungos. Nos ensaios com menor concentração de diesel (1%) houve o melhor crescimento de microrganismos o que resultou em maior eficiência no decréscimo do parâmetro de TPH.

PALAVRAS-CHAVE: TPH, Hidrocarboneto, biorremediação.

INTRODUÇÃO

As contaminações ambientais provenientes de derrames de produtos derivados do petróleo junto a reservatórios de armazenamento e vazamentos em tanques e tubulações subterrâneas têm sido objeto de preocupação para a sociedade e o governo em função dos riscos associados a tais problemas, tanto para a segurança e saúde das populações, como para o meio ambiente. A contaminação por estes derivados está relacionada aos hidrocarbonetos aromáticos, destacando-se o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) e os hidrocarbonetos alifáticos, além dos hidrocarbonetos totais de petróleo.

Os efeitos danosos destes produtos na natureza podem ser exemplificados pela inutilização dos pontos de captação de água potável, mortandade de flora e fauna aquática, inutilização de lavouras e plantações, impermeabilização de solos, redução de microrganismos do solo, morte de plantas e árvores, além de riscos de explosão devido à evaporação do produto. Um dos grandes riscos e passivos ambientais reconhecidos refere-se a vazamentos de tanques de combustível em postos de abastecimento. Em grande parte destes postos, os tanques já possuem idade superior a 20 anos e mostram sinais de corrosão e rachaduras, o que provoca vazamentos do estoque. Com isto, os órgãos ambientais de fiscalização, no caso de Porto Alegre, a Fundação de Proteção Ambiental - FEPAM e a Secretaria Municipal de Meio Ambiente - SMAM tem demonstrado grande preocupação com a remediação dessas áreas (TEIXEIRA, 2007).

As ações ambientais neste sentido são diversas, desde legislações, como a do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolução nº 273 de 29 de novembro de 2000, que exige a troca dos tanques antigos por tanques jaquetados (aço carbono revestido com fibra de vidro interno e externamente, com resina resistente a hidrocarbonetos e com sistema de detecção interno de vazamentos) até a recuperação das áreas degradadas. Existem várias formas de remediação deste tipo de passivo, porém todas utilizam tecnologia importada o que

torna o processo altamente custoso e inacessível a muitas empresas. Outro fator é que os processos de remediação atualmente utilizados se baseiam apenas na remoção física destes contaminantes, ou ainda não levam em consideração todos os fatores para uma descontaminação eficiente. Ainda existe o fator operacional, que por muitas vezes pode ser limitante neste processo.

A utilização de processos biológicos para a descontaminação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos tem se tornado uma solução viável e de resultados positivos. O uso de microrganismos é uma alternativa ambiental, que gera a sustentabilidade, visando a minimização dos impactos ambientais gerados pelos tratamentos convencionais. Os principais microrganismos degradadores de hidrocarbonetos são as bactérias e fungos. . Uma comunidade microbiana é mais resistente do que uma cultura pura a produtos tóxicos resultantes da biodegradação, pois um de seus indivíduos pode ser capaz de detoxificá-lo (ARAÚJO, 2002).

A remediação biológica (Biorremediação *in situ*) realizada no local da poluição utiliza a microflora original presente no ambiente, partindo da idéia de que os microrganismos presentes já estão adaptados aos contaminantes existentes. Já a Bioestimulação é realizada através da adição de nutrientes e/ou surfactantes diretamente no local contaminado com o objetivo de aumentar a atividade de populações de microrganismos autóctones degradadores ou a biodisponibilidade do poluente (IQSC, 2006).

O trabalho realizado por Araújo e Lemos (2002), por exemplo, diz respeito ao isolamento e identificação de fungos filamentosos extraídos de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. Através do isolamento, feito a partir de solo do local da contaminação foram obtidas 75 colônias, dentre as quais 60 apresentaram capacidade de degradação de hidrocarbonetos em meio sintético. Como resultados deste estudo as linhagens selecionadas foram submetidas à identificação, que resultaram na divisão dos microrganismos em 4 gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*.

No estudo realizado por Souza et al. (2004) foram testadas amostras poluídas por petroderivados e destes 86 morfotipos isolados, 23 foram fungos filamentosos, que apresentaram potencialidade de degradar os derivados do petróleo

Segundo Andrade (2008), características morfológicas são fundamentais para a caracterização dos microrganismos. Algumas das características morfológicas a serem analisadas podem ser: cor, forma da borda, brilho e consistência da colônia, e a coloração diferencial de Gram, amplamente utilizada para identificar e classificar bactérias, porque reflete uma diferença fundamental na estrutura da parede celular.

