

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

Giselle Intra Pedroti

**ENSAIOS DE BIODEGRADABILIDADE AERÓBIA
DE HIDROCARBONETOS DERIVADOS DO
PETRÓLEO EM SOLOS**

**Vitória
2007**

Giselle Intra Pedroti

**ENSAIOS DE BIODEGRADABILIDADE AERÓBIA
DE HIDROCARBONETOS DERIVADOS DO
PETRÓLEO EM SOLOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Engenharia Ambiental do Centro
Tecnológico, Departamento de Hidráulica e
Saneamento da Universidade Federal do Espírito
Santo, como requisito parcial para a obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Ambiental.
Orientador: Sérgio Túlio Alves Cassini

**Vitória
2007**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

P372e Pedroti, Giselle Intra, 1980-
 Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados
do petróleo em solos / Giselle Intra Pedroti. – 2007.
 119 f. : il.

 Orientador: Sérgio Túlio Alves Cassini.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo,
Centro Tecnológico.

 1. Biodegradação. 2. Biorremediação. 3. Hidrocarbonetos. 4.
Bactérias. I. Cassini, Sérgio Túlio Alves. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro Tecnológico. III. Título.

CDU: 628

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

“Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos”

GISELLE INTRA PEDROTI

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini
Orientador – DEA/CT/UFES

Profa. Dra. Edumar Ramos Cabral Coelho
Examinadora Interna – DEA/CT/UFES

Prof. Dr. Eustáquio Vinícius Ribeiro de Castro
Examinador Convidado – DQUI/CCE/UFES

Prof. Dr. Marco Antônio Almeida de Souza
Examinador Externo - UNB

Coordenador do PPGEA: Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Vitória, ES, 29 Junho de 2007.

**Dedico este trabalho à minha família pelo
incentivo, confiança e por estar
sempre ao meu lado.**

Agradecimentos

A Deus, de onde tirei forças para seguir sempre em frente e ir a busca dos meus ideais.

À minha família que me proporcionou e continua proporcionando condições materiais e emocionais para que eu possa sempre ir mais além. Em especial à minha mãe, Maria Geni pelo apoio incondicional. As minhas tias Vera Intra e Nola Intra que nunca mediram esforços para me ajudar e a família Pimenta pelas palavras de carinho e solidariedade.

Aos colegas e professores do PPGEA – Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental que de forma direta ou indireta, participaram da minha jornada no mestrado, em especial a Hyane, Eduardo, Emília, Hugo, Cláudia, Érika, Priscilla, Fernanda, Caio, Francisco e Eudrades.

Ao LABSAN, por ter me auxiliado nos momentos que precisei.

Ao LABPETRO, pela parceria e aos colegas e professores que facilitaram o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Prof. Eustáquio, Prof. Edna, Prof. Reginaldo, Verônica, Mariana e Michel pela atenção e disponibilidade.

Ao professor Wolfgang Riegert pelo total desprendimento, disponibilidade, atenção e paciência em me ajudar sempre que precisei, sem medir esforços.

Aos amigos que, mesmo de longe, se preocuparam ao longo deste trabalho e se mostraram companheiros e acreditaram no meu potencial.

Ao CNPq pela bolsa.

Ao meu orientador, Sérgio Túlio Cassini pela orientação na pesquisa e por ter, desde o início, acreditado em mim.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*"O amor e a verdade estão unidos entre si,
como as faces de uma moeda. É impossível
separá-los. São as forças mais abstratas e
mais poderosas desse mundo."
(Mahatma Gandhi)*

RESUMO

A poluição ambiental causada por derramamentos e vazamentos de petróleo e seus derivados têm sido um grande motivo de preocupação com o Meio Ambiente. Com o objetivo de recuperar o Meio Ambiente da poluição sofrida por estes acidentes, este trabalho se propôs a isolar e caracterizar microrganismos com capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em ambiente terrestre.

A pesquisa obteve 19 isolados, os quais foram analisados através do sistema manual, baseado no método respirométrico de Bartha (modificado), descrito pela NBR 14.283 (1999) pela literatura por meio da condutivimetria, que determina a atividade microbiológica pela geração de gás carbônico e, indiretamente, a biodegradação de contaminantes do solo.

A pesquisa foi realizada em três ensaios. No primeiro ensaio foi avaliada a capacidade de biodegradação das 19 cepas isoladas, tendo areia e vermiculita como substrato. O segundo ensaio avaliou 4 cepas (1, 2, 13 e 14) com quatro hidrocarbonetos (A, B, C e D), formando assim 16 tratamentos em forma matricial, tendo areia e vermiculita como substrato, e objetivando avaliar a especificidade das cepas isoladas. O terceiro ensaio envolveu 2 cepas (1 e 14) com 4 hidrocarbonetos (A, B, C e D), em forma matricial, utilizando solos arenoso e argiloso objetivando avaliar as possíveis diferenças de biodegradação nos solos.

As cepas avaliadas apresentaram potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos derivados de petróleo. A análise de biodegradação foi realizada por meio da liberação de gás carbônico gerado pelas bactérias no sistema respirométrico. Os dados foram ajustados de acordo com o cálculo da taxa de biodegradação proposto pela cinética química. Foram observados valores de até 32% de biodegradação de hidrocarbonetos em um período de 15 dias, considerando o modelo de biodegradação único proposto por Firme (2005). A taxa de biodegradação apresentou variações de acordo com tipo de composto orgânico e a cepa isolada utilizados nos tratamentos de cada ensaio.

ABSTRACT

The environmental pollution caused by oil and derivatives' leaking is a great worry about environment. With the target of recovering the environment from the pollution caused by those accidents, this work intends to isolate and characterize microorganisms with capacity of petroleum biodegradation in ground environment.

The research achieve 19 isolated, which were analyzed through manual system, based in Bartha respirometric method (modified), described by NBR 14.283 (1999), by literature through conductivimetrics, which determines microbiologic activity by carbonic gas generation and, indirectly, biodegradation of ground contaminant.

The research was done in three experiences: in first, biodegradation capacity of 19 isolated strains was verified, with sandy and vermicuta as substracts. The second experience tested four strains (1, 2, 13 and 14) with four hydrocarbons (A, B, C and D), forming 16 matricial treatments, with sand and vermicuta as substracts, with the purpose of verify isolated strains specificity. The third experience involved two strains (1 and 14) with four hydrocarbons (A, B, C and D), in matricial form, using sandy and clay ground, with the purpose of verify possible differences of ground biodegradation. The evaluted strains showed biodegradation potential of petroleum derivatives hydrocarbons. The biodegradation analysis was done by carbonic gas generated by bacterias in respirometric system. Data were adjusted according with biodegradation rate calculations proposed by chemical kinetics. Values until 32% hydrocarbons biodegradation in a 15 day period were observed, considering the only biodegradation model proposed by Firme (2005). The biodegradation rate presented variation according with each type of organic composites and isolated strain utilized in each experience treatment.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral:.....	19
2.2 Objetivos específicos:	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. Composição Química do Petróleo	20
3.2. Processo de Separação do Petróleo	24
3.3. Classificação dos Hidrocarbonetos.....	26
3.4. Poluição e Contaminação Ambiental	28
3.5. Biodegradação.....	33
3.6. Solo	45
3.7. Biorremediação.....	48
3.8. Respirimetria Aeróbia	53
3.9. Modelos cinéticos	54
4. MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 Coleta e enriquecimento de amostras	60
4.1.1 Fase de enriquecimento.....	60

4.2 Isolamento e Caracterização dos microorganismos	61
4.2.1 Isolamento de bactérias	61
4.2.2 Meios de Cultivo.....	62
4.2.3 Inoculação e Incubação	63
4.2.4 Caracterização dos isolados	64
4.3 Avaliação da Biodegradabilidade Aeróbia	64
4.3.1 Preparo dos Sistemas de Avaliação	64
4.3.2 Avaliação da produção de CO ₂	66
4.3.3 Condições experimentais	68
4.3.4 Condições experimentais	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1 Avaliação das cepas isoladas – Ensaio I	72
5.1.1 Caracterização Morfológica e Bioquímica	72
5.1.2 Atividade de respirometria.....	75
5.2 Avaliação das cepas isoladas – Ensaio II.....	82
5.3 Avaliação das cepas isoladas – Ensaio III.....	94
5.4 Comparação das taxas de biodegradação nos ensaios I, II e III	102
6. CONCLUSÕES	104
7. RECOMENDAÇÕES.....	105
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Classificação do Petróleo segundo o Grau API e o Teor de Enxofre	22
Tabela 2 – Produtos obtidos a partir do fracionamento do petróleo	25
Tabela 3 – Características das frações de petróleo e óleos brutos avaliados.....	61
Tabela 4 – Composição do Meio Mínimo (MM).....	62
Tabela 5 – Solução de Micronutrientes	63
Tabela 6 – Composição dos tratamentos do ensaio I da respirometria.....	68
Tabela 7 – Composição dos tratamentos da segunda etapa da respirometria	69
Tabela 8 – Composição dos tratamentos da terceira etapa da respirometria.	70
Tabela 9 – Caracterização morfológica das colônias isoladas dos solos de mangue e horta, utilizadas no experimento respirométrico.....	72
Tabela 10 – Caracterização bioquímica das bactérias.....	74
Tabela 11 – Valores da constante de biodegradação (k) e respectivo ajuste da reta (R^2) para os tratamentos do Ensaio I	78
Tabela 12 – Valores da constante de biodegradação (k) e respectivo ajuste da reta (R^2) para os tratamentos do ensaio I, destacando a fase rápida (k_1) e fase lenta (k_2).	81
Tabela 13 – Valores da constante de biodegradação (k) e respectivo ajuste da reta (R^2) para os tratamentos do ensaio II	86

Tabela 14 – Valores da constante de biodegradação (k) e respectivo ajuste (R^2) para os tratamentos do ensaio II, destacando a fase rápida (k_1) e fase lenta (k_2).	88
Tabela 15 – Médias de CO_2 acumulado (mg) das cepas e dos hidrocarbonetos A, B, C e D do primeiro ao sétimo dia de ensaio.	90
Tabela 17– Médias de CO_2 acumulado (mg) das cepas e dos hidrocarbonetos A, B, C e D do primeiro ao vigésimo nono dia de ensaio.	92
Tabela 18 – Valores médios de biodegradabilidade de frações de hidrocarbonetos, expostos em mg de CO_2 cumulativo, durante 29 dias.	94
Tabela 19– Valores da constante de biodegradação (k) e respectivo ajuste da reta (R^2) para os tratamentos ensaio III do experimento.	97
Tabela 20 – Valores das constantes de biodegradação (k_1 e k_2) e respectivos ajustes da reta (R^2) para os tratamentos do ensaio III do experimento.	99
Tabela 21 - Estatísticas descritivas das Cepas 1 e 14 , utilizando solos texturizados, sendo solo X (arenoso) e solo Y (argiloso) e dos hidrocarbonetos A, B, C e D (petróleo leve, fração 6, fração 29 e fração 31), considerando a análise do primeiro ao décimo dia.	100
Tabela 22 - Estatísticas descritivas das Cepas 1 e 14, utilizando solos texturizados, sendo solo X (arenoso) e solo Y (argiloso) e dos hidrocarbonetos A, B, C e D (petróleo leve, fração 6, fração 29 e fração 31), considerando a análise do décimo primeiro ao trigésimo primeiro dia.	100
Tabela 23 - Estatísticas descritivas das Cepas 1 e 14, utilizando solos texturizados, sendo solo X (arenoso) e solo Y (argiloso) e dos hidrocarbonetos A, B, C e D (petróleo leve, fração 6, fração 29 e fração 31), considerando a análise do primeiro ao trigésimo primeiro dia.	101
Tabela 24 – Comparação das taxas de biodegradação (k) entre os tratamentos nos três ensaios.	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de separação do petróleo a partir da destilação fracionada que aquece, separa e esfria os produtos.	25
Figura 2 – Fluxograma de classificação dos hidrocarbonetos.	26
Figura 3 – Exemplos de hidrocarbonetos alifáticos.	27
Figura 4 – Exemplos de hidrocarbonetos aromáticos.	27
Figura 5 – Constituição do solo em seus três tipos de fases: sólida, líquida e gasosa.	46
Figura 6 – Fluxograma de etapas do experimento de respirometria aeróbia.	59
Figura 7 – Experimento respirométrico aeróbio composto de vermiculita e areia, meio mínimo, inóculo bacteriano e hidrocarbonetos derivados do petróleo.	65
Figura 8 – Ensaio de biodegradabilidade através da respirometria de Bartha.	66
Figura 9 – Visualização em placa da cepa 13.	73
Figura 10 – Visualização em placa da cepa 5.	73
Figura 11 – Visualização em placa da cepa 4.	73
Figura 12 – Visualização em placa da cepa 16.	73
Figura 13 – Produção acumulada de CO ₂ de óleos brutos e frações de petróleo, tendo como substrato areia e vermiculita, por um período de 15 dias.	75
Figura 14 – Produção acumulada de CO ₂ de óleos brutos e frações de petróleo, tendo como substrato areia e vermiculita, por um período de 15 dias.	76

Figura 15 – Produção acumulada de CO ₂ de óleos brutos e frações de petróleo, tendo como substrato areia e vermiculita, por um período de 15 dias.	76
Figura 16 – Produção acumulada de CO ₂ de óleos brutos e frações de petróleo, tendo como substrato areia e vermiculita, por um período de 15 dias.	77
Figura 17 – Taxa de biodegradação (k) dos tratamentos do ensaio I, por um período de 15 dias.	79
Figura 18 – Os resultados referentes à acumulação de CO ₂ nos diferentes tratamentos, envolvendo as cepas 1, 2, 3 e 4 com o hidrocarboneto A (óleo bruto 1).	83
Figura 19 – Os resultados referentes à acumulação de CO ₂ nos diferentes tratamentos, envolvendo as cepas 1, 2, 3 e 4 com o hidrocarboneto B (fração 6).	83
Figura 20 – Os resultados referentes à acumulação de CO ₂ nos diferentes tratamentos, envolvendo as cepas 1, 2, 3 e 4 com o hidrocarboneto C (fração 29).	84
Figura 21 – Os resultados referentes à acumulação de CO ₂ nos diferentes tratamentos, envolvendo as cepas 1, 2, 3 e 4 com o hidrocarboneto D (fração 31).	84
Figura 22 – Taxa de biodegradação (k) dos tratamentos do ensaio II por um período de 29 dias.	87
Figura 23 – Ensaio de biodegradabilidade (I – IV) dos hidrocarbonetos A, B, c e D (óleo bruto 1, fração 6, fração 29 e fração 31, respectivamente), por respirometria aeróbia, com as cepas 1 e 14, utilizando solo argiloso (Y) como substrato, por um período de 31 dias.	95
Figura 24 – Ensaio de biodegradabilidade (I-IV) dos hidrocarbonetos A, B, C e D (óleo bruto 1, fração 6, fração 29 e fração 31, respectivamente), por	

respirometria aeróbia, com as cepas 1 e 14, utilizando solo arenoso como substrato, por um período de 31 dias..... 96

Figura 25 – Taxa de biodegradação (k) dos tratamentos do ensaio III, por um período de 31 dias. 98

1. INTRODUÇÃO

Os crescentes derramamentos de óleo, em terra ou em mar, têm sido motivo de desenvolvimento de pesquisas, objetivando solucionar os problemas que causam impacto ambiental ou a busca de alternativas possíveis, menos agressivas, para a recuperação do Meio Ambiente, preocupação do homem contemporâneo.

O petróleo, palavra formada do latim *petra* + *oleum*, óleo que vem da pedra, é uma mistura de hidrocarbonetos resultantes de processos físico-químicos sofridos pela matéria orgânica que se depositou juntamente com fragmentos de rochas durante a formação de rochas sedimentares, milhões de anos atrás. Devido a efeitos mecânicos, ocorre a migração do petróleo no subsolo, acumulando-se em rochas porosas e permeáveis denominadas rochas reservatório.

Os hidrocarbonetos de petróleo incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) têm sido categorizados como os principais poluentes pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e outras organizações ambientais e de saúde em todo mundo. Também aqui no Brasil, a partir dos anos oitenta, as pesquisas têm se voltado para os efeitos, no Meio Ambiente, da exploração de petróleo em nosso território, a utilização de seus derivados e a necessidade de políticas ambientais conseqüentes.

O petróleo, especificamente o brasileiro, é tipicamente um óleo pesado que, quando fracionado em refinaria, produz uma quantidade muito grande de nafta, gasolina, óleo combustível e, em quantidade menor, o óleo diesel.

Apesar da separação da água, óleo, gás e sólidos produzidos, ocorrer em estações ou na própria unidade de produção, é necessário o processamento e refino da mistura de hidrocarbonetos provenientes das rochas reservatório, para a obtenção dos componentes que serão utilizados nas mais diversas aplicações. Esses hidrocarbonetos são compostos orgânicos formados por carbono e hidrogênio e podem ser caracterizados em saturados, insaturados ou aromáticos. Os

hidrocarbonetos saturados, também denominados de alcanos ou parafinas são aqueles cujos átomos de carbono são unidos somente por ligações simples e ao maior número possível de átomos de hidrogênio, constituindo cadeias lineares, ramificadas ou cíclicas, interligadas ou não. Os hidrocarbonetos insaturados, também denominados de olefinas, apresentam pelo menos uma dupla ou tripla ligação carbono-carbono, enquanto que os hidrocarbonetos aromáticos, também chamados de arenos, apresentam pelo menos um anel de benzeno na sua estrutura.

A contaminação por petróleo e derivados tem causado bastante preocupação, seja pela frequência dos eventos ou pelo elevado potencial dos mesmos. A contaminação de ecossistemas aquáticos e terrestres por hidrocarbonetos pode ser atribuída às atividades das refinarias de petróleo e seus derivados ou vazamentos de tanques de combustíveis subterrâneos.

Quando o óleo é derramado na água do mar, a princípio, somente os componentes solúveis afetam os organismos que vivem sub-superfície. Porém, quando ventos, ondas e correntes agem sobre a mancha de óleo, misturando-a à água, outros componentes não solúveis, passam também afetar os organismos ali presentes. Quanto mais solúvel for o composto, mais tóxico será ele.

Segundo Domingues (2005), um litro de óleo é capaz de esgotar o oxigênio de 1 milhão de litros de água, formando, em poucos dias, uma fina camada sobre a superfície de 1000 m², o que bloqueia a passagem de água e luz, impedindo a respiração e a fotossíntese.

Devido a essa preocupação ambiental, desenvolveram-se pesquisas para avaliar a biodegradabilidade de hidrocarbonetos de petróleo no solo, pela ação de bactérias presentes no Meio Ambiente.

O tratamento biológico ou técnicas de biorremediação são métodos alternativos para tratamento do solo contaminado. Essas técnicas são econômica e politicamente atrativas e têm mostrado resultados promissores no tratamento de solos

contaminados com compostos orgânicos, particularmente com hidrocarbonetos de petróleo.

As bactérias heterotróficas são os organismos mais importantes na transformação de compostos orgânicos perigosos, e esquemas de tratamento de solos podem ser direcionados para o realce de suas atividades.