O presente trabalho acrescenta estudos microbiológicos para tratamento de água subterrânea de áreas contaminadas por hidrocarbonetos, com os objetivos de caracterizar os microrganismos presentes em local com contaminação por hidrocarbonetos, neste estudo um posto de abastecimento de combustível; isolar microrganismos presentes no local com contaminação por hidrocarbonetos; testar diferentes concentrações de fonte de carbono para crescimento microbiano; avaliar a eficiência de degradação de hidrocarbonetos, neste estudo o diesel, por culturas mistas autóctones da área contaminada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Descrição da área contaminada e coleta de amostras

A água subterrânea contaminada por hidrocarbonetos é oriunda de um posto de abastecimento de combustíveis localizado em Porto Alegre. Este posto de combustível, segundo avaliação ambiental, está contaminado por diesel e possui traços de gasolina. Essa contaminação está relacionada a vazamentos ocorridos nos tanques subterrâneos de estocagem e a vazamentos acidentais e em linhas de transporte (PROJECONSULT, 2009). A amostragem ocorreu antes do tratamento instalado no Posto de Combustíveis. A amostra foi coletada em recipiente de vidro âmbar estéril de 1 litro, sendo encaminhada para a universidade em caixa de isopor para manutenção de temperatura. Durante o período de pesquisa a amostra foi mantida no laboratório sob refrigeração, sendo realizada uma única amostragem para o desenvolvimento do estudo.

Meio de cultura e Fonte de carbono

O meio de cultura utilizado foi o Bushnell-Haas (BH), Como fonte única de carbono foi utilizado o diesel. Este diesel foi coletado no Posto de Combustíveis citado anteriormente, em um recipiente de vidro âmbar estéril de 1 litro, o mesmo não foi auto-clavado nem filtrado para os ensaios.

Avaliação do crescimento microbiano

O crescimento microbiano nos tubos foi avaliado de forma visual em que foram verificadas as alterações de cor (aumento da cor – amarela), da turvação (o diesel é imiscível no meio de cultura, forma um “anel” na parte superior, característica que foi monitorada visualmente). Os tubos foram incubados a 30°C no período de 40 dias.

Foi realizado o acompanhamento do crescimento microbiano de colônias em placas de Petri de forma visual. Foi verificado o crescimento de colônias e suas características morfológicas (coloração, formada colônia, forma da borda, aspecto e consistência) e com auxílio do microscópio a forma da célula e coloração diferencial de Gram (para bactérias). As placas foram incubadas a 30°C no período de 40 dias.

Avaliação do parameto de TPH

Para avaliação da capacidade de degradação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos foi utilizada a cromatografia gasosa, procedimento utilizado também por Teixeira (2007). As amostras para o ensaio de TPH foram analisadas nos tempos: t=0 dia, t=20 dia e t=40 dia.

Os hidrocarbonetos totais de petróleo incluem frações orgânicas oriundas da gasolina (GRO) e do diesel (DRO), neste estudo a fração avaliada é a oriunda do diesel que abrangem os hidrocarbonetos de C₁₀ – C₂₈. A metodologia para determinação do TPH DRO seguiu os procedimentos EPA 3510-d e EPA 8015-d.

Isolamento

O isolamento foi realizado em meio BH sólido com adição das diferentes concentrações de diesel citadas anteriormente. As colônias isoladas foram purificadas por meio da técnica de esgotamento por estrias em placa de Petri, sendo necessárias três repetições placa/tubo/placa. A incubação foi realizada a 30°C e os repiques a cada 48 horas. A morfologia dos isolados foi verificada visualmente e com ajuda de microscópio. Para o isolamento não foi utilizada as concentrações de FC referente a 30% e 50% devido aos resultados obtidos nos ensaios 5 e 6 não serem significativos para estas concentrações.

Meio seletivo, teste de detecção de ramnolipídios, teste de degradabilidade

Para testar o crescimento de algumas espécies, foi utilizado o meio seletivo Sabouraud – SAB, em que a preferência é pelo crescimento de fungos filamentosos e leveduras (ATLAS, 1995). Ao meio Sabouraud foi adicionada, com alça de platina, amostra crescida em BH (24h). As placas foram incubadas a 30°C por um período de 2-3 dias.

A produção de ramnolipídios foi verificada por meio de teste visual, em que foi observado o crescimento dos isolados em meio Azul de metileno, específico para biossurfactantes aniônicos que consiste na detecção de ramnolipídios extracelulares. As placas contendo o meio Azul de metileno foram inoculadas em superfície com alça de platina a 30°C por 24h, utilizando como inóculo colônias de 24h dos isolados de ágar nutritivo.

A avaliação da capacidade de degradação de hidrocarbonetos por microrganismos, em especial diesel, foi testada utilizando-se o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (KUBOTA et al. 2008; LUZ et al. 2011 e a técnica modificada por PIROLLO, 2006). Os resultados foram avaliados por meio de acompanhamentos visuais, sendo que a perda da coloração azul indica que o microrganismo possui capacidade de degradar hidrocarbonetos.

Ensaio

Foram realizados 06 ensaios, sendo que o ensaio 1 (E1) foi considerado preliminar, o qual definiu a metodologia empregada nos demais ensaios. Nesses ensaios foram testadas diferentes concentrações de fonte de carbono, conforme a Tabela 1. Nos ensaios foram realizados acompanhamento do crescimento microbiano nos tubos e nas placa, avaliação do parâmetro de TPH e ensaio de degradabilidade.

Tabela 1: Ensaios para a avaliação quantitativa da degradação de diesel (TPH) e acompanhamento do crescimento microbiológico

TUBO/PLACA	MC (mL)	FC (mL)	A (mL)	FC (%)
B1	9	0,5	0	1%
B2	9	0	1	0
B3	9	0	0	0
1	9	0,1	1	1%
2	9	0,2	1	2%
3	9	0,3	1	3%
4	9	0,5	1	5%
5	9	1	1	10%
6	9	4,3	1	30%
7	9	10	1	50%

Legenda:
 MC – meio de cultura
 FC – fonte de carbono (diesel)
 A – amostra
 B1 – Branco (sem amostra)
 B2 – Branco (sem diesel)

RESULTADOS

Avaliação do crescimento microbiano

No ensaio preliminar (E1) a avaliação das alterações visual dos parâmetros de cor, turvação e consumo de FC foi diretamente proporcional à concentração de diesel adicionada. Nos demais ensaios as alterações visuais nos tubos foram notadas a partir do quinto dia de incubação, sendo mais perceptíveis em todos os ensaios no tubo 1, referente a 1% de FC. No entanto também constatou-se que nas demais concentrações de FC testadas houve alterações visuais, indicativo de crescimento microbiano. Os melhores resultados para 1% sugerem que em menores concentrações de FC o crescimento microbiano é facilitado. Essa relação da modificação visual com o crescimento microbiano foram também sugeridas por Andrade (2008), Ururahy (1998) e Araújo e Lemos (2002). Os brancos 1 (sem amostra), 2 (sem FC) e 3 (somente MC) não apresentaram alterações visuais, confirmando a necessidade de um conjunto de fatores: presença de amostra e FC.

Nas placas as alterações foram observadas a partir do segundo dia de incubação, com a formação de colônias. Cabe ressaltar que as alterações (crescimentos) foram verificadas primeiro nas placas e depois nos tubos. Nas placas as alterações ocorrem mais significativamente no início da incubação, enquanto nos tubos notou-se o contrário, sendo as alterações mais perceptíveis ao final do período de incubação. Houve o crescimento de colônias amarelas, brancas, beges e alaranjadas de diferentes formas e tamanhos, ilustradas na Figura 1.



Figura 1: Colônias crescidas, à esquerda E2 – 1%FC, no meio E2 – 10%FC, à direita E4 – 1%FC .

Em todos os ensaios o crescimento de colônias foi positivo, indicativo da confirmação do crescimento microbiano já verificado nos tubos. O crescimento de diferentes morfotipos foi constatado, no E1=14, E2=30, E3=17, E4=32, E5=22 e E6=11. Estes morfotipos foram caracterizados como bactérias Gram positiva, negativa e fungos.

Avaliação do parâmetro de TPH

Nas avaliações visuais e de crescimento (placas e tubos) anteriores para os Ensaios já se havia identificado os maiores crescimentos microbianos nas concentrações de 1% e 2%. Esses resultados foram confirmados pelo consumo de diesel medido indiretamente pelo decréscimo do parâmetro de TPH. Na Tabela 2 pode-se visualizar os resultados obtidos.