A biorremediação é a redução biológica de substâncias químicas complexas catalisadas por microorganismos. A biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos pode ser realizada através da simulação da microflora nativa, pela introdução de nutrientes e oxigênio dentro do solo (bioestimulação) ou por meio de uma inoculação de uma população microbiana mista ou pura, enriquecida dentro do solo (bioaugmentação).

A cultura pura de um dado microrganismo é uma cultura de células genética e morfologicamente idênticas, já a cultura mista é uma cultura de células diferentes. A imobilização das células num meio sólido torna possível a visualização do crescimento em massas celulares isoladas denominadas colônias.

Nos últimos anos, tem sido dada atenção à obtenção de consórcios microbianos, que comparativamente às culturas puras, têm se mostrado mais efetivos na degradação de compostos orgânicos.

A biodegradação de hidrocarbonetos pode ser aeróbia ou anaeróbia. A aeróbia no solo é dominada por uma variedade de microorganismos, incluindo bactérias e fungos, os quais requerem oxigênio durante a degradação química. A anaeróbia no solo é dominada por uma quantidade menor de microorganismos que não utilizam o oxigênio para a degradação química.

Este trabalho tem por objetivo avaliar uma alternativa capaz de tratar adequadamente as contaminações em solos decorrentes de acidentes ambientais com hidrocarbonetos derivados do petróleo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Avaliar uma alternativa capaz de tratar adequadamente as contaminações em solos decorrentes de acidentes ambientais com hidrocarbonetos derivados do petróleo.

2.2 Objetivos específicos:

1. Isolar e caracterizar microrganismos com atividade de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo e frações.
2. Avaliar o potencial de biodegradabilidade aeróbia de microrganismos isolados, caracterizados em diferentes tipos de solos.
3. Comparar os diferentes tipos de ambientes com o potencial de biodegradabilidade utilizando os microrganismos isolados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Composição Química do Petróleo

O petróleo é uma mistura complexa de ocorrência natural formada por diversos componentes orgânicos e inorgânicos, entre os compostos orgânicos encontram-se principalmente hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos. As propriedades físicas e termodinâmicas e o comportamento de uma mistura desse tipo dependem principalmente de seus constituintes, das quantidades relativas desses constituintes e das condições termodinâmicas nas quais ela se encontra.

O petróleo é um líquido escuro acastanhado, de consistência oleosa, de cheiro desagradável e coloração que pode variar do preto ao castanho, originando-se da decomposição de animais e vegetais marinhos soterrados em desabamentos da crosta terrestre em épocas remotas. Alguns podem ser escuros, densos e viscosos, com pouco gás, enquanto outros podem apresentar tonalidades mais claras, baixa densidade e viscosidade, com quantidade expressiva de gás, em função dos diferentes reservatórios em que os óleos são obtidos.

A caracterização adequada dos constituintes de petróleo é uma informação indispensável para a determinação do comportamento termodinâmico e é, portanto, de grande importância para todas as operações de produção de petróleo, desde a estimativa das reservas existentes até os projetos para sua produção nas fases primária e suplementar, seu transporte, refino e a distribuição de seus produtos.

Os óleos crus contêm muitas substâncias tóxicas como benzeno, tolueno, xileno além de outras substâncias de baixo peso molecular (Kennish, 1996). As principais características de um 'tipo' de petróleo são, conforme Martins (2005) a *densidade* do óleo, o tipo de hidrocarboneto – ou *base* – predominante na mistura e o *teor de enxofre*. De acordo com o autor, em relação à densidade, os diferentes tipos de

petróleo são classificados segundo uma gradação que vai de *leves* (menos densos) a *pesados* (mais densos). De acordo com as normas do American Petroleum Institute, essa classificação é conhecida também como “grau API”. Segundo essa classificação, quanto menor a densidade do petróleo, maior o grau API e conseqüentemente maior o valor comercial do petróleo, tendo em vista que será possível produzir uma parcela maior de derivados nobres, de elevado valor comercial, como a gasolina, o diesel e o GLP, relativamente a outro tipo de óleo, mais pesado (menor grau API).

O grau API é maior quando se diz que o petróleo é mais leve. Petróleos com grau API maior que 32° são considerados leves; entre 24° e 31° API, são médios; abaixo de 23° API, são considerados pesados; e com grau API igual ou inferior a 10°, são petróleos extrapesados. O óleo leve (alto °API) é constituído predominantemente de hidrocarbonetos alifáticos mais facilmente degradados pela população microbiana do que o óleo mais pesado, que pode conter maior abundância de hidrocarbonetos aromáticos (Peters e Moldowan, 1993). Quanto ao teor de enxofre, o petróleo pode ser classificado como *doce* ou *ácido*. São classificados como ácidos os óleos com percentual de enxofre superior a 0,5%; estes têm seu valor comercial reduzido devido a corrosividade e toxicidade do enxofre, que resultam em maiores custos no processo de refino. A Tabela 1 relaciona a classificação do petróleo de acordo com o teor de enxofre e do grau API.

De acordo com Mariano (2005), as características do petróleo têm grande influência sobre a escolha das técnicas que serão adotadas para a sua refinação, e de um modo geral são elas que irão determinar quais serão os produtos que melhor poderão ser obtidos de um dado petróleo. Nem todos os derivados podem ser produzidos com qualidade e de forma economicamente viável a partir de qualquer tipo de petróleo. Também não existe uma técnica única de refino que seja aplicável a qualquer tipo de óleo bruto.

Tabela 1 – Classificação do Petróleo segundo o Grau API e o Teor de Enxofre

Categoria	% Enxofre	Grau API
Leve com baixo teor de enxofre	0-0,5	>32
Pesado com médio teor de enxofre	0,35-1,1	>24
Leve com elevado teor de enxofre	>1,1	>32
Pesado com elevado teor de enxofre	>1,1	24-33
Muito pesado com elevado teor de enxofre	>0,7	0-23

Fonte: Tavares (2005)

Técnicas instrumentais convencionais permitem a separação e identificação precisa dos componentes orgânicos em uma mistura de petróleo desde o metano até o pentano. Os hidrocarbonetos de massa molecular mais elevada não são facilmente separados e identificados, e geralmente definem-se estes constituintes como frações de determinadas propriedades físicas como temperatura de ebulição, massa molecular ou densidade. O fracionamento é obtido por destilação convencional ou simulada, por exemplo, cromatografia gasosa. Novas técnicas experimentais permitem caracterizar mais detalhadamente estas frações em termos de constituintes parafínicos, naftênicos e aromáticos (análise PNA). Mesmo assim, permanece sempre uma fração residual que é de difícil identificação por ser termicamente degradável. Uma alternativa para identificar e caracterizar essa fração pesada é através do comportamento de solubilidade dos constituintes em solventes orgânicos parafínicos e aromáticos, o que classifica as frações em saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos (SARA).

A presença dessa fração pesada, mesmo em quantidades pequenas, tem implicações importantes sobre o comportamento de fases de fluidos de petróleo e gás natural nas condições encontradas durante as operações de produção, transporte e refino. A natureza química, a quantidade e a interação dessa fração com os outros constituintes do fluido influenciam significativamente algumas propriedades e fenômenos importantes como, por exemplo, o ponto de orvalho de um gás natural, a precipitação de parafinas em petróleos sujeitos à ambientes frios (linhas de transporte de petróleo em águas profundas) e a desestabilização e deposição de asfaltenos no reservatório, na coluna de produção e em linhas de

transporte, devido a alterações nas composições e condições termodinâmicas de temperatura e pressão durante a produção de petróleo. A presença de água em sistemas de gás natural pode gerar outros problemas como a formação e deposição de hidratos. A formação de sólidos durante a produção de petróleo traz prejuízos que variam do aumento dos gastos energéticos devido ao aumento de viscosidade até a catastrófica interrupção da produção.

Entre os constituintes na fração pesada de petróleo que vem despertando interesse e atenção mundialmente estão os asfaltenos e a parafina. A comprovação de que petróleos brasileiros produzidos das jazidas de maiores reservas no país contêm quantidades apreciáveis de asfaltenos juntamente com parafinas de alta massa molecular despertou o interesse para a realização de pesquisas nesta área. Foram realizados tanto trabalhos experimentais como teóricos com bastante sucesso, revelando a complexidade de comportamentos destas frações e dos fenômenos envolvidos e sugerindo a necessidade de estudos mais detalhados para desvendar os passos e mecanismos que levam à deposição de asfaltenos e parafinas.

O petróleo consiste basicamente em compostos de apenas dois elementos que, no entanto, formam grande variedade de complexas estruturas moleculares. Independentemente das variações físicas ou químicas, quase todos os petróleo variam de 82 a 87 % de carbono em peso e 12 a 15% de hidrogênio. Os asfaltos mais viscosos geralmente variam de 80 a 85% de carbono e de 8 a 15% de hidrogênio.

De acordo com a origem do petróleo, a composição química e as propriedades físicas do óleo cru podem variar demasiadamente, e é devido a esses fatores (composição complexa e variabilidade na composição) que se encontram dificuldades para o tratamento de áreas contaminadas por tal substância.

Em geral, todas as formas do petróleo são compostas quase que completamente por átomos de carbono e de hidrogênio, com menores proporções de nitrogênio e

oxigênio (Solomons, 1996). Existem mais de 600 compostos de hidrocarbonetos identificados no petróleo (Fetter, 1993).

3.2. Processo de Separação do Petróleo

Os hidrocarbonetos de petróleo são separados por destilação fracionada, pois o óleo bruto extraído não contém muitas propriedades para uso. Na destilação, separam-se os vários compostos em grupos chamados frações do petróleo, conforme mostrado na figura 1. Se a amostra original consiste em vários líquidos voláteis, os líquidos componentes aparecem no destilado sucessivamente em uma série de frações, ou amostra do destilado, que fervem em intervalos de temperatura específicos. O componente mais volátil destila primeiro e o componente menos volátil é obtido como fração final. Todas as frações do petróleo obtidas na destilação são utilizadas, como é o caso da gasolina, que contém oito átomos de carbono. Os óleos lubrificantes - óleos básicos - são obtidos de frações mais pesadas, devido à sua estrutura molecular, pois são hidrocarbonetos de cadeia de 16 carbonos.

Como pode-se verificar pela tabela 2, a porcentagem de gasolina obtida através da destilação fracionada é relativamente pequena, não atendendo às necessidades do consumo mundial e a quantidade de óleo obtida é muito grande (maior que a demanda). Com isso, sobrava muito óleo e faltava gasolina, de maneira que foi possível desenvolver um método que permitisse a quebra de 1 molécula de óleo (compostos com 15 a 18 carbonos) em 2 moléculas menores (5 a 12 átomos de carbono) por meio do aquecimento desse óleo à uma temperatura de aproximadamente 500°C utilizando um catalisador apropriado. Esse processo é chamado de pirólise ou craqueamento catalítico.

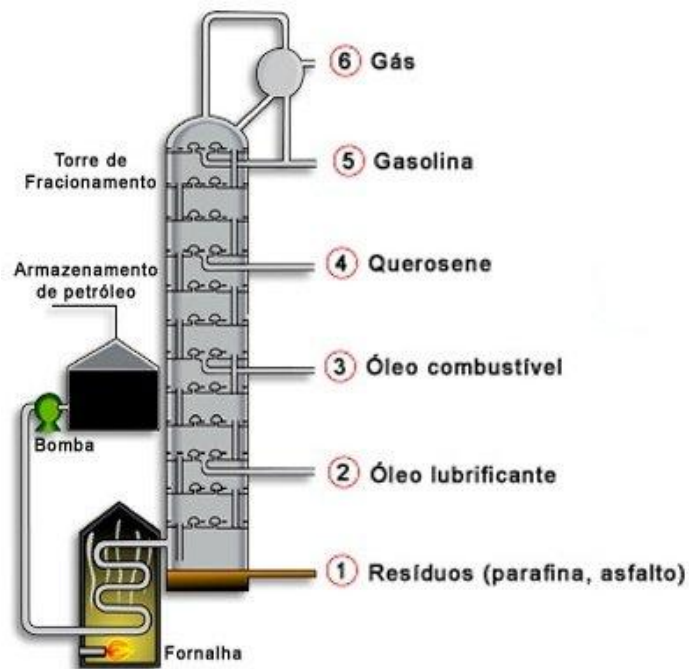


Figura 1 – Esquema de separação do petróleo a partir da destilação fracionada que aquece, separa e esfria os produtos.

Tabela 2 – Produtos obtidos a partir do fracionamento do petróleo

Fração	(%)	Temp. destilação(°C)	Nº de carbonos
Gás de cozinha (GLP)	7.5	abaixo de 20	1 a 4
Solvente para colas e tintas	11.2	60 - 100	5 a 7
Gasolina	16.2	80 - 205	5 a 12
Querosene	5.0	175 - 275	12 a 16
Óleo Diesel e combustível	50.4	acima de 250	15 a 18
Óleo lubrificante e parafina	1.2	acima de 350	acima de 17
Asfalto	1.8	sólidos não voláteis	estr. policíclicas
Outros	6.7		

As indústrias utilizam colunas de fracionamento gigantescas para separar misturas complexas como óleo cru. Utiliza-se as frações voláteis como gás natural (ferve abaixo de 0° C), gasolina (ferve entre 180 e 325° C). As frações menos voláteis são usadas como diesel combustível (acima de 275° C). O resíduo que permanece depois da destilação é asfalto, que é usado em rodovias.

3.3. Classificação dos Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos são constituídos por átomos de carbono e hidrogênio arranjados em vários tipos de configurações estruturais, basicamente divididos em dois grupos, os alifáticos e os aromáticos.

Na classificação estrutural dos alifáticos existem quatro classes denominadas alcanos, alcenos, alcinos e cicloalcanos. Os aromáticos são divididos em monoaromáticos e poliaromáticos (Potter e Simmons, 1998).

Os alcanos formam cadeias com ligações simples, os alcenos possuem ligações duplas e os alcinos possuem pelo menos uma ligação tripla. Os hidrocarbonetos aromáticos são formados por anéis benzênicos. As principais classes estão apresentadas na figura 2.

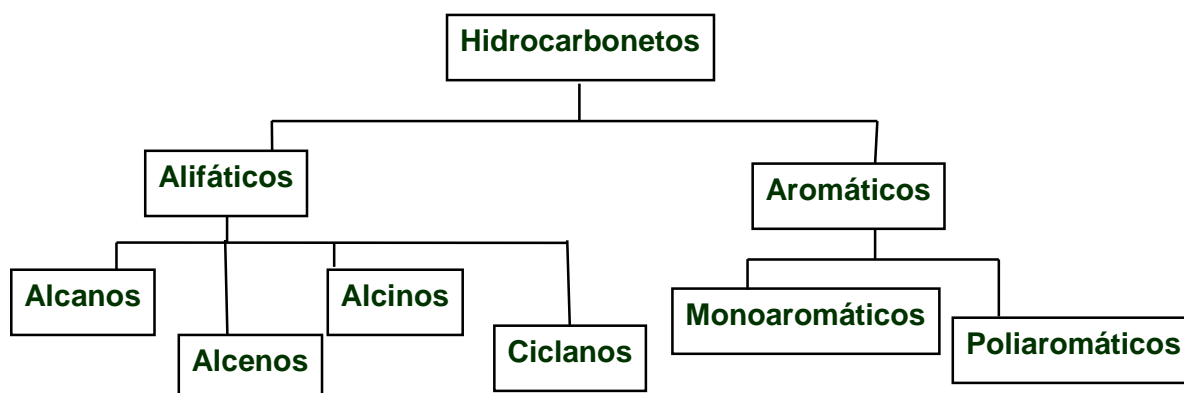
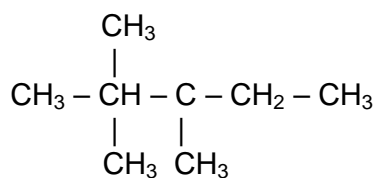
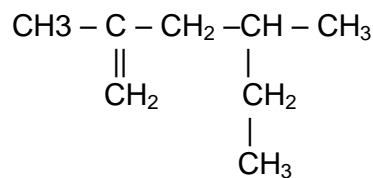


Figura 2 – Fluxograma de classificação dos hidrocarbonetos.
Fonte: Potter e Simmons, 1998



2,3,3 – trimetil pentano



2,4 – dimetil hexeno - 1

Figura 3 – Exemplos de hidrocarbonetos alifáticos

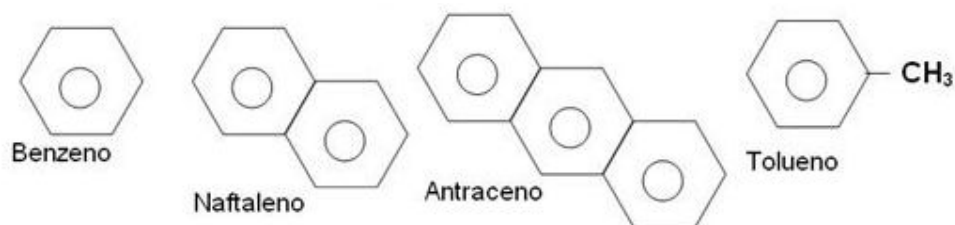


Figura 4 – Exemplos de hidrocarbonetos aromáticos

Os hidrocarbonetos aromáticos, também chamados de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzenos e xilenos) não formam concentrações abundantes na maioria dos óleos brutos. Eles são produzidos durante o processo de destilação e são associados aos produtos de petróleo refinados, como a gasolina, o querosene e o óleo diesel (Robbins *et al.*, 1993).

Os hidrocarbonetos que possuem dois ou mais anéis são denominados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), estes hidrocarbonetos são considerados os mais tóxicos componentes do petróleo e estão associados a efeitos

carcinogênicos. Muitos dos PAH de baixo peso molecular são solúveis em água, aumentando o risco de contaminação.

Os PAHs são os poluentes que mais preocupam tratando-se de poluição ambiental. Esta preocupação origina-se do fato que os PAHs, são conhecidos como potentes cancerígenos. O benzo(a)pireno, o mais extensivamente PAH estudado, têm sido demonstrado que produz metabólitos cancerígenos quando agem nas enzimas do corpo. Outra preocupação crescente é a contaminação do solo por PAH, que segue para águas subterrâneas, cuja contaminação é associada a uma grande gama de locais contaminados por substâncias perigosas (Haimann, 1995). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, ainda são produzidos hoje por processos industriais da refinação de petróleo, produção de coque e estação de tratamento de esgotos na indústria petrolífera. (Cutright e Lee, 1994).

O conjunto de hidrocarbonetos presentes em uma amostra de petróleo ou de seus derivados é conhecido como TPH (*Total Petroleum Hydrocarbons*). Os TPH são definidos como a soma dos compostos alifático e aromáticos (Weisman, 1998). Os grupos BTX e PAH são os compostos de maior mobilidade e toxicidade no Meio Ambiente (Schneider, 2005).

3.4. Poluição e Contaminação Ambiental

A Poluição pode ser definida como a introdução no Meio Ambiente de qualquer matéria ou energia que venha a alterar as propriedades físicas ou químicas ou biológicas desse meio, afetando, ou podendo afetar, por isso, a "saúde" das espécies animais ou vegetais que dependem ou tenham contato com ele, ou que nele venham a provocar modificações físico-químicas nas espécies minerais presentes. A contaminação é quando a poluição resulta em prejuízos à saúde humana.

Entre as principais fontes de contaminação do solo e das águas subterrâneas podem-se citar os vazamentos em dutos e tanques de armazenamentos subterrâneos de combustível, atividades de mineração e uso de defensivos agrícolas (Alaburda e Nishihara, 1998).

Os postos de gasolina compõem uma parte significativa do total dos empreendimentos implantados nos centros urbanos representando potencialmente uma fonte de impacto ambiental caracterizada por vazamentos de derivados de petróleo no solo, os quais conduzem impactos ambientais, contaminando águas subterrâneas e o solo.

As normas ABNT estabelecem padrões para os equipamentos e dispositivos de proteção contra vazamentos e derramamentos a serem instalados nos postos, em função de sua classe 1, 2 ou 3 (NBR 13.786/97). Esta classe é determinada a partir de fatores de agravamento tais como: proximidade de escolas, hospitais, túneis, ou seja, de acordo com o tipo de vizinhança no entorno do posto, a uma distância de 100 metros a partir de seu perímetro.

O termo poluição do solo usualmente se refere à presença de substâncias tóxicas de classes químicas tais como VOC (Volatile Organic Compounds), hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos como BTX (Benzeno, Tolueno e Xileno), óleos pesados, subprodutos do craqueamento dos derivados petroquímicos, elementos radionucleotídeos, metais pesados, solventes e compostos clorados, PAH (Hidrocarbonetos Poliaromáticos), fenóis, pesticidas halogenados, aminas nitrogenadas, ésteres, álcoois e produtos intermediários. Todos eles alteram negativamente a qualidade do solo e podem, por conseguinte, afetar a vegetação que dele depende, a quantidade da água subterrânea, ou ainda representar um risco para a saúde das pessoas que com ele entrem em contato direto ou indiretamente (Rodriguez, 2006).

Quando ocorre um derramamento de gasolina, uma das principais preocupações é a contaminação de aquíferos que são usados como fonte de abastecimento de água para consumo humano. Por ser muito pouco solúvel em água, a gasolina derramada, contendo mais de uma centena de componentes, inicialmente estará presente no

subsolo como líquido de fase não aquosa (NAPL). Em contato com a água, os compostos BTEX se dissolverão parcialmente, sendo os primeiros contaminantes a atingir o lençol freático (Silva, 2002).

Alguns estudos têm demonstrado que a presença de etanol no ambiente subterrâneo afeta a intemperização dos hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos – BTEX) e dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH). Os principais efeitos observados pela presença do etanol em áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo são: (a) o aumento das concentrações dos hidrocarbonetos na água subterrânea, decorrente do incremento da solubilidade aquosa dos compostos, provocado pelo efeito co-solvência; (b) o aumento da distância percorrida pelos contaminantes devido ao fluxo da água subterrânea, decorrente do aumento da massa destes contaminantes e redução da sorção na fração orgânica dos hidrocarbonetos dissolvidos; (c) consumo preferencial do etanol pelos microorganismos que resulta na diminuição da atividade microbiológica devido à toxicidade, alteração do meio, consumo de nutrientes e de receptores de elétrons presentes no solo, principalmente o oxigênio dissolvido; (d) intensificação da biodegradação dos hidrocarbonetos dissolvidos no meio após o esgotamento da massa de etanol, provocado pela grande quantidade de biomassa gerada para a degradação do etanol.

A composição de combustíveis presentes no solo e na água subterrânea de áreas impactadas pode variar ao longo do tempo. Isto ocorre porque os hidrocarbonetos do petróleo estão sujeitos à atuação de um conjunto de processos naturais que, combinados, influem na persistência, mobilidade e redução da massa dos contaminantes. Este conjunto de processos inclui a dissolução, a biodegradação e a volatilização, e recebe a denominação de intemperismo ou atenuação natural.

A comunidade microbiana presente nos solos é ativa e metabolizante e sua atividade está associada aos inúmeros compostos nele existentes. Portanto, numerosos nichos ecológicos são formados a partir da atividade dos microrganismos nos solos. O solo pode ser visto como um vasto local de reciclagem que continuamente recebe e modifica compostos de carbono na tendência de oxidá-los a

CO₂ e água.

Não obstante as qualidades do solo como atenuador de poluição, exercendo o papel de filtro e imobilizador de grande parte das impurezas nele depositadas, esse pode degradar-se. A capacidade do solo é limitada, podendo ocorrer alteração da sua qualidade devido ao efeito cumulativo da deposição de poluentes. Assim, não é possível desvincular-se o tratamento de um resíduo em solo dos cuidados a serem tomados para não causar rápida contaminação da área.

O Meio Ambiente possui uma capacidade natural de se regenerar, restabelecendo seu equilíbrio inicial propício à vida. Sabe-se que estes processos regeneradores naturais ocorrem com velocidades finitas e muito variáveis, em função do tipo de fator que tenha causado o desequilíbrio. Também é sabido que, ultrapassados certos limites, a capacidade regenerativa do ambiente pode ser superada, dando lugar ao aparecimento de mudanças que são irreversíveis (Gomes, 1995).

A poluição ambiental é geralmente conseqüência da atividade humana, sendo causada pela introdução de substâncias (ou de condições), que normalmente não estão no ambiente ou que nele existem em pequenas quantidades. Poluente é o detrito introduzido em um ecossistema não adaptado a ele, ou que não suporta as quantidades de poluentes que nele são introduzidos (FEEMA, 1992).

No Brasil, ainda não existe uma legislação específica para as questões que envolvam áreas contaminadas (AC). No entanto, a legislação ambiental existente oferece uma certa base, referindo-se indiretamente a diferentes aspectos do problema de áreas contaminadas, como, por exemplo, os itens que abordam a preservação ou a recuperação da qualidade ambiental, os instrumentos legais como as políticas nacional ou estadual de meio ambiente e diretrizes e normas para o controle de poluição. Há também leis específicas que estabelecem instrumentos legais especiais com certa relevância para o problema de áreas contaminadas, como, por exemplo, o parcelamento do solo urbano. De acordo com a estrutura federativa, encontram-se legislações ambientais no âmbito federal, estadual e

municipal que podem, tendo em vista a falta de legislação específica, ser utilizadas nas ações dos órgãos ambientais nas questões que envolvem esse tema. Como, por exemplo, a Lei nº 6.938/81 que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente e a Lei 9.605/98 que dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas da lei de crimes ambientais, condutas atividades lesivas ao Meio Ambiente (Lei dos Crimes Ambientais).

O petróleo e seus derivados estão entre os principais compostos orgânicos que, nos últimos decênios, têm sofrido aumento na sua produção e industrialização, aumentando, também a quantidade dos mesmos como poluente ambiental, pois, quando em contato com a água, o petróleo se espalha sobre a superfície formando uma fina película que impede a troca de gases entre o ar e a água e a chegada de luz ao fitoplâncton, afetando, assim, as cadeias alimentares. Nas plantas, veda a entrada dos estômatos, impedindo a respiração e a fotossíntese. Nos peixes e caranguejos a película de petróleo recobre as guelras e os órgãos respiratórios, impedindo a respiração. No solo, bloqueia a absorção de nutrientes pelas raízes das plantas. Como os homens e os animais não possuem enzimas capazes de promover a decomposição de petróleo, a sua ingestão impede a absorção dos alimentos pelas mucosas do aparelho digestivo, além de conter substâncias tóxicas ao organismo. (Fellenberg, 1980).

Ao longo do tempo, o petróleo foi se impondo como fonte de energia e hoje, com o advento da petroquímica, o petróleo, além de produzir combustível, passou a ser imprescindível às facilidades e comodidades da vida moderna assumindo uma importância cada vez maior na vida das pessoas. Do lençol de fibra sintética aos combustíveis, do plástico da escova de dentes ao chiclete, ele se faz presente no dia a dia em diversos momentos, sendo o componente básico de mais de seis mil produtos (Abadie, 1984).

A busca pela produtividade entra muitas vezes em conflito com as necessidades de preservar o Meio Ambiente. Um dos grandes problemas da indústria de petróleo é a quantidade de substâncias químicas que são lançadas nos solos, águas

subterrâneas, sedimentos, águas superficiais e ar. A indústria do petróleo, em suas diversas atividades – exploração, produção, refino, transporte e comercialização – apresenta um risco ambiental inerente, que precisa ser constantemente gerenciado, visando prevenir os seus impactos ao meio ambiente (Seabra, 2001).

O controle efetivo da geração, do armazenamento, do tratamento, da reciclagem e reutilização, do transporte, da recuperação do depósito dos resíduos perigosos são de extrema importância para a saúde humana, assim, como para a proteção ambiental. Uma das primeiras prioridades do manejo de resíduos perigosos é a sua minimização, como parte de um enfoque mais amplo de mudanças dos processos industriais e dos padrões de consumo, por meio de estratégias de prevenção à poluição e de tecnologias limpas (CNUMAD, 2001).

3.5. Biodegradação

A biodegradação se dá através do aproveitamento dos contaminantes pelos microorganismos como fonte de carbono que os permitem produzir novas células e, também, suprir-se de elétrons que possibilitem a obtenção de energia. A energia é obtida mediante a catálise de reações químicas que, dentre outras formas, podem ser por oxidação ou redução. O que ocorre é a quebra das ligações químicas e a transferência de elétrons do contaminante. Para microorganismos degradarem completamente o petróleo, centenas de diferentes compostos têm que ser metabolizados.

A biodegradação pode ser dividida em três categorias: (a) mineralização, onde os compostos químicos orgânicos são transformados a compostos químicos inorgânicos como dióxido de carbono, água e amônia; (b) biotransformação, onde os compostos orgânicos químicos são transformados em estruturas menores e (c) co-metabolismo, onde outro composto é metabolizado primeiramente ou simultaneamente a um composto específico (Dalton, 1982). A escolha de um método de tratamento vai depender das características físicas, físico-químicas e químicas do

resíduo e da disponibilidade de instalações para processar esses materiais (Rocca *et al.*, 1993).

Biodegradação é a transformação de compostos orgânicos pela atividade metabólica dos organismos, especialmente microrganismos. Por ser o petróleo composto principalmente de hidrocarbonetos, a sua degradação completa resulta na produção de CO₂ e água, fenômeno denominado de mineralização.

O termo biodegradação tem sido utilizado para a descrição de todos os tipos, incluindo aquelas que originam produtos menos tóxicos que o composto original, pela sua inativação, assim como aquelas responsáveis pela completa mineralização até CO₂, H₂O e outros (Musumeci, 1992).

Segundo Grishenkov *et al.* (2000), a biodegradação de hidrocarbonetos pode ocorrer sob condições aeróbicas e anaeróbicas, entretanto, sob condições anaeróbicas, a taxa e a extensão de biodegradação de hidrocarbonetos decresce e a variedade de substâncias degradadas é tipicamente mais estreita.

Cerca de 60% a 90% são hidrocarbonetos alifáticos, passíveis de biodegradação. Nessa classe, o fitano e o pristano são mais resistentes à degradação e podem ser usados como marcadores químicos em monitoramento. Entre os aromáticos, deve-se monitorar benzeno, tolueno e xileno (BTEX), mais tóxicos aos seres vivos; hopano pode ser usado como marcador químico, em monitoramento. Nos seres vivos, o petróleo pode ser incorporado às gorduras, causar distúrbios metabólicos ou interromper a quimiorrecepção.

A biorremediação de uma área degradada pode ser realizada por processo *in situ* ou *ex situ*. No primeiro, a remediação biológica é aplicada diretamente no local poluído, ao contrário dos processos *ex situ*, em que o meio impactado é removido e tratado em local apropriado.

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos que degradam substratos insolúveis em água como os hidrocarbonetos sólidos e líquidos, gorduras, óleos e graxas, usualmente produzem biosurfactantes, moléculas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que atuam como detergentes e auxiliam na disponibilidade destes compostos à célula microbiana através das emulsões formadas (Gerson, 1993).

Os microorganismos são os principais agentes responsáveis pela reciclagem do carbono na natureza, incluindo bactérias, leveduras e fungos. As bactérias capazes de degradar estes hidrocarbonetos podem, às vezes, produzir biosurfactantes, os quais melhoram a solubilidade de poluentes hidrofóbicos e assim a sua biodegradabilidade. Em muitos ecossistemas já existe uma adequada comunidade microbiana hidrocarbonoclástica nativa capaz de uma extensiva biodegradação de óleo, provando que condições ambientais são favoráveis para a atividade metabólica de degradação de óleo (Atlas, 1977).

As bactérias e os fungos são dois grupos de microorganismos dominantes na biodegradação. As bactérias têm a vantagem de reterem facilmente o substrato e proverem um rápido crescimento. Em condições favoráveis, as bactérias dominam mesmo na presença de fungos, embora degradem apenas pequenas moléculas orgânicas que são facilmente incorporadas nas suas células. *Pseudomonas* e *Nocardia* são normalmente bactérias presentes nestas situações.

Os microrganismos necessitam de condições ambientais de crescimento. Por sua vez, a velocidade e a extensão com que os componentes do petróleo são degradados dependem da existência de, pelo menos, quatro fatores principais (Rodrigues, 1984, Baird, 2002):

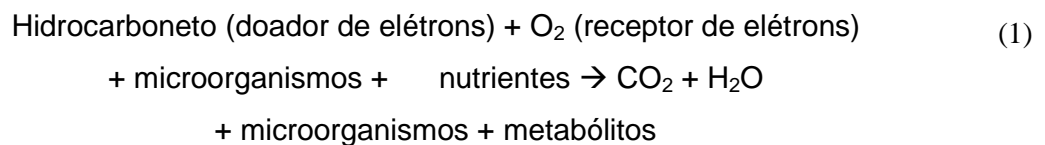
I- Umidade, para facilitar as reações;

II- Oxigênio, para rápida oxidação dos hidrocarbonetos e outros compostos do petróleo, já que sob condições anaeróbicas, a biodegradação é mais lenta e normalmente efetuada por bactérias sulfato-redutoras;

III- Contato óleo-água, devido à relativa insolubilidade do óleo na água, tal contato controla a velocidade de oxidação e da degradação;

IV- Presença de nutrientes (fosfatos, sulfatos, nitratos, etc) para o desenvolvimento microbiano.

A biodegradação do etanol e de hidrocarbonetos é uma reação de oxidação-redução realizada durante o processo respiratório microbiano, na qual estes são oxidados, ou seja, doam elétrons a um receptor. Desta forma, microorganismos presentes no solo podem consumir os hidrocarbonetos de petróleo, se estes forem utilizados como fonte de doadores de elétrons para o metabolismo microbiano para obtenção de energia, produção e manutenção celular, como demonstra a equação 1.



As bactérias se caracterizam por seu crescimento rápido, sua versatilidade metabólica, plasticidade genética e capacidade de adaptação rápida as variações ambientais. Como todos os seres vivos, as células bacterianas necessitam basicamente de energia, carbono e nutrientes (nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, etc).

No processo de biorremediação, é necessário que o pH seja compatível com os microorganismos. Bactérias desenvolvem-se com um pH ótimo entre 5 e 9, enquanto que os fungos que degradam compostos complexos tem o pH ótimo de 5 ou menos (Skaladany e Metting, 1992).

Muitas espécies de fungos desenvolvem-se em grandes intervalos de pH, desde o extremo de 9 até 3 a 4. Mas pelo fato das bactérias e actinomicetos dominarem em solo de pH próximo ao neutro, os fungos geralmente dominam as áreas com baixo

pH (Alexander, 1980). A presença da água é fundamental para a comunidade microbiana. Entretanto, a disponibilidade de oxigênio é o maior limitante para microrganismos aeróbios. A falta de oxigênio é causada principalmente pelo excesso de água no solo (Skaladany e Metting, 1992).

Os organismos mais comumente isolados em áreas contaminadas por hidrocarbonetos são bactérias heterotróficas do gênero *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* (Kobayashi e Rittmann, 1982), *Mycobacterium* (Gholson, Guire, e Friede, 1972; Soli, 1973).

A *Pseudomonas*, que é uma bactéria gram negativa, pertence a um gênero de bactérias bastante heterogêneo, capaz de utilizar diferentes compostos como a única fonte de carbono e energia para o seu crescimento.

São conhecidos 25 gêneros de bactérias e 27 de fungos, que fazem a degradação dos hidrocarbonetos no ambiente marinho (Floodgate, 1984), enquanto que nos solos são registrados 22 gêneros de bactérias e 31 de fungos (Bossert e Bartha, 1984; Rosato, 1997). Os fungos parecem ser mais importantes na biodegradação de hidrocarbonetos presentes em solos (Jones e Eddington, 1968; Rosato, 1997). Em geral, as bactérias e leveduras apresentam capacidade decrescente de degradação de acordo com o aumento da cadeia carbônica ao passo que os fungos não exibem degradação preferencial de tamanho (Walker *et al.*, 1975).

A tomada de nutrientes e posterior metabolismo são influenciados por fatores físicos e químicos do meio ambiente. Os principais fatores são: temperatura, pH, presença de oxigênio e luz.

Cada tipo de bactéria apresenta uma temperatura ótima de crescimento, em torno desta temperatura observa-se um intervalo dentro do qual o desenvolvimento também ocorre, sem, no entanto, atingir o seu máximo. Ultrapassado o limite superior, rapidamente ocorre desnaturação do material celular e, conseqüentemente, a morte da célula. As temperaturas inferiores à ótima levam a uma desaceleração

das reações metabólicas, com diminuição da velocidade de multiplicação celular, que em caso extremo, fica impedida.

Os valores de pH em torno da neutralidade são os mais adequados para absorção de alimentos para a grande maioria das bactérias. Existem, no entanto, grupos adaptados a viver em ambientes ácidos e alcalinos.

Algumas características dos fungos filamentosos, como a bioatividade e o crescimento morfológico, os tornam melhores degradadores potenciais do que as bactérias. Além disso, os fungos são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse: meios com baixos valores de pH, pobres em nutrientes e com baixa disponibilidade de água, favorecendo o seu desenvolvimento diante de outros microorganismos (Mollea *et al.*, 2005).

Os fungos geralmente crescem mais devagar e as suas dimensões superiores levam a uma relação baixa entre a superfície e o volume de retenção de substrato. No entanto, os fungos são capazes de degradar uma grande variedade de contaminantes e alguns de elevada complexidade, excretando enzimas que quebram as ligações entre os polímeros e resistem a condições bastante adversas. É importante notar que os fungos produzem grandes filamentos que podem bloquear o fluxo de ar e impedir a biodegradação pelas bactérias.

As bactérias apresentam-se em maior proporção no solo, se comparado às leveduras, atuando com efeito inibitório sobre as mesmas, competindo pelos nutrientes presentes.

A utilização de microrganismos em saneamento básico e ambiental é prática comum desde os primórdios do desenvolvimento dos processos biológicos de tratamentos de águas residuárias e resíduos sólidos. Foi a capacidade microbiana de catabolizar diferentes compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, e inorgânicos, extraindo destes compostos fontes nutricionais e, energéticas, que possibilitou o emprego

desses agentes biológicos como solução aos problemas gerados pelos rejeitos lançados no meio ambiente.