Tabela 2: Resultados de TPH ($\mu\text{g/L}$ e %) ao final dos 40 dias

Tubo	E3 (E2+E3)		E4		E5		E6	
	$\mu\text{g/L}$	%	$\mu\text{g/L}$	%	$\mu\text{g/L}$	%	$\mu\text{g/L}$	%
B1	85.000	SR	AP	SR	45.970	24,4	64.028	33,4
B2	756	SR	n.d	SR	n.d	n.d	n.d	SR
B3	ENR	ENR	n.d	SR	n.d	n.d	n.d	SR
1	3.138	73,6	846	87,6	577*	98,9	9.855	84,9
2	ENR	ENR	10.062	41,0	19.463	69,7	18.415	47,3
3	ENR	ENR	7.612	99,6	11.571	84,1	38.323	80,0
4	58.613	22	67.443	92,0	93.128	65,7	21.249	89,1
5	34.909	62,5	137.987	95,9	9.645.351	SR	191.258	SR
6	ENR	ENR	463.077	92,7	57.342	91,0	2.473.988	SR
7	ENR	ENR	487.896	91,7	2.469.983	SR	2.641.946	SR

Legenda: n.d – não detectado no ensaio; SR – sem remoção; *valor abaixo do valor de intervenção

ENR – Ensaio não realizado; AP – amostra perdida;

Verificou-se que apenas no ensaio 5, na concentração 1% de FC, houve remoção de TPH que atingiu os padrões de intervenção aceitáveis, ficando menor que 600 $\mu\text{g/L}$ conforme Lista Holandesa (CETESB, 1999).


Nota-se que o tubo correspondente a 1% FC apresentou bons resultados de degradação, ficando sempre acima dos 70% de remoção final de TPH, com média de 86%, bem como sempre apresentou alterações mais significativas de cor, turvação e consumo de FC, assim como crescimento de diversos morfotipos. Isto indica que baixas concentrações de FC oferecem provavelmente condições adequadas para o crescimento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. Nessa linha de raciocínio, Bento et al. (2005) também testaram a degradação de TPH pelo método EPA 8015 modificado, na comparação entre bioaumento, bioestimulação e atenuação natural com diesel como fonte de carbono, e chegaram a média de 70% de redução de TPH. Verificaram ainda que para biorremediação os melhores resultados foram quando o inóculo de microrganismos foram pré-selecionados a partir do seu próprio ambiente.

Neste estudo foi possível confirmar, por meio dos ensaios de TPH e por observações visuais dos tubos e placas, que na amostra analisada existem culturas mistas que possuem a capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo (diesel). Esse resultado semelhante ao do estudo realizado por Luz et al. (2011), que investigaram o processo de biodegradação por consórcio microbiano ao longo de 21 dias, sendo que os resultados mostraram que houve uma maior diminuição na concentração de compostos na presença deste consórcio, chegando a 35% ao final do período.

Isolamento

Com aplicação da técnica de esgotamento por estrias e utilização de diferentes concentrações de FC, conforme já testadas nos ensaios anteriores, foram isolados 22 morfotipos de diferentes grupos microbianos (bactérias e fungos). Alguns destes morfotipos e suas características podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3: Exemplos de morfotipos caracterizados no isolamento

Placa	% FC	Foto	Forma da célula	Gram	Coloração	Forma e borda	Aspecto	Consistência
1	1		bastão	-	Bege	circular e lobada	opaca	quebradiça
			bastão	-	bege marrom	irregular e irregular	opaca	quebradiça
			bastão	-	amarela	Circular e lisa	opaca	viscosa
			bastão	-	alaranjada	Arredondada e irregular	opaca	viscosa
			filamentosa	X	Preta	circular e lobada	opaca	pouco filamentosa
			filamentosa	X	branca	circular e lobada	opaca	pouco filamentosa

Os isolados obtidos neste estudo foram agrupados em 12 subgrupos com base nas suas características morfológicas e técnica diferencial de Gram. Destes 81,8% são bactérias Gram negativas, 4,5% são bactérias Gram positivas e 13,7% são fungos. Alguns destes morfotipos foram ilustrados na Figura 2.