Ururahy (1998) estudaram a viabilidade técnica do tratamento biológico de borra oleosa em escala de bancada. A partir de estímulo de microrganismos nativos presentes no resíduo oleoso, concluíram que os mesmos foram capazes de crescer em meio contendo borra de óleo como única fonte de carbono e energia. A identificação desses microrganismos revelou a presença das bactérias *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas picketti*, *Flavobacterium indologenes*, *Xanthomonas maltophilia* e *Ochrobactrum anthropi*, das leveduras *Candida tropicalis* e *Rhodotorula mucilaginosa*, além de duas espécies de fungos filamentosos.

Os hidrocarbonetos possuem diferentes valores de densidade. A principal razão de se conhecer a densidade de uma substância é determinar se esta flutuará sobre a água (densidade < 1,0 mg/l) ou se mesclará com a água (densidade > 1,0 mg/l) (Ferreira *et al.*, 1998).

Os hidrocarbonetos são classificados como contaminantes de fase líquida não aquosa (NAPL) e podem ser divididos em duas subfases: a) fase líquida não aquosa densa (DNAPL – *dense non-aqueous phase liquids*) e b) fase líquida não aquosa leve (LNAPL- *light non-aqueous phase liquids*) (Hasan, 1996).

Os compostos solúveis dos NAPL's são dissolvidos pela água de infiltração que os transportam pelas zonas saturadas até as zonas insaturadas (Hasan, 1996).

Para a biodegradação dos hidrocarbonetos é essencial uma reação redox, em que o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétron) e um aceptor de elétron é reduzido. Existem diferentes compostos que podem agir como aceptores de elétron, entre eles o oxigênio (O₂), o nitrato (NO₃⁻), os óxidos de Fe (III), o sulfato (SO₄⁼), entre outros. Bactérias aeróbicas usam oxigênio molecular como aceptor de elétron e bactérias anaeróbicas usam outros compostos, tais como nitrato (NO₃⁻²), óxidos de Fe (III), sulfato (SO₄⁼) como aceptor de elétron. O oxigênio é o aceptor preferencial, pois os

microorganismos ganham mais energia nas reações aeróbicas. Dentre os aceptores de elétron das reações anaeróbicas, o nitrato é um dos íons mais encontrados em águas naturais, ocorrendo geralmente em baixos teores nas águas superficiais, mas podendo atingir altas concentrações em águas subterrâneas (Borden *et al.*, 1995).

A ingestão de nitrato, através das águas de abastecimento, está associada à indução à metemoglobinemia, especialmente em crianças, e à formação potencial de nitrosaminas e nitrosamidas carcinogênicas, dois efeitos adversos à saúde. O desenvolvimento da metemoglobinemia com base no nitrato presente nas águas potáveis depende de sua conversão bacteriana a nitrito durante a digestão que ocorre no trato gastrointestinal. As crianças, principalmente as menores de três meses de idade, são bastante suscetíveis ao desenvolvimento dessa doença por causa das condições mais alcalinas do seu sistema gastrointestinal, fato também observado em pessoas adultas que apresentam gastroenterites, anemia, porções do estômago cirurgicamente removidas e mulheres grávidas (Alaburda e Nishihara, 1998). Portanto, existem dois motivos para que seja determinada a concentração de nitrato em água de consumo humano contaminada por BTEX, primeiro, como fator benéfico, por ser um aceptor de elétron no processo de biodegradação dos BTEX, e o segundo, que é maléfico, por ser um parâmetro de avaliação da contaminação de águas por compostos nitrogenados que, no caso do nitrato, é prejudicial à saúde humana acima de 10 mg.L^{-1} segundo estabelecido pelo Ministério da Saúde na Portaria 518/2004 (MS, 2004).

Cassarini *et al.* (1988) relatam, que o tratamento de resíduos oleosos de petróleo está sujeito a vários mecanismos que promovem a degradação. Muitas das substâncias do petróleo são voláteis e instáveis sob condições normais. O óleo está sujeito à evaporação, fotoevaporação, adsorção, percolação e biodegradação. Citam ainda que aproximadamente 50% do carbono presente no teor de óleos e graxas de um lodo oleoso é convertido para biomassa e húmus no solo.

O potencial de biodegradação de hidrocarbonetos, utilizando microrganismos isolados de solos poluídos por compostos tóxicos, vem sendo descrita como prática de grande eficiência, baixo custo e crescente utilização. Dentre outras linhagens

selecionadas, uma cultura do gênero *Acinetobacter* apresentou-se como efetiva na assimilação de hidrocarbonetos aromáticos e resinas em óleos (Chaîneau *et al.*, 1999).

Alcanos de cadeia ramificada, alcenos e cicloalcanos são atacados por uma limitada faixa de organismos. Compostos aromáticos são parcialmente oxidados por muitos, mas são assimilados por poucos organismos. Aromáticos polinucleares são menos tóxicos que aromáticos simples e são metabolizados por poucos organismos a baixas taxas de degradação. Cicloalcanos são bem tóxicos e a degradação inicial é geralmente acompanhada de cometabolismo. As classes mais resistentes são os poliaromáticos, substâncias alicíclicas (como os tripentacíclicos, hopanos) e os alifáticos de cadeia muito longa (Atlas, 1981).

A seqüência de degradação de hidrocarbonetos no solo é determinada por uma sucessão de microorganismos. Microorganismos degradadores de alcanos, com rápidas taxas de crescimento competem com os decompositores de lento crescimento de hidrocarbonetos mais recalcitrantes pelos recursos nutricionais até a exaustão dos primeiros. Estes organismos serão substituídos por micróbios com lenta taxa de crescimento, mas grande flexibilidade metabólica para degradar os hidrocarbonetos mais recalcitrantes. A relativa biodegradabilidade dos hidrocarbonetos tem sido reportada (em ordem de decréscimo de degradabilidade): alcanos lineares (C₁₀ a C₁₉), gases (C₂ a C₄), alcanos (C₅ a C₉), alcanos ramificados com até 12 carbonos, alcenos (C₃ a C₁₁), alcenos ramificados, aromáticos e cicloalcanos. A tendência é encontrar menos microorganismos com o aumento da dificuldade de degradação (Heely *et al.*, 1992).

A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo se inicia com a oxidação do substrato por oxidases, em condições aeróbias. Os alcanos são transformados em ácidos carboxílicos, os quais são também metabolizados pelos microorganismos. Os compostos aromáticos são geralmente hidroxilados, formando dióis, os quais são degradados a catecóis.

Muitos hidrocarbonetos como n-alcenos são facilmente degradados por um grande número de microorganismos os quais os usam como fonte de carbono e energia. Por outro lado, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHS) e os cicloalcanos são principalmente degradados por co-oxidação no meio ambiente (Bouchez *et al.*, 1995).

O petróleo cru no ambiente nunca é completamente degradado, sempre persistindo resíduos mais complexos, geralmente contendo compostos asfálticos, os quais são mais inertes, possuem baixa disponibilidade e toxicidade e não apresentam grandes riscos ecológicos aparentes (Atlas, 1995). Devido às características de determinados contaminantes, inclusive sua concentração, por vezes a degradação não acontece por completo, gerando os produtos recalcitrantes, que podem apresentar um nível de toxicidade bastante perigoso ou mais alto que o próprio contaminante original. Em geral, quanto maior é o número de átomos de carbono do composto presente no petróleo, maior será a sua persistência no ambiente, mais lenta será a sua evaporação e a sua solubilidade e menor será a sua susceptibilidade à biodegradação (Marques *et al.*, 2002).

Quando um substrato é adicionado ao solo, este é prontamente utilizado pelos organismos colonizadores pioneiros, favorecendo sua competição, e isso leva a uma seletividade dos mais aptos, dependendo da velocidade de crescimento, rapidez de assimilação de nutrientes e tolerância aos fatores bióticos e abióticos (Cardoso, 1992). Posteriormente, poderá ocorrer alteração na comunidade microbiana, considerando que há uma modificação no substrato, ou seja, alguns microrganismos vão sendo eliminados, dando lugar a outros mais aptos a degradarem os novos substratos. A degradação microbiológica possui uma seqüência preferencial de compostos a serem degradados. Os hidrocarbonetos alifáticos (alcenos e alcenos) são mais rapidamente e facilmente degradados, seguidos pelos hidrocarbonetos aromáticos e finalmente cicloalcanos. Quando há multiplicidade de compostos em um determinado ambiente, os microorganismos dão preferência àqueles que são de digestão fácil ou fornecem mais energia.

Nem sempre os contaminantes encontram-se dispostos de uma forma facilmente assimilável pelos micróbios que os devem degradar. Em razão desse fator, os contaminantes a serem degradados podem não ser degradados ou serem de forma extremamente lenta em razão de uma baixa concentração (Martins *et al.*, 2003).

A população microbiana da camada reativa de solo é resultado da seleção e aclimatação de microorganismos capazes de degradar os resíduos adicionados e seus subprodutos de ressíntese e intermediários resultantes da degradação (população ativa), e de microorganismos que convivem neste ecossistema sem necessariamente estarem envolvidos diretamente na degradação (população associada). Conforme as condições do solo (aeração, pH, temperatura, salinidade, atividade aquosa, nutrientes, presença de compostos tóxicos, etc.), pode haver variações na relação população ativa e população associada e, também na biomassa microbiana de camada reativa do solo (Almeida e Carvalho, 1995).

Segundo Bicego (1988), a degradação do óleo é bem mais lenta no sedimento do que na água, inclusive os compostos mais leves persistem mais tempo no sedimento.

Muitos estudos têm empregado culturas mistas de bactérias ou bactérias-fungos para maximizar a degradação. As vantagens do emprego de culturas mistas ao invés do uso de culturas puras na biorremediação de solos contaminados têm sido amplamente demonstradas. Isso pode ser atribuído aos efeitos das interações de sinergismo entre os membros das associações.

Muitos compostos considerados não biodegradáveis em culturas puras passam a ser biodegradáveis em cultura mista; isto porque, o cometábolo uma vez transformado por uma determinada espécie, pode resultar em uma substância útil para outra espécie, podendo ser assimilado em uma via metabólica comum (Ururahy, 1998).

A completa degradação de um composto orgânico para CO₂ (mineralização) e outros minerais constituintes é o resultado da atividade microbiana, tanto individual como em um consórcio.

Os n-alcenos são considerados os mais facilmente degradáveis e já foi comprovada a biodegradação de até C₄₄ (Hainnes e Alexander, 1974). A biodegradação dos n-alcenos procede normalmente por um ataque monoterminal: há formação de um álcool primário, seguido de um aldeído e um ácido carboxílico (Mackenna e Kallio, 1964; Van Eyk e Bartels, 1968). O ácido carboxílico é degradado via β -oxidação com a formação de ácidos graxos com dois carbonos a menos e a formação de acetil-coenzima A, com liberação eventual de CO₂. Alguns ácidos graxos tóxicos, podem se acumular durante o processo de biodegradação (Atlas e Bartha, 1973).

Os alcanos ramificados fazem β -oxidação, como via de degradação mais comum, com formação de ácidos dicarboxílicos (Fall *et al.*, 1979). Os grupos metil aumentam a resistência dos hidrocarbonetos ao ataque microbiano. O ciclo alceno é particularmente resistente à biodegradação (Chosson *et al.*, 1991), porém há estudos mostrando que os hidrocarbonetos cíclicos, até seis anéis condensados, podem ser degradados (Walker *et al.*, 1975).

Os compostos aromáticos de até três anéis são degradados mais facilmente. Tipicamente, a degradação bacteriana envolve a ação de uma dioxigenase que gera a formação de um diol, com subsequente clivagem e formação de um diácido. Os compostos aromáticos mais leves estão sujeitos a evaporação e a degradação microbiana no estado dissolvido. O ataque enzimático pode ser no substituinte alquil ou diretamente no anel (Gibson, 1971; Rosato, 1997). Há linhagens de microorganismos capazes de degradar compostos com cinco ou mais anéis aromáticos. Geralmente a oxidação dos hidrocarbonetos aromáticos se processa produzindo principalmente fenóis.

A biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) por uma cultura mista microbiana, foi descrita por Yuan *et al.* (2000). As culturas foram selecionadas

de locais conhecidos por contínuos descartes de efluentes petroquímicos no sul de Taiwan e cultivadas em meio mineral mínimo, contendo como única fonte de carbono, o fenantreno.

Segundo Corseuil e Maris (1997), a biodegradação dos compostos BTEX pode ser representada por uma reação química onde os hidrocarbonetos, em presença de um aceptor de elétrons, nutrientes e microorganismos são transformados em água, dióxido de carbono, e mais microorganismos. Os aceptores de elétrons, compostos que recebem elétrons e são, portanto, reduzidos, são principalmente o oxigênio, nitrato, ferro férrico e sulfato.”

Os hidrocarbonetos mais leves, com 4 a 12 carbonos são os primeiros a volatilizarem, pois quanto maior o número de carbonos, menos volátil é o hidrocarboneto. O aumento da cadeia de carbonos normalmente está associado a menor mobilidade do composto no solo e a maior facilidade em ficar adsorvido a matéria orgânica. Os hidrocarbonetos com 10 a 20 carbonos, mais densos, são menos voláteis, menos solúveis em água e apresentam menor mobilidade no ambiente do que os mais leves (Finotti *et al.*, 2001).

Alcanos C_{10} a C_{26} são mais facilmente degradados. Entre os aromáticos, os de baixa massa molecular como o benzeno, tolueno e xileno, que estão entre os componentes tóxicos do petróleo são facilmente degradados pelos microorganismos marinhos. Moléculas com estruturas mais complexas, contendo ramificações e anéis aromáticos são degradados por um número menor de microorganismos e com uma taxa de degradação menor, se comparadas com moléculas de estrutura mais simples.

3.6. Solo

Os solos se caracterizam por serem ambiente de vida, apresentando uma microbiota ativa, inclusive atuante em processos de dispersão e decomposição de poluentes.

O solo é um corpo natural, com uma composição extremamente diversa, em que interagem com uma enormidade de fatores, como o clima, material de origem e sua utilização pelo homem, entre outros (Kabatas-Pendias *et al.*, 1986).

Suas interações entre as propriedades químicas, físicas e biológicas extremamente complexas e, inclusive, as condições locais com as interações antropogênicas, criam especificidades que precisam ser consideradas para análise de processos de contaminação, pois cada sítio é um ambiente específico, com características únicas.

O solo é constituído por três fases: sólida, líquida e gasosa. A fase sólida é constituída pelo material parental (rocha) local ou transportado e material orgânico, originário da decomposição vegetal e animal. A fase líquida do solo (elementos orgânicos e inorgânicos em solução) e fase gasosa, de composição variável, de acordo com os gases produzidos pelas raízes das plantas e dos animais, conforme pode-se visualizar na figura 5.

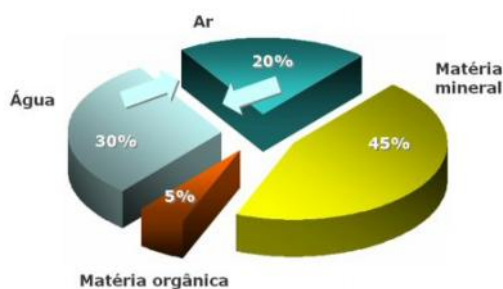


Figura 5 – Constituição do solo em seus três tipos de fases: sólida, líquida e gasosa. Fonte: José Salsa (2004).

As propriedades físicas, químicas e biológicas do solo são determinadas pelo processo geológico de sua formação, origem dos minerais, e sua evolução de acordo com o clima e o relevo do local, além dos organismos vivos que o habitam.

A fração do solo chamada matéria orgânica é constituída por um sistema complexo de substâncias, cuja formação depende da adição contínua de restos de plantas e

animais, e materiais excretados pelos mesmos, independente de seu estado de decomposição, transformação, alterações químicas e enzimáticas e ressíntese (Alexander, 1967)

O solo possui, naturalmente, diversos microrganismos com atividades metabólicas variadas capazes de degradar óleo cru. Entretanto, a técnica de biorremediação em solos contaminados com óleo cru sofre limitação devido ao baixo nível de disponibilidade dos hidrocarbonetos (baixa solubilidade em água, alta fixação sobre a matriz do solo e pouca transferência dos poluentes absorvidos da fase sólida para a fase aquosa). Dessa forma, a utilização de um biosurfactante pode minimizar estes problemas e aumentar os índices de biodegradação de óleo cru (Volkering *et al.*, 1995).

Conjuntamente com a matéria orgânica do solo, a biota (macro e micro) tem fundamental importância nas reações que ocorrem nos solos e principalmente sobre a interação com os compostos orgânicos como os hidrocarbonetos. A energia para o crescimento microbiano provém da decomposição enzimática dos compostos orgânicos e da decomposição dos compostos inorgânicos e metais (Alexander, 1977).

Os solos de mangue são formados pela deposição de partículas de origem terrígena e marinha, orgânicas e inorgânicas, que estão em suspensão na água, e que se movimentam em função das correntes de fluxo e refluxo das marés. Por meio da ação mecânica, as partículas grossas se depositam primeiro, seguidas das partículas de argila e silte, as quais se agregam e sedimentam após floculação (Vannucci, 1999; Stralher, e Stralher, 2000 ; Woodhouse *et al.*, 1974). Apesar da origem e transporte dos sedimentos serem similares, os solos de mangue podem apresentar características diferentes devido à variação na intensidade de geração e do transporte dos mesmos.

Os manguezais são considerados verdadeiros celeiros biológicos, abrigando espécies típicas desses sistemas ou aquelas que passam, pelo menos, uma parte

do ciclo de vida, podendo ainda ser tratados como recurso renovável finito, quando se considera a sua produção natural ou como um recurso não renovável, quando substituídos por aterros, lixões, empreendimentos imobiliários ou distritos industriais (Maciel, 1991).

Esses sistemas desempenham funções como manutenção e preservação da linha de costa, retenção de sedimentos, filtro biológico e berçário, sendo ainda exportadores de carbono orgânico e de nutrientes para as águas costeiras. O ecossistema de manguezal é considerado área de preservação permanente (Lei Federal nº 4.771, 15/09/65) e reserva biológica, “em toda a sua extensão” (Res. CONAMA, nº 004, 18/09/85).

O petróleo e seus derivados podem persistir por mais de 20 anos nos manguezais, antes que a vegetação se recupere totalmente (Michel, 2002). Esta alta persistência é explicada pela lenta biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo, devido à limitação de oxigenação do meio e lenta ciclagem de nutrientes, essenciais para a atividade microbiana aeróbia (Sherrer e Mille, 1989).

3.7. Biorremediação

A biorremediação é o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microrganismos para degradar substâncias toxicamente perigosas, transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas, possibilitando a despoluição de áreas contaminadas.

O objetivo principal da biorremediação é criar condições favoráveis para o crescimento e atividade bacterianas.

A biorremediação baseia-se em três aspectos principais: a existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante; a

disponibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático e condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador.

A área será considerada contaminada se, entre outras situações, as concentrações de elementos ou substâncias de interesse ambiental estiverem acima de um dado limite denominado valor de intervenção, indicando a existência de um risco potencial de efeito deletério sobre a saúde humana, havendo a necessidade de uma ação imediata na área, a qual inclui uma investigação detalhada e a minimização das vias de exposição como a restrição do acesso de pessoas a área e suspensão do consumo da água subterrânea.

A eficiência da biorremediação depende da biota (microorganismos com enzimas capazes de degradar o contaminante), das propriedades do contaminante (o contaminante tem que estar biodisponível), das condições físico-químicas da água tais como pH adequado e temperatura adequada, da biodisponibilidade dos nutrientes necessários aos microorganismos, da presença de receptores de elétrons, da ausência de substâncias tóxicas aos microorganismos e de um grau de biodegradação maior do que o grau de migração da água subterrânea (Nriagu, 1989; Alexander, 1994; Corseuil e Alvarez, 1996). O monitoramento destes parâmetros permite avaliar e compreender a cinética microbiana mostrando a persistência dos compostos químicos no ambiente, como as respectivas concentrações em que estes podem estar sendo transportados a possíveis sítios de exposição ao homem e outras espécies (Alexander, 1994). Sendo assim, estudos sobre fatores que influenciam os mecanismos de ação microbiana na degradação de compostos orgânicos de interesse são de extrema importância já que podem otimizar as tecnologias de biorremediação, auxiliando nos processos de descontaminação de solos e águas subterrâneas.

A escolha de uma técnica para remediar em uma área contaminada dependerá de um grande número de variáveis, incluindo tipo de poluentes do solo, os tipos de solo, as condições de circulação das águas subterrâneas, e a natureza do risco à saúde

humana e aos ecossistemas decorrentes da presença desses poluentes (Rodriguez, 2006).

A técnica da biorremediação pode ser classificada como *“in situ”* e *“ex situ”*. No tratamento *“in situ”* a técnica envolve tratamento no próprio local contaminado e no tratamento *“ex situ”* o material contaminado é removido para outro lugar e tratado.

A técnica de biorremediação é aplicada por meio da bioaugmentação e da bioestimulação. A bioaugmentação ocorre pela adição de microrganismos específicos em regiões impactadas, adaptados em laboratório às condições ambientais. Ao usar essa técnica, faz-se a avaliação dos microrganismos presentes no ambiente, identificando-se os degradadores de óleo. Em seguida, através de bioreatores estimula-se em laboratório, o crescimento microbiano das espécies de interesse e, posteriormente, injeta-se o *“pool”* de microrganismos no local contaminado com o objetivo de aumentar a população microbiana, responsável pela degradação do óleo.

A bioestimulação é a aceleração da reprodução microbiana e de suas atividades metabólicas, pela adição de oxigênio, água e nutrientes ao meio ambiente contaminado. Tanto a adição de água como a oxigenação do ambiente contaminado favorece a atuação da biodegradação.

O sucesso total por tratamentos de biorremediação depende de inúmeros fatores, tais como: característica do resíduo, presença de condições microbiológicas ótimas, a seleção correta da tecnologia de biorremediação, o uso de métodos analíticos apropriados para determinar o tipo e a extensão da contaminação (Huesemann, 1994).

Geralmente, os microrganismos utilizados para o tratamento biológico são organismos que existem na natureza. Estas populações microbianas podem ser dominadas por uma única espécie em particular, ou podem interagir com um grande número de espécies para atuar em um poluente particular.

A biodegradação tem enormes vantagens. Em primeiro lugar, como os microorganismos estão presentes em todos os ambientes, muitas vezes, o processo pode ser realizado no próprio local, é impossível incinerar-se um solo de milhões de hectares contaminados, mas a biodegradação está em curso em todos os hectares.

Em segundo lugar, é um processo que permite grande desenvolvimento:

- 1) Pela seleção de mutantes capazes de degradação mais eficiente;
- 2) Pela engenharia genética, que permite a transferência de genes, responsáveis pelas enzimas de degradação a microrganismos já ambientados no local;
- 3) Pela versatilidade nas estações de tratamento.

Finalmente seus custos são muito mais baixos que aqueles processos de incineração e, por isso, a biodegradação se torna o único método viável (Langenbach, 1994).

Microrganismos que degradam hidrocarbonetos estão amplamente distribuídos no solo e em ambientes aquáticos. Populações desses microrganismos normalmente constituem menos que 1% da comunidade microbiana total, mas quando hidrocarbonetos estão presentes, essas populações aumentam em 10% da comunidade (Atlas, 1995).

Os hidrocarbonetos de petróleo, por serem poluentes hidrofóbicos, tendem a ficar sorvidos na matriz do solo, diminuindo assim a sua disponibilidade aos microorganismos e, conseqüentemente limitando a sua biodegradação.

A adição de biossurfactante na técnica de biorremediação tem efeitos positivos em relação à dessorção dos COHs (compostos orgânicos hidrofóbicos) sorvidos no solo e ao aumento da solubilidade dos mesmos.

Os biossurfactantes diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (Nitschke e Pastore, 2002).

Os microrganismos são capazes de consumir os hidrocarbonetos de petróleo e os biossurfactantes, utilizando-os como fonte de carbono e de energia. Sendo assim, a geração de CO₂ nos ensaios de biodegradação seria tanto do biossurfactante quanto dos hidrocarbonetos presente no solo contaminado.

Diferentes microrganismos utilizam diferentes processos metabólicos para obter energia. Heterotróficos aeróbicos empregam a respiração para oxidar compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Os heterotróficos são os mais importantes para degradação de contaminantes orgânicos e podem obter energia da fermentação, respiração aeróbica e anaeróbica (Alexander, 1977).

Os microrganismos presentes no solo, embora ocupem pequena porcentagem em seu volume total, desempenham uma função fundamental sobre a matéria orgânica e sobre a sua mineralização. Portanto, o consumo de oxigênio ou a produção de gás carbônico são técnicas geralmente úteis para se avaliar o grau de mineralização de um composto orgânico disposto no solo.

Segundo Atlas (1995), durante a biorremediação de um derramamento de óleo em águas marinhas, a taxa de biodegradação aumentou de 3 a 5 vezes após a aplicação de fertilizantes. Margesin e Schinner (2001) compararam a biorremediação de solo poluído por óleo diesel com concentração inicial de 2612 mg/kg de solo através da atenuação natural e bioestimulação por fertilizantes e verificaram redução de aproximadamente 70% no solo bioestimulado enquanto que no solo não tratado a redução foi de 50%.

Ururahy (1998) estudaram a biodegradação de resíduos oleosos de petróleo em meio líquido e verificaram que a eficiência da biodegradação no meio contendo 5% (v/v) de resíduo foi maior do que a eficiência da biodegradação no meio contendo 10% (v/v) do mesmo. O fato é que em altas quantidades, as populações microbianas podem sofrer inibição pelo efeito tóxico do resíduo.

Considerando que os microorganismos têm a capacidade de biodegradação de petróleo e seus derivados, tais microrganismos poderão ser utilizados em programas de biorremediação de áreas impactadas por poluentes derivados de petróleo, com intuito de otimizar esse processo.

A taxa de decomposição de compostos orgânicos depende da própria composição química e dos fatores do solo como a textura, infiltração e permeabilidade, capacidade de retenção da água, densidade, conteúdo de matéria orgânica, capacidade de troca de cátions, conteúdo de macronutrientes, salinidade e micronutrientes (Atlas, 1981).

3.8. Respirometria Aeróbia

A respirometria é uma metodologia bastante adequada à quantificação da atividade biológica aeróbia, a qual determina a velocidade de respiração de uma biomassa ativa.

A NBR 14.283 especifica o método respirométrico de Bartha para determinação do índice de biodegradação da matéria orgânica contida em resíduos a serem tratados em solos. Por meio desse método é possível avaliar a tratabilidade de resíduos em solos e inferir as condições de manejo de sistema de tratamento de resíduos em solo.

O método respirométrico de Bartha, adaptado de uma norma holandesa, é um método simples e economicamente viável para determinar a atividade microbiológica pela geração de gás carbônico e, indiretamente, a biodegradação de contaminantes orgânicos no solo.

O oxigênio pode ser fornecido sem fluxo de ar, com retenção passiva de CO₂, e com fluxo de ar, contínuo ou intermitente, pelo sistema chamado de aeração forçada. O primeiro processo é de simples utilização, principalmente quando se tem um grande

número de tratamentos envolvidos, porém pode se tornar limitado em ensaios prolongados (Caldeira, 1997).

O CO₂ liberado na respirometria é capturado pelo NaOH e determinado por condutivimetria. O método da condutivimetria usa a relação direta entre as produções de CO₂ e as mudanças de condutividade da solução básica receptora para análise de biodegradabilidade. Junto com os íons de uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH), o CO₂ gerado produz carbonato de sódio (Na₂CO₃). O carbonato é menos dissociável que a base, e mostra uma menor condutividade. A relação linear entre a quantidade de CO₂ liberada e as mudanças na condutividade pode ser usada para determinar a formação de CO₂ com bastante precisão.

Os métodos utilizados para a determinação da eficiência de biodegradação baseiam-se na medição de CO₂ gerado no processo de biodegradação e construção de uma curva da massa acumulada desse CO₂ em função do tempo, que deverão apresentar fases distintas, tais como: início da curva com baixíssima inclinação, que deverá corresponder à fase de adaptação dos microrganismos, seguida de um elevado crescimento exponencial, uma vez que nesta fase estará ocorrendo elevada atividade microbiana e, por fim, a formação de um patamar, onde a eficiência da biodegradação é drasticamente reduzida (Borges, 2006).

3.9. Modelos cinéticos

O conhecimento da cinética da biodegradação é essencial para a avaliação da persistência dos poluentes orgânicos e a avaliação a exposição de humanos, animais e plantas. A degradação de substâncias químicas, a quantidade que desaparece com o tempo e a forma do desaparecimento da curva é função do composto em questão, sua concentração, os organismos responsáveis e a variedade de fatores ambientais.

Uma determinação importante no estudo da cinética de uma reação química é a da ordem da reação, que pode ser de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem.

A forma integrada da lei de velocidade mostra que a reação de zero ordem dá uma linha reta em uma figura se os valores medidos das concentrações do reagente forem colocados na figura em função do tempo. A inclinação da reta será a constante da velocidade de zero ordem aparente. Esta constante de velocidade de zero ordem deve ter a mesma unidade que a velocidade da reação, a qual é em $\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$. A equação 2 demonstra a equação de ordem zero.

$$C = C_0 - k.t \quad (2)$$

Onde,

C = quantidade total acumulada de CO_2 liberada no tempo t de incubação;

C_0 = indica a quantidade de CO_2 produzida num tempo infinito, ou em termos práticos, a quantidade total de CO_2 produzida quando a liberação desse gás deixa de ter acréscimos mensuráveis após um período de incubação;

k = constante de velocidade de primeira ordem de reação de degradação.

t= tempo

O modelo de primeira ordem baseia-se no princípio de que a velocidade de decomposição de determinado substrato, em determinado instante, é diretamente proporcional à quantidade de substrato presente neste mesmo momento (Lathan, 1974). Como a quantidade do substrato é máxima no início e diminui com o tempo, a velocidade de decomposição é decrescente.

Utilizou-se a cinética para avaliar as taxas de degradação dos hidrocarbonetos testados na respirometria. O conhecimento dos parâmetros cinéticos é de extrema importância para a modelação do processo bioquímico, pois permite avaliar as velocidades de utilização de substrato e de crescimento de biomassa, nas condições estabelecidas (Zaiat *et al.*, 1997).

Levando em consideração a importância da cinética na biodegradação dos compostos químicos utilizou-se um modelo cinético de primeira ordem (Equação 3), de acordo com Jenkinson e Rayner (1977) para avaliar a taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos expressa por k.

$$C = C_0(1 - e^{-kt}) \quad (3)$$

Onde,

C = quantidade total acumulada de CO₂ liberada no tempo t de incubação;

C₀ = indica a quantidade de CO₂ produzida num tempo infinito, ou em termos práticos, a quantidade total de CO₂ produzida quando a liberação desse gás deixa de ter acréscimos mensuráveis após um período de incubação;

k = constante de velocidade de primeira ordem de reação de degradação.

t = tempo da reação

A matéria orgânica é um sistema complexo, formado via de regra por uma gama de compostos orgânicos diferentes, constituindo diferentes compartimentos, aos quais se pode atribuir velocidades de degradação diferenciadas. Nesse sentido, pode-se adotar um modelo estendido de cinética de primeira ordem considerando-se mais de uma fase, como mostrado na equação 4.

$$C = C_1(1 - e^{-k_1t}) + C_2(1 - e^{-k_2t}) \quad (4)$$

Onde,

C = quantidade total acumulada de CO₂ liberada no tempo t de incubação;

C₁ = indica a quantidade de CO₂ produzida num tempo infinito, ou em termos práticos, a quantidade total de CO₂ produzida quando a liberação desse gás deixa de ter acréscimos mensuráveis após um período de incubação, na fase rápida;

C_2 = indica a quantidade de CO_2 produzida num tempo infinito, ou em termos práticos, a quantidade total de CO_2 produzida quando a liberação desse gás deixa de ter acréscimos mensuráveis após um período de incubação, na fase lenta;

t= tempo da reação

k_1 = constante de velocidade de primeira ordem de reação de degradação, na fase rápida.

k_2 = constante de velocidade de primeira ordem de reação de degradação, na fase lenta.

Na avaliação do comportamento da matéria orgânica no solo é conveniente de ajustar um modelo de cinética, pois através de parâmetros numéricos, como constante de velocidade, o processo pode ser relacionado com diferentes variáveis (Reis e Rodella, 2002).

Walker *et al.*, (1976) pesquisaram as taxas de biodegradação de componentes do petróleo e concluíram que a degradação microbiana dos componentes do óleo cru é um processo dinâmico caracterizado pela biodegradação das várias frações e diferentes taxas.

Por se tratar de equações exponenciais, observa-se que quando maior a magnitude de k melhor o desempenho do processo. Os valores de k são característicos para cada tipo de substrato e existem vários fatores que podem influenciar na taxa de degradação do substrato, principalmente, quando o substrato utilizado é sólido. A constante de biodegradação fornece uma idéia da velocidade com que o substrato é bioestabilizado no interior do reator. Assim, quando maior o valor da constante maior a taxa de bioestabilização do material.

Para a cinética de segunda ordem, as leis da velocidade de segunda ordem envolvem dois reagentes, e para ambos a concentração depende do tempo. Devido ao fato de haver várias pequenas diferentes formas possíveis de leis da velocidade de segunda ordem, é mais conveniente tratá-las separadamente. A formula da cinética de segunda ordem é demonstrada segundo a equação 5.

$$C = C_0 \frac{1}{1 + k \cdot C_0 \cdot t} \quad (5)$$

Onde,

C = quantidade total acumulada de CO₂ liberada no tempo t de incubação;

C₀ = indica a quantidade de CO₂ produzida num tempo infinito, ou em termos práticos, a quantidade total de CO₂ produzida quando a liberação desse gás deixa de ter acréscimos mensuráveis após um período de incubação;

k = constante de velocidade de primeira ordem de reação de degradação.

t = tempo da reação

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo baseou-se em isolar e caracterizar os microrganismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo. Para isso, utilizaram-se solos de horta e mangue, que são solos ricos em matéria orgânica, para a obtenção das cepas e posterior ensaio da biodegradabilidade. A figura 6 apresenta o fluxograma das etapas do experimento.

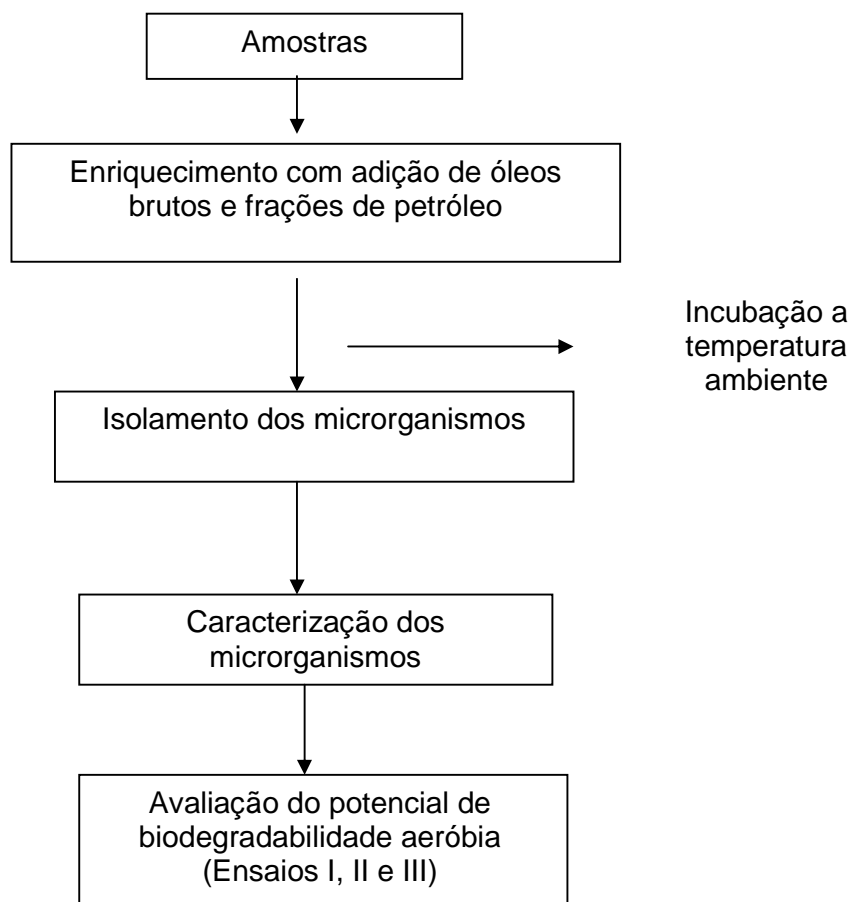


Figura 6 – Fluxograma de etapas do experimento de respirometria aeróbia.

4.1 Coleta e enriquecimento de amostras

4.1.1 Fase de enriquecimento

Foram coletados os seguintes solos como fonte de inóculo na fase de enriquecimento das amostras:

- Solo de mangue
- Solo de horta

As amostras foram coletadas de acordo com os procedimentos segundo a NBR 14.283 e encaminhadas ao Laboratório de Saneamento da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. O solo de mangue foi coletado do Campus da UFES de Goiabeiras e o solo orgânico de uma residência doméstica, sem adição de agrotóxicos.

Para a fase de enriquecimento, as amostras coletadas foram dispostas em dois recipientes, sendo o primeiro com 50 g de solo de mangue e o segundo com 50 g de solo de horta. Foram adicionados 50 g de areia e 5% de hidrocarboneto em cada recipiente.

As amostras de hidrocarbonetos utilizados foram cedidas pelo Laboratório de Pesquisa de Desenvolvimento de Metodologias para Análises de Petróleos – LABPETRO UFES, sendo provenientes de quatro tipos de reservatórios diferentes I, II, III e IV. As principais características dos hidrocarbonetos estudados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Características das frações de petróleo e óleos brutos avaliados

Óleos brutos e frações de petróleo	Temperatura (°C)	Densidade Relativa (g/cm ³)	°API	Origem
FD 6	377	0,9004	25,0	Reservatório I
FD 17	134	0,7468	56,9	Reservatório I
FD 26	226	0,8264	38,9	Reservatório I
FD 30	360	0,8948	26,0	Reservatório I
FD 23	277	0,8494	34,3	Reservatório I
FD 13	475	0,9524	16,5	Reservatório II
FD 29	323	0,8858	27,6	Reservatório II
FD 31	360	0,9086	23,6	Reservatório II
Óleo bruto (1)		0,9039	40	Reservatório III
Óleo bruto (2)		0,8906	28	Reservatório IV

FD = Fração destilada.