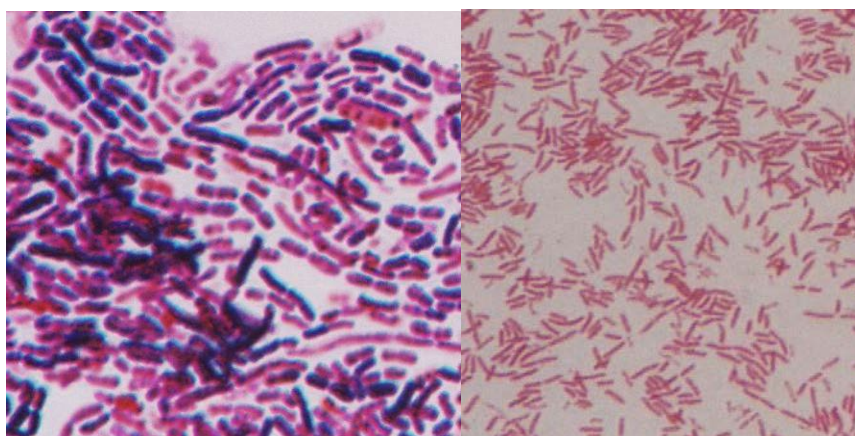


Figura 2: à esquerda bactérias Gram positiva colônia bege 5%FC; à direita bactérias gram negativa colônia bege 1%FC

Andrade (2008) estudou e isolou 37 microrganismos, destes houve uma dominância das bactérias Gram negativas que representaram 86% dos isolados, apenas uma bactéria Gram positiva foi verificada. Neste estudo também as bactérias foram predominantes.

Também Lemos e Araújo (2002) isolaram de solo contaminado de Guararema, 75 colônias, destas 60 apresentaram capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo, que foram identificadas em 4 gêneros fúngicos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*).

Teixeira (2007) isolou de solo contaminado, utilizando gasolina como única fonte de carbono, 37 isolados bacterianos, posteriormente avaliados quanto a morfologia e aspectos visuais das colônias (aspecto, tamanho, coloração, forma e borda da colônia) e das células (teste de coloração de Gram), os quais agrupando-se obteve-se 10 isolados, 7 Gram negativos e forma da célula bastonete, 3 Gram positivos e forma da célula cocos, dentre outros, foram identificadas espécies tipo *Pseudomonas Aeruginosa* e *Pseudomonas Putida*. Da mesma forma, como apresentado neste estudo, foi possível isolar da água contaminada com hidrocarbonetos, utilizando diesel como FC, 22 diferentes morfotipos.

Meio seletivo, teste de detecção de ramnolipídios, teste de degradabilidade

Verifica-se que nos resultados obtidos o crescimento de fungos no meio de cultura seletivo foi positivo, indicando que na amostra testada existe a presença deste morfotipo. Também pode-se confirmar através da visualização microscópica a presença de micélios e hifas septadas, característicos de fungos filamentosos, conforme Tabela 4.

Tabela 4: Resultados meio Sabouraud

Coloração	Forma e borda da colônia testada	Aspecto	Consistência	Indicador redox Tempo (h)
Preta	circular e lobada	opaca	pouco filamentosa	48
branca	circular e lobada	opaca	pouco filamentosa	48
branca	circular	opaca	bastante filamentosa	48

Nos estudos realizados por Lemos e Araújo (2002), utilizando meio específico Sabouraud e BDA, foram isolados 4 gêneros de fungos, subdivididos nos seguintes espécies: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Penicillium corylophilum*, *Paecilomyces variotti*, *Paecilomyces niveus* *Fusarium sp.* Neste estudo também foram isolados alguns fungos, porém o gênero e espécie não foi possível identificar.

Para a amostra testada não foi possível visualizar halos ao redor das colônias, o que pode significar que não houve a produção de ramnolipídios. Neste caso, a possibilidade de dentro os microrganismos existir o gênero *Pseudomonas* é remoto, tendo em vista que em quase todos os casos este tipo de microrganismo produz biosurfactantes do tipo ramnolipídio. Esse método foi aplicado com sucesso por Teixeira (2007) que isolou cinco bactérias identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*.

Constatou-se que todos os microrganismos identificados possuem a capacidade de degradação de hidrocarbonetos, pois todos tiveram o poder de descolorir o meio na presença do indicador redox. Este teste possui resultado positivo na verificação da capacidade de degradação por meio de descoloração do meio que inicialmente é azul. Os morfotipos testados descoloriram completamente o meio entre 48h e 60h.