Fonte: Labpetro – UFES

As misturas foram dispostas em recipientes plásticos de 600 mL sem tampa, umedecidos com água deionizada e protegidos da luz, incubados por 60 dias, a temperatura ambiente para o crescimento de microrganismos com capacidade de biodegradação.

4.2 Isolamento e Caracterização dos microrganismos

4.2.1 Isolamento de bactérias

Os microrganismos isolados de ambientes naturais pertencem a uma população mista. Ao determinar as características de um microrganismo, ele deve estar em cultura pura, ou seja, em que todas as células na população são idênticas no sentido de que elas se originaram de uma mesma célula parental.

Para a fase de isolamento, adicionou-se 1 g da mistura enriquecida a 10 mL de Cloreto de Sódio a 0,75% (NaCl). A partir disso, uma alíquota da solução foi inoculada em placa de Petri contendo Meio Mínimo e hidrocarbonetos. Utilizou-se a técnica de esgotamento por meio de estrias superficiais, onde a amostra é semeada na superfície do meio solidificado com uma alça de semeadura para esgotar a

população, assim em algumas regiões do meio, células individuais estarão presentes. Após a semeadura, as placas inoculadas foram mantidas em temperatura ambiente até o visível crescimento das colônias bacterianas.

Para o isolamento de culturas puras, uma colônia individual foi transferida da placa de Petri para outra placa, com a mesma composição da primeira. Este procedimento foi repetido por três vezes até a total purificação das amostras.

4.2.2 Meios de Cultivo

Para o preparo do meio de cultura sólido (Meio Mínimo), utilizaram-se as substâncias descritas nas tabelas 4 e 5, de acordo com Pelczar (1996) e Chernicharo (1997). A mistura foi convenientemente homogeneizada e esterilizada em autoclave e conservada em geladeira até ser usada.

Para o preparo das placas de Petri utilizou-se 5% (p/v) de hidrocarboneto derivado do petróleo para 20 mL de Meio Mínimo em cada placa de Petri, as quais foram devidamente identificadas e conservadas em geladeira. A seguir foram preparadas as placas de Petri por meio da adição de hidrocarbonetos.

Tabela 4 – Composição do Meio Mínimo (MM)

Substância	Quantidade
Cloreto de sódio anidro (NaCl)	1g/l
Sulfato de amônio anidro ((NH ₄) ₂ SO ₄)	5g/l
Fosfato de sódio monobásico anidro (Na ₂ HPO ₄)	6,2 g/l
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,9 g/l
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ . 7 H ₂ O)	0,3 g/l
Solução micronutriente	1ml/l
Água deionizada	1000 ml

Para o meio sólido adicionou-se 15g/l de Agar.
Fonte: Pelczar(1996)

Tabela 5 – Solução de Micronutrientes

Substância	Concentração
KH_2PO_4	1500 mg/l (Tampão)
K_2HPO_4	1500 mg/l
NH_4Cl	500 mg/l (Macronutriente)
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 mg/l
$2 \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2000 mg/l (Micronutriente)
ZnCl_2	50 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	30 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	500 mg/l (Macronutriente)
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50 mg/l
AlCl_3	50 mg/l
$\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2000 mg/l (Micronutriente)
HCl (concentrado)	1 ml /l

Fonte: Chernicharo (1997)

4.2.3 Inoculação e Incubação

Para o preparo do inóculo, as cepas foram transferidas para erlenmeyers de 250 mL, contendo 20 mL de Meio Mínimo líquido e 5% de hidrocarboneto. As amostras foram mantidas sob agitação a uma temperatura constante de 30 ° C durante cinco dias. Após o período de crescimento foram realizadas leituras por meio de valores de absorvância, utilizando espectrofotômetro, a 420 nm, para o ajuste da biomassa microbiana. As cepas utilizadas no experimento respirométrico foram selecionadas de acordo com o padrão de densidade óptica (D.O.) das amostras.

Foram diluídas pequenas frações das amostras enriquecidas em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina (0,75 %). A suspensão foi semeada em placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura e 5% (p/v) de hidrocarboneto. Após serem inoculadas, as placas foram embaladas em papel alumínio, identificadas e incubadas a uma temperatura ambiente até o visível crescimento bacteriano, por um período de 10 a 15 dias, evidenciado pela formação de colônias em crescimento na superfície do meio.

Após esta etapa, as cepas foram armazenadas em geladeira a 4°C, dentro de tubos inclinados específicos para conservação e retardamento do crescimento bacteriano até a sua utilização nos experimentos de biodegradabilidade.

4.2.4 Caracterização dos isolados

Após a obtenção de culturas puras, foi realizada uma caracterização preliminar das cepas isoladas, utilizando os critérios de Silva (1999), principalmente quanto à morfologia de colônia, coloração de gram e testes bioquímicos (indol, catalase e coagulase).

4.3 Avaliação da Biodegradabilidade Aeróbia

4.3.1 Preparo dos Sistemas de Avaliação

Para a avaliação da biodegradabilidade dos compostos orgânicos propostos, utilizaram-se potes de vidro com tampa de rosca, hermeticamente fechados, com capacidade de 1700ml cada. A vermiculita e a areia foram lavadas e autoclavadas antes de serem utilizadas. Utilizou-se um potinho de polietileno de 50 mL para armazenar a solução de NaOH. O sistema é formado por tratamentos, controles e brancos, todos em duplicata, conforme mostra as figuras 6 e 7.

Composição dos tratamentos:

- 100 g de solo (50% de vermiculita e 50% de areia - v/v);
- Meio Mínimo líquido (fonte de micro e macronutrientes, de acordo com 60% da capacidade de campo);
- 1 mL do inóculo bacteriano (previamente ajustado por densidade óptica - D.O.);

- 5% de hidrocarboneto (fonte de carbono);
- 20 mL de NaOH a 0,5 M

Composição dos controles:

- 100 g de solo (50% de vermiculita e 50% de areia - v/v);
- Meio Mínimo líquido (fonte de micro e macronutrientes, de acordo com 60% da capacidade de campo);
- 5% de hidrocarboneto (fonte de carbono);
- 20 mL de NaOH a 0,5 M

Composição dos brancos:

- 20 mL de NaOH a 0,5 M



Figura 7 – Experimento respirométrico aeróbio composto de vermiculita e areia, meio mínimo, inóculo bacteriano e hidrocarbonetos derivados do petróleo.



Figura 8 – Ensaio de biodegradabilidade através da respirometria de Bartha.

4.3.2 Avaliação da produção de CO₂

Para os ensaios de biodegradabilidade aeróbia, utilizou-se a metodologia de respirometria aeróbia de amostras com e sem inoculação de bactérias isoladas, avaliando-se a formação de CO₂, adaptado do método respirométrico de Bartha (1999) descrito pela NBR – 14.283 – Resíduos em solos – Determinação da Biodegradação pelo Método respirométrico. Nesta metodologia foi realizada utilizando-se um sistema fechado de frascos estáticos com análise da condutividade elétrica da solução de coleta do CO₂ produzido para as diversas combinações de substratos (amostras ambientais) e hidrocarbonetos sob avaliação.

No ensaio de biodegradabilidade observou-se o decaimento da condutividade à medida que se processa o experimento, ou seja, quanto maior a produção de CO₂, menor será a condutividade. Isso ocorre porque o CO₂ produzido pelas bactérias, ao realizarem o processo de degradação de um composto, entra em contato com a solução aquosa de NaOH (solução alcalina) do frasco coletor do respirômetro e forma, inicialmente, H₂CO₃ (ácido carbônico) que em seguida dá origem a duas séries de sais, os bicarbonatos, NaHCO₃ e carbonatos, Na₂CO₃ (Lee, 2000),

conforme as equações 6a e 6b. A condutividade foi determinada através do método descrito por Rodella e Saboya (1999).

As principais reações de avaliação no sistema de respirometria aeróbia são:



A calibração do sistema foi efetuada preparando-se soluções padrão de NaOH e Na₂CO₃ obtendo-se concentrações equivalentes em carga de ânions. Cada solução pode ser relacionada a uma hipotética quantidade de CO₂ que, se efetivamente absorvida, resulta nas mesmas concentrações de CO₃⁻². Para cada solução foi obtida uma curva padrão específica para condutividade. As leituras da condutividade elétrica foram efetuadas em condutivímetro da marca Jenco, modelo 1671, com correção de temperatura de leitura a 25 ° C. Os resultados foram obtidos por meio da equação 7, sendo expostos em forma de mg de CO₂ cumulativamente no período do experimento.

$$\text{mg de CO}_2 = M \times V \times 22 \cdot [(C_1 - C_x) / (C_1 - C_2)] \quad (7)$$

Onde,

M= molaridade da solução de NaOH utilizada (expressa em mol l⁻¹)

V= volume utilizado (ml) da solução padrão de NaOH no frasco de captura

C₁= concentração padrão de NaOH

C_x = valor da condutividade elétrica por amostra

C₂ = concentração da solução de Na₂CO₃

4.3.3 Condições experimentais

Foram isoladas 19 cepas a partir dos 10 hidrocarbonetos derivados do petróleo. O experimento consistiu na avaliação da biodegradabilidade aeróbia que foram divididos em 3 ensaios (Ensaio I, II e III). O ensaio I consistiu na avaliação das cepas isoladas a partir de óleos e frações como fator de seleção, conforme a tabela 6. Assim, foram obtidas 19 cepas com os respectivos hidrocarbonetos. Os ensaios foram realizados por meio da avaliação da respirometria aeróbia utilizando frascos estáticos e avaliação da condutividade de acordo com a metodologia proposta.

A cada frasco foi adicionado um tipo de hidrocarboneto juntamente com a respectiva cepa isolada anteriormente, originando assim 19 tratamentos com duas repetições mais controle, com um total de 40 unidades experimentais. Os controles consistiram de substrato, hidrocarboneto e Meio Mínimo, sem inoculação.

Tabela 6 – Composição dos tratamentos do ensaio I da respirometria.

Tratamentos	Composição
1	Cepa 1 + Óleo bruto 1
2	Cepa 2 + FD 6
3	Cepa 3 + FD 29
4	Cepa 4 + FD 31
5	Cepa 5 + FD 30
6	Cepa 6 + FD 23
7	Cepa 7 + FD 13
8	Cepa 8 + FD 17
9	Cepa 9 + FD 26
10	Cepa 10 + Óleo bruto 2
11	Cepa 11 + Óleo bruto 1
12	Cepa 12 + FD 6
13	Cepa 13 + FD 29
14	Cepa 14 + FD 31
15	Cepa 15 + FD 30
16	Cepa 16 + FD 23
17	Cepa 17 + FD 13
18	Cepa 18 + FD 17
19	Cepa 19 + FD 26

FD: Fração destilada

O ensaio II consistiu em avaliar quatro tipos de cepas (1, 2, 13 e 14), com quatro hidrocarbonetos (A, B, C e D, respectivamente óleo bruto 1, fração 6, fração 29 e fração 31). As cepas utilizadas neste ensaio foram escolhidas de acordo com a produção de CO₂ acumulado do ensaio I. A partir daí, as quatro cepas foram adicionadas, individualmente aos quatro hidrocarbonetos, formando assim 16 tratamentos diferentes: 1A, 1B, 1C e 1D; 2A, 2B, 2C e 2D; 13A, 13B, 13C e 13D; 14A, 14B, 14C e 14D, conforme tabela 7. O experimento foi realizado em duplicata, contendo assim, um total de 40 unidades experimentais. As leituras do ensaio II foram realizadas através do condutivímetro durante 29 dias para obtenção da curva de biodegradação. Nos primeiros 9 dias as leituras foram realizadas diariamente, após este período as leituras passaram a ser feitas a cada dois dias até o final de 29 dias. A composição dos tratamentos do ensaio II está descrito na tabela 7.

Tabela 7 – Composição dos tratamentos da segunda etapa da respirometria

Tratamentos	Composição
1A	Cepa 1 + óleo bruto 1
1B	Cepa 1 + fração 6
1C	Cepa 1 + fração 29
1D	Cepa 1 + fração 31
2A	Cepa 2 + óleo bruto 1
2B	Cepa 2 + fração 6
2C	Cepa 2 + fração 29
2D	Cepa 2 + fração 31
13A	Cepa 13 + óleo bruto 1
13B	Cepa 13 + fração 6
13C	Cepa 13 + fração 29
13D	Cepa 13 + fração 31
14A	Cepa 14 + óleo bruto 1
14B	Cepa 14 + fração 6
14C	Cepa 14 + fração 29
14D	Cepa 14 + fração 31

O ensaio III consistiu em avaliar duas cepas (1 e 14) com quatro hidrocarbonetos (A, B, C e D, respectivamente óleo bruto 1, fração 6, fração 29 e fração 31) em dois tipos de solos diferentes (X e Y, sendo arenoso e argiloso, respectivamente). Este

ensaio contou com um solo arenoso, tendo como composição 70% de areia e 30% de argila e o solo argiloso contendo 30% de areia e 70% de argila.

Neste ensaio obtiveram-se então 16 tratamentos: 1AX, 1BX, 1CX e 1DX; 14AX, 14BX, 14CX e 14DX (arenosos) e 1AY, 1BY, 1CY e 1DY; 14AY, 14BY, 14CY e 14DY (argilosos), conforme tabela 8. O experimento foi realizado em duplicata. As leituras do ensaio III foram realizadas através do condutivímetro durante 31 dias para obtenção da curva de biodegradação. Nos primeiros 5 dias as leituras foram realizadas diariamente, após este período as leituras passaram a ser feitas a cada dois dias até o dia 13 e depois a cada 3 dias até o final de 31 dias. A composição dos tratamentos do ensaio III está descrita na tabela 8.

Tabela 8 – Composição dos tratamentos da terceira etapa da respirometria.

Tratamentos	Composição
1AX	Cepa 1 + óleo bruto 1
1BX	Cepa 1 + fração 6
1CX	Cepa 1 + fração 29
1DX	Cepa 1 + fração 31
14AX	Cepa 14 + óleo bruto 1
14BX	Cepa 14 + fração 6
14CX	Cepa14 + fração 29
14DX	Cepa 14+ fração 31
1AY	Cepa 1 + óleo bruto 1
1BY	Cepa1 + fração 6
1CY	Cepa 1 + fração 29
1DY	Cepa 1 + fração 31
14AY	Cepa 14 + óleo bruto 1
14BY	Cepa 14 + fração 6
14CY	Cepa 14 + fração 29
14DY	Cepa 14 + fração 31

X= solos arenosos

Y =solos argilosos

4.3.4 Condições experimentais

A metodologia empregada para a avaliação das taxas de biodegradação dos hidrocarbonetos foi realizada de acordo com a cinética de primeira ordem descrita por Firme (2005). A escolha dessa ordem de reação foi realizada através da avaliação dos dados e empregando a metodologia do “best fitting”.

O experimento respirométrico foi desenvolvido em três ensaios e o programa computacional utilizado nos estudos estatísticos deste trabalho foi realizado através de um pacote estatístico. O desenho experimental de cada ensaio foi inteiramente casualizado, utilizando cepas e hidrocarbonetos como tratamentos, com duas repetições em cada ensaio.

Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) calculando a estatística F, a um nível de significância de 5%, nos resultados obtidos durante o estudo da biodegradabilidade dos hidrocarbonetos através do teste respirométrico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação das cepas isoladas – Ensaio I

5.1.1 Caracterização Morfológica e Bioquímica

Na avaliação das 19 cepas isoladas dos solos de mangue e horta, foram realizadas técnicas de caracterização morfológica de acordo com Neder (1992), conforme ilustrado nas tabelas 9 e 10 e nas figuras de 9 a 12 .

Tabela 9 – Caracterização morfológica das colônias isoladas dos solos de mangue e horta, utilizadas no experimento respirométrico.

Cepas	Tamanho	Forma	Elevação	Bordos	Estrutura	Brilho	Cor	Aspecto
1	pequena	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
2	pequena	circular	convexa	lisos	lisa	translúcidos	incolor	viscosa
3	pequena	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
4	pequena	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
5	média	irregular	achatada	lobados	granulosa	opaca	incolor	viscosa
6	média	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
7	pequena	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
8	pequena	irregular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
9	grande	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
10	média	irregular	achatada	ondulados	granulosa	opaca	incolor	membranosa
11	pequena	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
12	média	irregular	achatada	ondulados	lisa	translúcida	incolor	viscosa
13	pequena	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
14	pequena	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
15	média	irregular	achatada	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
16	média	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
17	pequena	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
18	média	irregular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa
19	média	circular	convexa	lisos	lisa	translúcida	incolor	viscosa

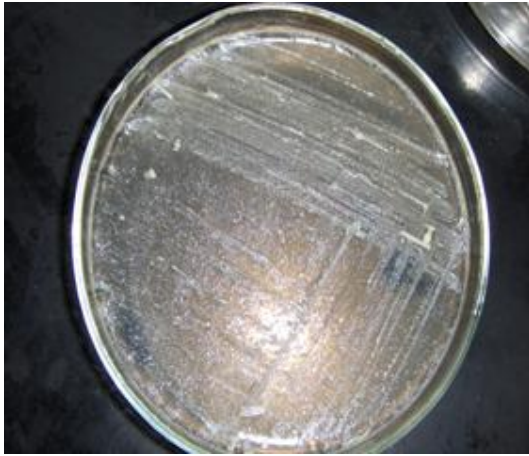


Figura 9 – Visualização em placa da cepa 13.



Figura 10 – Visualização em placa da cepa 5.

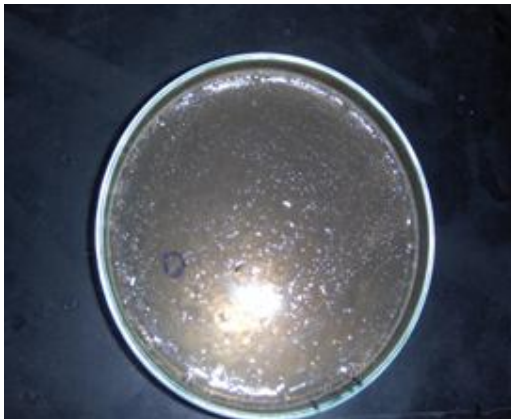


Figura 11 – Visualização em placa da cepa 4



Figura 12 – Visualização em placa da cepa 16.

Na caracterização morfológica das colônias realizada nas 19 cepas isoladas, observou-se que o tamanho varia de pequena a média, somente a cepa 9 apresentou tamanho grande. A forma das cepas é irregular ou circular. Quanto à elevação, a maioria é convexa, mas algumas são achatadas. A maioria das cepas apresentam bordos lisos, com exceção das cepas 10 e 12 que são onduladas e a 5 que é lobada. A estrutura é lisa na maioria das cepas, somente as cepas 5 e 10 apresentam estrutura granulosa. Quanto ao brilho somente as cepas 5 e 10 são opacas, as demais são translúcidas. Todas as cepas são incolores e quanto ao aspecto, somente a 10 é membranosa, as demais cepas são viscosas.

Tabela 10 – Caracterização bioquímica das bactérias

Cepas	Teste de Gram	Forma	Teste de Indol	Teste da Catalase	Teste da Coagulase
1	-	COCOS	+	+	-
2	-	COCOS	+	+	-
3	-	COCOS	+	+	+
4	-	COCOS	+	+	+
5	-	COCOS	+	+	+
6	-	COCOS	+	+	+
7	-	COCOS	+	+	-
8	-	COCOS	+	+	-
9	+	COCOS	+	+	-
10	-	COCOS	+	+	+
11	-	COCOS	+	+	+
12	-	COCOS	+	+	+
13	-	COCOS	+	+	+
14	-	COCOS	+	-	+
15	-	COCOS	+	+	+
16	-	COCOS	+	+	-
17	-	COCOS	+	+	-
18	-	bacilo	+	+	-
19	-	cocos	+	+	+

Os testes bioquímicos foram realizados de acordo com Silva (1999). No teste de gram, as bactérias que fixam o composto iodo-pararosanilina são denominadas gram-positivas, e as bactérias que não fixam o composto e deixam-se descolorir pela solução descolorante recebem o nome de gram-negativas.

Para a caracterização morfológica das bactérias, observou-se que a maioria das cepas são gram-negativas e somente a cepa 9 é positiva. Quanto à forma, observou-se que somente a cepa 18 tem a forma de bacilo, enquanto as demais são cocos.

Para os testes bioquímicos realizados, todas as cepas tiveram teste de indol positivo. Para o teste de catalase, somente a cepa 14 foi negativa, as demais cepas são positivas. Para o teste de coagulase as cepas 1, 2, 7, 8, 9, 16, 17 e 18 são negativas, as demais cepas são positivas para o teste.

De acordo com os testes morfológicos e bioquímicos realizados, observa-se que há uma baixa biodiversidade das cepas isoladas, tendo em vista que os testes utilizados são insuficientes para a identificação dos isolados.

5.1.2 Atividade de respirometria

Para a avaliação das cepas isoladas e caracterizadas previamente (tabela 6) foi utilizado o sistema de respirometria, segundo Bartha (1999), utilizando vermiculita e areia. Os resultados estão ilustrados nas figuras 13, 14, 15 e 16.

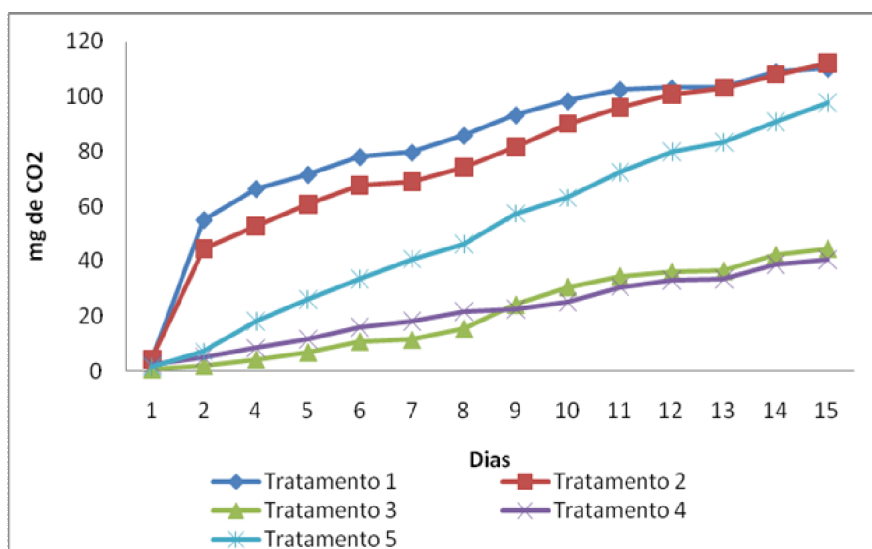


Figura 13 – Produção acumulada de CO₂ de óleos brutos e frações de petróleo, tendo como substrato areia e vermiculita, por um período de 15 dias.

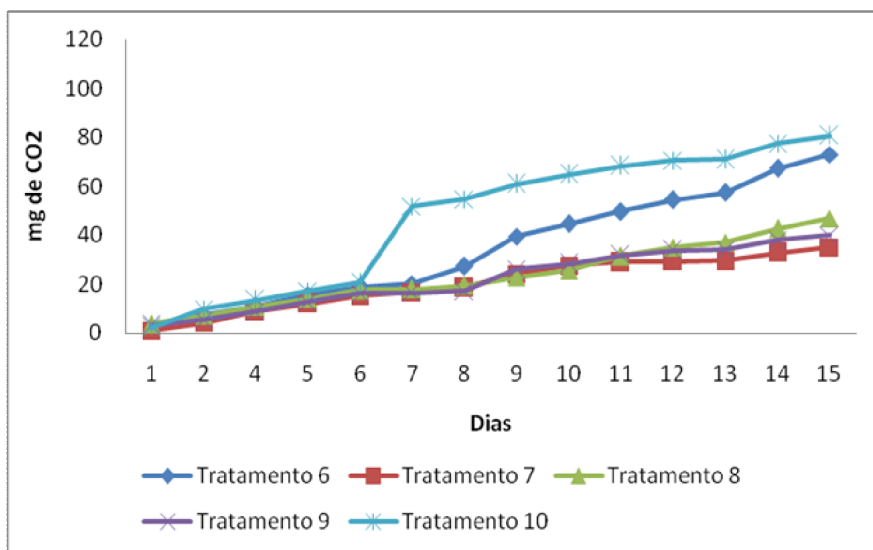


Figura 14 – Produção acumulada de CO₂ de óleos brutos e frações de petróleo, tendo como substrato areia e vermiculita, por um período de 15 dias.

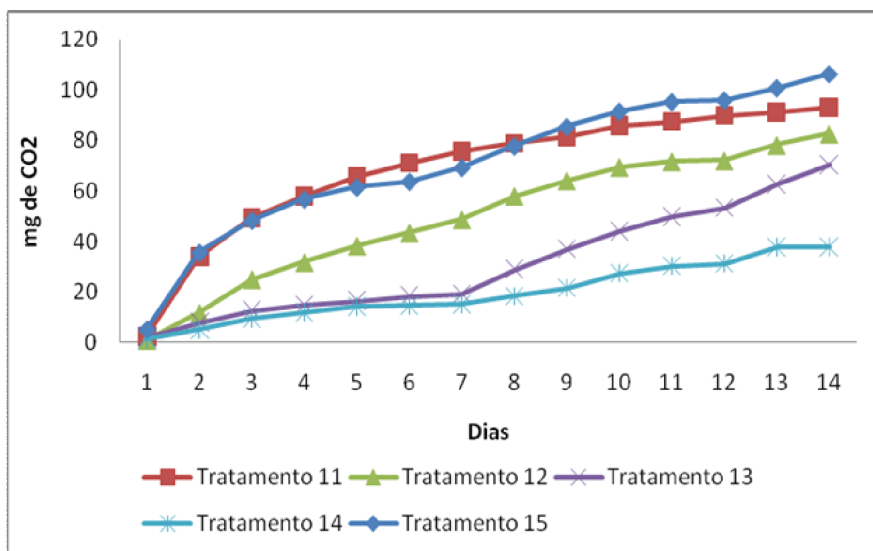


Figura 15 – Produção acumulada de CO₂ de óleos brutos e frações de petróleo, tendo como substrato areia e vermiculita, por um período de 15 dias.

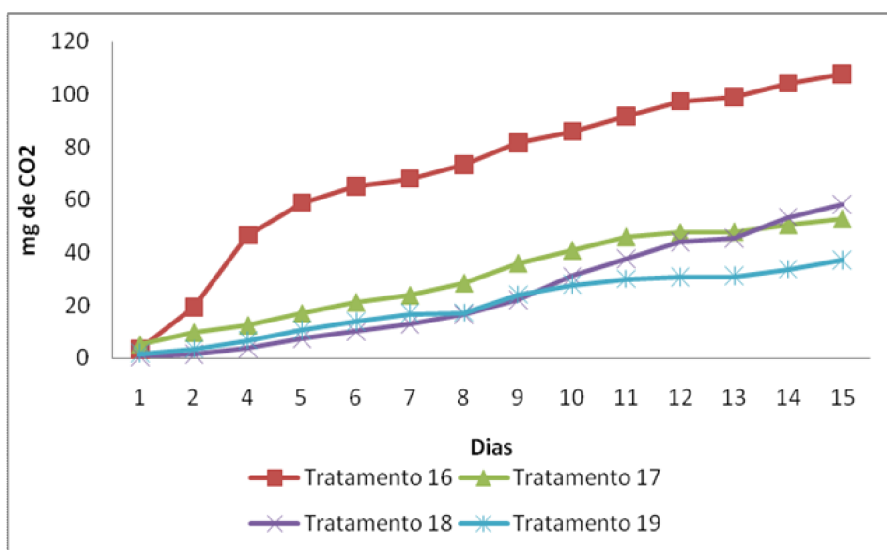


Figura 16 – Produção acumulada de CO₂ de óleos brutos e frações de petróleo, tendo como substrato areia e vermiculita, por um período de 15 dias.

A partir da análise das figuras 13, 14, 15 e 16 observa-se o comportamento das 19 cepas isoladas dos óleos brutos e das frações de hidrocarbonetos derivados de petróleo, por um período de 15 dias. Os isolados apresentam uma fase de adaptação nos primeiros dias do experimento (fase lag), seguida de um aumento exponencial (fase log) que ocorre a partir do quinto dia.

Com base nos resultados obtidos, pode-se observar que, durante o período avaliado de 15 dias, as cepas mostraram diferentes potenciais de biodegradação, avaliadas em termos de produção de CO₂. As maiores produções de CO₂ foram observadas para as cepas 2, 5, 15, 12, 16, 1, 10 e 11, variando de 80,71 a 112,21mg de CO₂, após 15 dias. Estas cepas correspondem aos isolados de solo de horta e mangue, apresentando distintas propriedades conforme a tabela de caracterização (tabelas 9 e 10).

De acordo com Teles (2006), os ensaios de biodegradabilidade de lodo de esgoto, apresentaram uma variação na produção de CO₂ de 170 a 680 mg de CO₂, em 47 dias de incubação, em função das dosagens utilizadas.

De acordo com Firme (2005), os valores acumulados de CO₂ produzidos pelos microorganismos na degradação da torta de filtro, chega a aproximadamente 1221,8 mg de CO₂, em 72 dias de ensaio utilizando 40 Mg ha⁻¹ de torta de filtro. Ao utilizar a mesma dosagem de torta de filtro e acrescentar 62,5 mg Kg⁻¹ de níquel, a quantidade de CO₂ diminui, resultando também em diminuição da biodegradação.

Utilizou-se a cinética de primeira ordem para avaliar os dados obtidos na respirometria. Os valores da constante de biodegradação (k) dos tratamentos do Ensaio I e seus respectivos ajustes de reta (R²) estão ilustrados na tabela 11 em ordem decrescente de biodegradabilidade dos compostos.

Tabela 11 – Valores da constante de biodegradação (k) e respectivo ajuste da reta (R²) para os tratamentos do Ensaio I

Tratamentos	k (dia ⁻¹)	R ²
18	0,3275	0,8875
3	0,2731	0,8881
5	0,2317	0,7983
12	0,2250	0,6124
10	0,2141	0,7978
6	0,2119	0,9021
13	0,2078	0,8950
19	0,1991	0,8621
7	0,1956	0,7619
14	0,1878	0,8325
4	0,1795	0,8846
16	0,1672	0,6218
9	0,1653	0,9106
8	0,1554	0,9380
17	0,1542	0,9132
11	0,1512	0,4802
2	0,1398	0,5533
15	0,1391	0,6087
1	0,1301	0,4508

De acordo com os valores da taxa de biodegradação (k) observados, verifica-se que os hidrocarbonetos apresentaram uma grande variedade de respostas. A análise da taxa de biodegradação no ensaio I foi realizada levando-se em consideração do primeiro ao último dia de experimento, em uma única fase. O tratamento 18 foi o que apresentou a maior taxa de velocidade de biodegradação, com $k= 0,3275$. Já o tratamento 1 apresentou a menor taxa de velocidade de biodegradação, com $k=0,1301$. Desta forma, pode-se afirmar, baseando-se na figura 17, que o tratamento 18 tem potencial de biodegradação de 32% da concentração inicial do hidrocarboneto presente neste tratamento enquanto que o tratamento 1 tem capacidade de biodegradação de 13% da concentração inicial do hidrocarboneto presente neste tratamento.

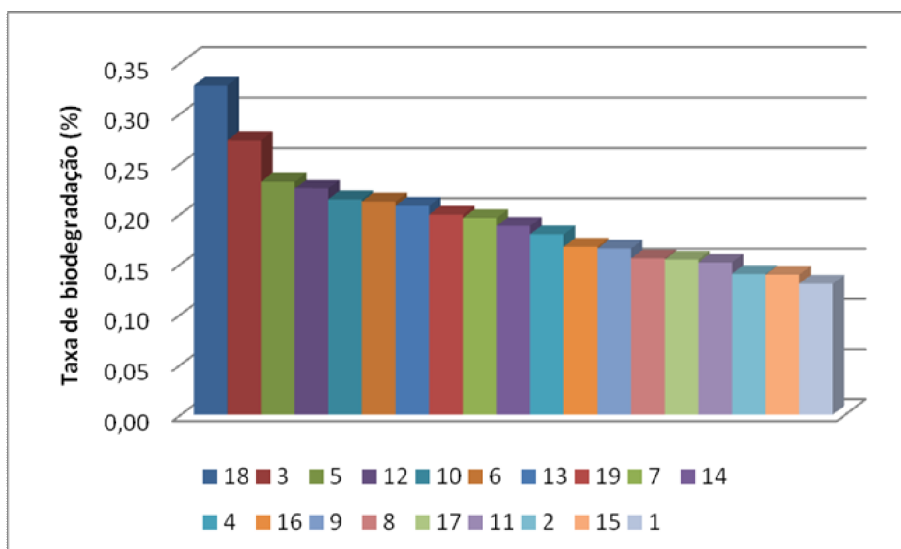


Figura 17 – Taxa de biodegradação (k) dos tratamentos do ensaio I, por um período de 15 dias.

O tratamento 18, em solo contendo areia e vermiculita como substrato, apresentou uma taxa de biodegradação de 32%, em 15 dias. De acordo com a literatura, Andrade (2006), obteve o valor médio das taxas de degradação de biossólidos aplicados ao solo, após 70 dias de incubação de 21,63%. Isso pode ser explicado

pela presença predominante de compostos orgânicos recalcitrantes, isto é, de difícil degradação biológica no solo.

Cansfield *et al.*, (1978), trabalharam com resíduos de hidrocarbonetos provenientes de tanques de armazenamento de óleo cru incorporados ao solo. O conteúdo de óleo no solo após a contaminação era de 1,45 %. Foram analisadas as frações saturadas, monoaromáticas, diaromáticas, poliaromáticas e compostos polares e material de alto peso molecular, tais como asfaltenos. No final do experimento, a degradação dessas frações era respectivamente: 54,6 %, 50,0 %, 57,1 %, 44,4 % e 11,1 %, mostrando que a degradação de frações mais pesadas se processam de forma mais lenta.

Segundo Firme (2005), os compostos orgânicos possuem diferentes velocidades de degradação em função da sua constituição variável. Por este motivo, o cálculo da taxa de biodegradação (k) também foi realizado em duas etapas, neste experimento, sendo a primeira k_1 , representando a fase rápida da biodegradabilidade dos compostos orgânicos e a segunda, k_2 , representando a fase lenta da biodegradação.

A tabela 12 apresenta os valores da velocidade de degradação (k) dos tratamentos, e seus respectivos ajustes de reta (R^2), do ensaio I do experimento em duas fases, que são a fase rápida (k_1) e a fase lenta (k_2), levando em consideração que a degradação dos hidrocarbonetos é realizada pelas cepas com diferentes velocidades, dependendo de cada composto orgânico. A fase rápida foi calculada até o 5^o dia de experimento e a outra fase considerou os demais dias até o final do experimento da primeira etapa.

Tabela 12 – Valores da constante de biodegradação (k) e respectivo ajuste da reta (R^2) para os tratamentos do ensaio I, destacando a fase rápida (k_1) e fase lenta (k_2).

Tratamentos	k_1 (dia ⁻¹)	$R^2(1)$	k_2 (dia ⁻¹)	$R^2(2)$
12	0,8544	0,7622	0,0835	0,9299
18	0,7127	0,9532	0,2025	0,9538
11	0,6849	0,6783	0,0368	0,9461
16	0,6664	0,8589	0,0583	0,9739
5	0,6475	0,9118	0,1171	0,9641
1	0,6001	0,6116	0,0400	0,9245
7	0,5791	0,8823	0,0914	0,9069
3	0,5508	0,9490	0,1664	0,8909
2	0,5493	0,6318	0,0608	0,9687
15	0,5208	0,6992	0,0633	0,9555
14	0,5091	0,8698	0,1264	0,9667
13	0,4521	0,8047	0,1731	0,9653
19	0,4436	0,9827	0,0972	0,8752
10	0,4386	0,7741	0,1020	0,6160
4	0,3758	0,9457	0,1043	0,9791
9	0,3210	0,9758	0,1094	0,9118
17	0,2612	0,9005	0,1025	0,8980

É interessante ressaltar que essas duas fases, por vezes identificadas como 1 e 2 não são simultâneas. Contudo, como uma delas é muito mais rápida que a outra, uma etapa mais lenta que a outra domina a maior parte da degradação da matéria orgânica do material orgânico em estudo. (Firme, 2005).

A partir da análise do modelo duplo de cinética de biodegradação (fases rápida e lenta) pode-se observar que os tratamentos apresentam comportamentos diferentes na degradação dos hidrocarbonetos, conforme demonstrado na tabela 12.

O tratamento 12 apresenta a melhor taxa de velocidade de biodegradação, com $k_1=0,8544$ e $k_2=0,08535$, quando analisado em duas fases, isso se deve ao diferente comportamento que os compostos orgânicos apresentam.

O tratamento 18, em fase única, apresenta uma taxa de biodegradação de 32%, mas quando comparado com o modelo de fase dupla, 71% da biodegradação é alcançada na fase rápida (k_1) e apenas 2% é biodegradada na fase lenta (k_2).

Segundo Firme (2005), os valores das taxas de biodegradação da fase rápida (k_1) da torta de filtro variam de 0,1649 a 0,7829. A taxa de degradação (k) depende das dosagens de matéria orgânica e se a mesma está ou não na presença do metal (níquel).

De acordo com Tauk (1990), no solo ocorre uma rápida decomposição inicial da matéria lábil e, posteriormente, num processo mais lento, a decomposição de materiais resistentes. Esta fase lenta pode ocorrer devido ao mecanismo de adsorção, à estabilização dos metabólitos e à queda da taxa de biomassa no solo.

Os valores da cinética da biodegradação (k) e o tempo (t) só são inversamente proporcionais se o valor de k for calculado em uma única fase ou se for considerado o valor da taxa de biodegradação na fase lenta (k_2).