Para comparar os resultados obtidos, em termos do uso do indicador redox, cita-se o trabalho de Pirrôlo (2006) que testou a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* LBI, utilizando o método indicador redox em meio de cultivo BH, que apresentou resultados positivos, obtidos a partir de observação visual da descoloração do meio, para óleo diesel e petróleo após 23h, querosene após 68h e descoloração parcial para borra oleosa após 72h.

Outro trabalho que usou o indicador redox foi o de Luz et al. (2011) que investigaram a presença de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos utilizando o 2,6-diclofenol indofenol como indicador e diesel como fonte de carbono, o consórcio microbiano apresentou resultado positivo, obtido a partir da observação visual da completa descoloração do meio após 96h.

CONCLUSÃO

Os objetivos “Caracterizar os microrganismos presentes em local com contaminação por hidrocarbonetos, neste estudo um posto de abastecimento de combustível” e “Isolar microrganismos presentes no local com contaminação por hidrocarbonetos” foram atendidos na medida em que foi possível isolar e caracterizar microrganismos com potencial de degradação de hidrocarbonetos a partir de água subterrânea contaminada com hidrocarbonetos oriunda de posto de abastecimento de combustível, nas condições de estudo. Também

quando foram isolados da amostra do meio contaminado com hidrocarbonetos 22 diferentes morfotipos, entre essas bactérias e fungos. Esses morfotipos isolados foram caracterizados como 81,8% bactérias Gram negativas, 4,5% bactérias Gram positivas e 13,7% fungos.

O objetivo de “Testar diferentes concentrações de fonte de carbono para crescimento microbiano” foi cumprido quando das diferentes concentrações de diesel testadas foi nas menores concentrações (1%) que verificou-se maior crescimento microbiano e melhores eficiências de degradação de hidrocarbonetos.

Por fim, o objetivo de “Avaliar a eficiência de degradação de hidrocarbonetos, neste estudo o diesel, por culturas mistas autóctones da área contaminada” foi respondido na medida em que todos os microrganismos isolados neste estudo apresentaram potencialidade de degradar hidrocarbonetos derivado do petróleo, neste caso o diesel. E que o crescimento microbiano verificado resultou em maior eficiência no decréscimo do parâmetro de TPH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, D. M. Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina. 2008. 96p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2008.
2. ARAÚJO, F. S. M.; LEMOS, J. L. S. Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo. X Jornada de Iniciação Científica do CETEM, Rio de Janeiro, Julho de 2002.
3. BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, Ed. 96, p.1049–1055, 2005.
4. CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental). Lista Holandesa de valores 6530 (Projeto Cesteb), SP, 1999.
5. IQSC – INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS. 2006. Disponível em: <www.iqsc.usp.br> Acesso em 12 nov. 2010.
6. KUBOTA, K.; KOMA, D.; MATSUMIYA, Y.; CHUNG, S-Y.; KUBO, M.; *Biodegradation*, 2008, 19, 749.
7. LUZ, C. C.; SANTOS, E. A.; SANTOS, M. O. S.; MUSSY, M. Y.; YAMASHITA, M.; BASTOS, W. R. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho – RO, Amazônia. *Química Nova*, Vol. 35, N° 5, p. 775-779, 2011.
8. PIRRÔLO, M. P. S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. 2006. 73p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área: Microbiologia Aplicada) Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2006.
9. PROJECONSULT, Projeconsult Engenharia Ltda. Relatório de Avaliação Ambiental. 17p. 2009.
10. SOUZA, C. S.; MIRANDA, R. C. M.; SENA, K. X. R. S.; ARAÚJO, J. M.; CHIAPPETA, A. A.; SOUSA, M. F. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. *Anais do 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás*, 2005.
11. SOUZA, D. B.; BRITO, G. C. B.; VASCONCELOS, F. C. W.; BRAGA, L.C.; Estudo de microrganismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. *Revista de estudos ambientais (online)*, v.12, n. 2, p. 38-46, 2010.
12. TEIXEIRA, A. S. Isolamento e Caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial. 2007. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.
13. URURAHY, A. F. P. Biodegradação de Resíduos Oleosos Provenientes da Refinaria de Petróleo. 1998. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 1998.