5.2 Avaliação das cepas isoladas – Ensaio II

No ensaio II, foi avaliada a especificidade de 4 cepas isoladas (1,2,13 e 14) com 4 hidrocarbonetos (A, B, C e D que são, respectivamente, óleo bruto 1, fração 6, fração 29 e fração 31). As cepas e os hidrocarbonetos foram selecionados a partir de uma análise quantitativa de CO_2 no ensaio I. Nesta etapa utilizou-se como substrato areia e vermiculita, sendo 50% de cada (v/v). As leituras foram realizadas por meio do condutivímetro por um período de 29 dias. Os tratamentos estão descritos na tabela 7.

Os gráficos da figura 18, 19, 21 e 21 apresentam os valores de CO_2 , em mg, emanados dos isolados no experimento respirométrico do ensaio II.

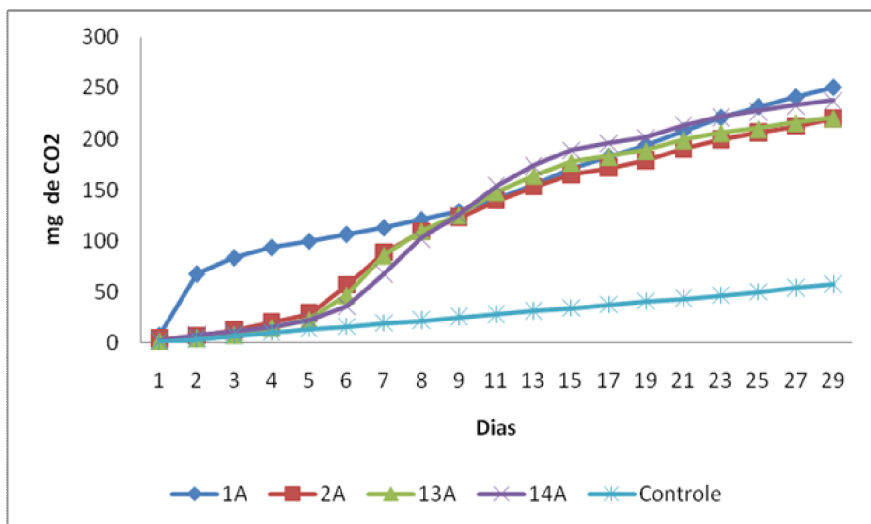


Figura 18 – Os resultados referentes à acumulação de CO₂ nos diferentes tratamentos, envolvendo as cepas 1, 2, 3 e 4 com o hidrocarboneto A (óleo bruto 1).

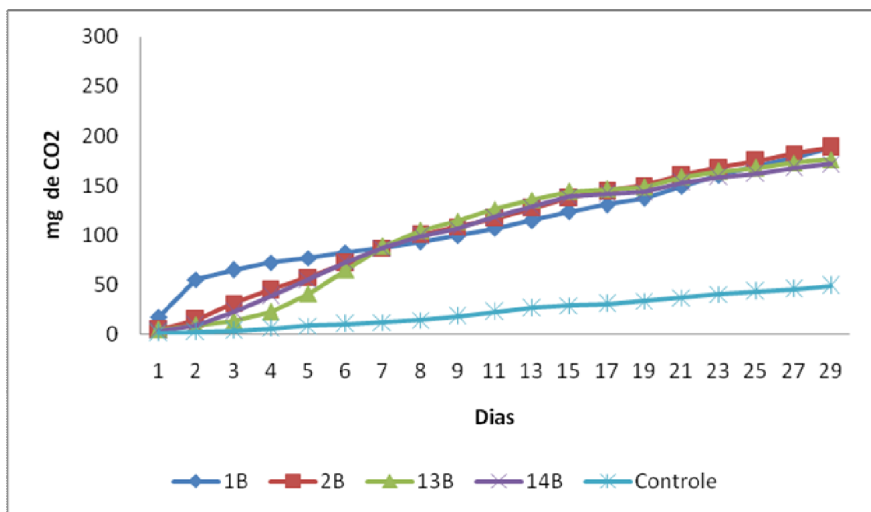


Figura 19 – Os resultados referentes à acumulação de CO₂ nos diferentes tratamentos, envolvendo as cepas 1, 2, 3 e 4 com o hidrocarboneto B (fração 6).

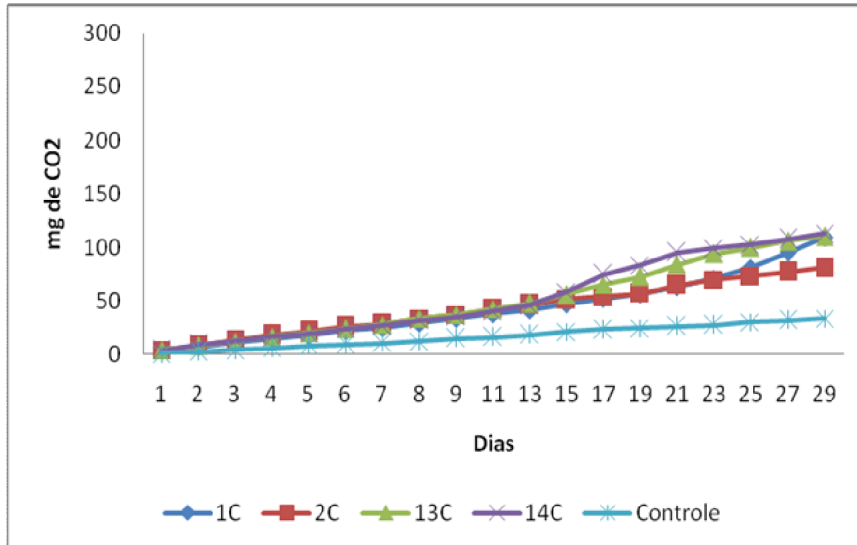


Figura 20 – Os resultados referentes à acumulação de CO₂ nos diferentes tratamentos, envolvendo as cepas 1, 2, 3 e 4 com o hidrocarboneto C (fração 29).

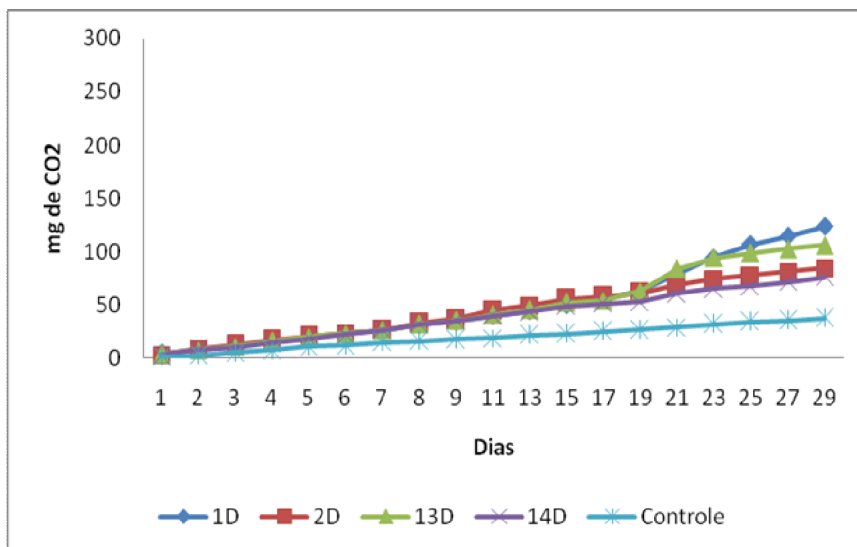


Figura 21 – Os resultados referentes à acumulação de CO₂ nos diferentes tratamentos, envolvendo as cepas 1, 2, 3 e 4 com o hidrocarboneto D (fração 31).

De acordo com os gráficos 18, 19, 20 e 21, utilizando a produção do CO₂ como indicador do processo de biodegradabilidade que ocorreu no sistema

solo/hidrocarboneto nos respirômetros de Bartha, verificou-se que a adição do hidrocarboneto no solo proporcionou aumento na produção de CO₂.

Segundo Morais (2005), a adição do inóculo mais o fertilizante proporcionaram acréscimo de 1,8% e 5,3% respectivamente, na evolução de CO₂, comparado com o controle solo/resíduo no tratamento do resíduo oleoso através do sistema de biopilhas.

A partir dos gráficos representados pelas figuras 18, 19, 20 e 21, pode-se observar que os hidrocarbonetos A e B (óleo bruto 1 e fração 6) foram mais facilmente biodegradados em relação a C e D (fração 29 e 31), de acordo com a produção de CO₂.

O hidrocarboneto A é classificado como leve, de acordo com o grau API (American Petroleum Institute), assim, é mais facilmente biodegradado em relação aos hidrocarbonetos B, C e D que são classificados como médios.

Entre os valores apresentados graficamente pelas figuras 18, 19, 20 e 21, a cepa 1 foi a única que não apresentou fase de aclimação como as demais cepas (2, 13 e 14) para a biodegradação dos hidrocarbonetos, mostrando uma alta especificidade em relação às demais cepas estudadas. Observa-se que as cepas tiveram um período de cerca de cinco dias de adaptação para posteriormente entrarem na fase log.

A cepa 1, isolada do hidrocarboneto A, apresentou o maior índice de biodegradabilidade com os 4 tipos de hidrocarbonetos em relação as cepas 2, 13 e 14. Observa-se que a cepa 1 produziu 250,41 mg de CO₂ quando associada ao hidrocarboneto A (óleo bruto1) e a menor produção, 109,45 mg de CO₂, quando associada ao hidrocarboneto C (fração 29). Isso demonstra que o hidrocarboneto A é mais facilmente biodegradado pela cepa em relação ao hidrocarboneto C.

A biodegradação dos hidrocarbonetos segue a seguinte ordem: cepa 1 (A>B>D>C); cepa 2 (A>B>D>C); cepa 13 (A>B>C>D) e cepa 14 (A>B>C>D). As cepas 1 e 2 têm uma maior capacidade de biodegradação do hidrocarboneto D (fração 29) em relação as cepas 13 e 14. O hidrocarboneto A é proveniente de um óleo leve, já os demais hidrocarbonetos (B, C e D) são frações provenientes de dois óleos pesados do mesmo reservatório.

Utilizou-se a cinética de primeira ordem para avaliar os dados obtidos na respirometria. Os valores da constante de biodegradação (k) dos tratamentos do ensaio II e seus respectivos ajustes de reta (R^2) estão ilustrados na tabela 13 e os valores de k_1 e k_2 e seus respectivos ajustes são demonstrados na tabela 14 em ordem decrescente de biodegradabilidade dos compostos.

Tabela 13 – Valores da constante de biodegradação (k) e respectivo ajuste da reta (R^2) para os tratamentos do ensaio II

Tratamentos	K (dia ⁻¹)	R ²
14A	0,1313	0,6748
13A	0,1276	0,6451
2A	0,1146	0,6563
14C	0,0992	0,8436
13B	0,0971	0,6156
13D	0,0962	0,8382
1D	0,0960	0,8910
13C	0,0951	0,8447
1C	0,0912	0,8606
14B	0,0896	0,5646
2D	0,0848	0,7602
14D	0,0835	0,7446
2B	0,0833	0,6104
2C	0,0785	0,7576
1A	0,0636	0,5396
1B	0,0515	0,7124

A cinética da biodegradação nos permite afirmar através dos dados demonstrados na tabela 13 que o tratamento 14A foi o que apresentou a maior taxa de

degradação, com $k=0,1313$ e o tratamento 1B com a menor taxa de degradação, com $k=0,0515$.

De acordo com a figura 19, pode-se afirmar que o tratamento 14A apresentou um potencial de biodegradação de 13% da concentração inicial do hidrocarboneto presente neste tratamento, da mesma forma que o tratamento 1B foi somente 5% biodegradado em 29 dias de experimento.

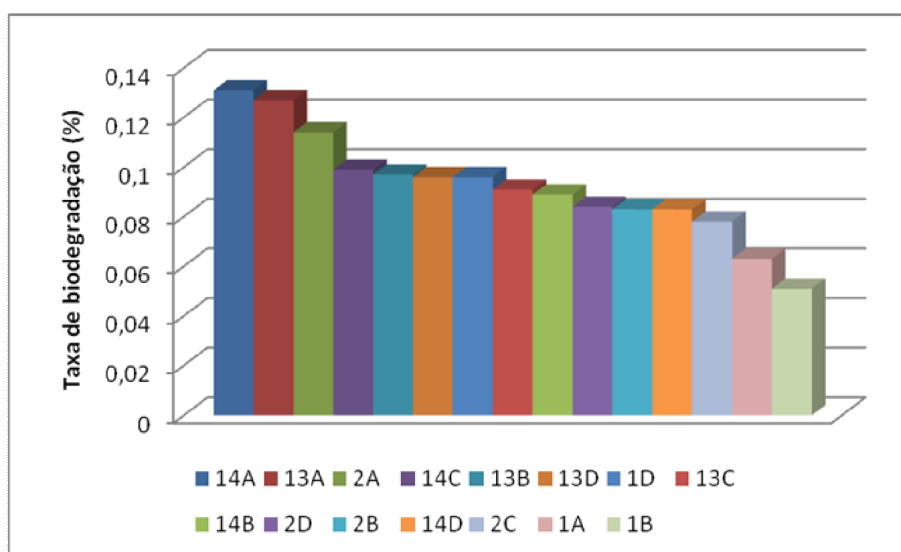


Figura 22 – Taxa de biodegradação (k) dos tratamentos do ensaio II por um período de 29 dias.

Considerando a velocidade da taxa de degradação (k) dos tratamentos obteve-se a seguinte ordem: cepa 1 (D>C>A>B), cepa 2 (A>D>B>C), cepa 13 (A>B>D>C) e cepa 14 (A>C>B>D).

Quanto menor o período de avaliação, apenas uma fração mais facilmente decomponível será degradada e não serão atingidos grupos mais recalcitrantes, o que levará o maior valor da constante de velocidade.

Nocentini *et al.*(2000) contaminaram solos com diferentes petroderivados, entre eles o querosene, e relataram que o microcosmo presente no solo degrada quase que totalmente o querosene em 100 dias de experimento.

Tabela 14 – Valores da constante de biodegradação (k) e respectivo ajuste (R^2) para os tratamentos do ensaio II, destacando a fase rápida (k_1) e fase lenta (k_2).

Tratamentos	k_1 (dia ⁻¹)	$R^2(1)$	k_2 (dia ⁻¹)	$R^2(2)$
13A	0,5745	0,9961	0,0291	0,8638
14B	0,5240	0,9158	0,0243	0,9260
2A	0,5208	0,9961	0,0302	0,9283
14A	0,5163	0,9464	0,0337	0,8224
13B	0,4945	0,9919	0,0227	0,9244
2B	0,4423	0,8799	0,0289	0,9722
14D	0,3283	0,8888	0,0396	0,9735
1A	0,3273	0,5435	0,0347	0,9770
13D	0,3191	0,9164	0,0608	0,9716
2D	0,3139	0,8511	0,0427	0,9502
2C	0,3106	0,8997	0,0404	0,9780
14C	0,3053	0,8646	0,0638	0,9356
13C	0,3034	0,9212	0,0590	0,9782
1C	0,2853	0,9513	0,0584	0,9932
1D	0,2757	0,9348	0,0678	0,9909
1B	0,2053	0,6412	0,0329	0,9947

O cálculo da taxa de biodegradação (k) do ensaio II foi realizado em duas fases, segundo o modelo de cinética duplo descrito por Firme (2005), considerando a biodegradação em duas fases (rápida e lenta). A fase rápida (k_1) de biodegradabilidade dos compostos orgânicos foi calculada até o sétimo dia de experimento e a fase lenta (k_2) foi calculada a partir do oitavo dia até o final do experimento do ensaio II.

Observa-se na tabela 14 que o tratamento 13A é o que apresenta a maior taxa de degradação, com $k_1= 0,5745$ e $k_2= 0,0291$, em relação aos demais tratamentos, sendo assim, pode-se afirmar que o tratamento 13A apresentou 57% de degradação do hidrocarboneto presente, em 7 dias (fase rápida) e 2% até o dia 29 (fase lenta). A primeira fase se caracteriza por ser curta e muito biodegradável, já que são degradados os compostos mais biodegradáveis, restando para a outra fase os recalcitrantes.

O tratamento 14A, em fase única, apresenta uma taxa de biodegradação de 13%, mas quando comparado com o modelo de fase dupla, 51% da biodegradação é alcançada na fase rápida (k_1) e apenas 3% é biodegradada na fase lenta (k_2).

Os valores da cinética da biodegradação (k) e o tempo (t) só são inversamente proporcionais se o valor de k for calculado em uma única fase ou se for considerado o valor da taxa de biodegradação na fase lenta (k_2).

Ghaemghami *et al.* (1998) trabalharam com solos contaminados com solventes e notaram que as taxas de mineralização são mais elevadas nas primeiras semanas de incubação, sugerindo a existência de uma comunidade adaptada à biodegradação e também a existência de compostos mais facilmente degradados.

Segundo Moraes (2005), nos primeiros 45 dias de sua análise, foram produzidos mais de 50% do total de CO_2 acumulado em todos os respirômetros. Nesse período, provavelmente, os microrganismos consumiram mais rapidamente aqueles compostos que são facilmente biodegradáveis, restando, portanto, os que são mais resistentes à degradação (recalcitrantes), que foram consumidos posteriormente de forma mais lenta.

Os dados estatísticos do ensaio II foram realizados em duas etapas, sendo que a primeira etapa (fase rápida) foi realizada do primeiro ao sétimo dia. A segunda etapa (fase lenta) foi realizada do oitavo ao vigésimo nono dia de experimento. Realizou-se também a análise dos dados em uma única etapa, do primeiro ao vigésimo nono dia de experimento. Os resultados estão dispostos em mg de CO_2 e estão apresentados nas tabelas de 15 a 17.

Tabela 15 – Médias de CO₂ acumulado (mg) das cepas e dos hidrocarbonetos A, B, C e D do primeiro ao sétimo dia de ensaio.

Hidrocarbonetos					
Cepas	A	B	C	D	\bar{x}
1	81,54	65,20	14,52	15,83	44,27
2	31,05	44,59	17,28	16,08	27,25
13	16,23	35,05	16,23	15,50	20,75
14	23,18	41,35	15,89	14,72	23,78
\bar{x}	38,00	46,55	15,98	15,53	

\bar{x} = média

Através da tabela 15, que demonstra a fase rápida, observa-se que a cepa 1 relacionada aos hidrocarbonetos A, B, C e D apresenta, em média, a maior produção de CO₂ (44,27 mg) em relação as demais cepas estudadas, portanto é a cepa com maior potencial de biodegradação. Já a cepa 13 quando relacionada aos hidrocarbonetos A, B, C e D apresenta, em média, a menor produção de CO₂ (20,75 mg).

Os tratamentos compostos pelo hidrocarboneto B apresentaram, em média, a maior produção de CO₂ (46,55 mg) emanado nesta etapa do experimento, sendo, portanto, considerado o composto orgânico mais facilmente biodegradável em relação aos demais hidrocarbonetos.

Observa-se que a cepa 1 associada ao hidrocarboneto A apresenta uma produção de 81,54 mg de CO₂, ao passo que quando utiliza-se o mesmo hidrocarboneto com a cepa 13 a produção é de 16,23 mg de CO₂. Já a cepa 2 quando associada ao hidrocarboneto B apresenta uma produção de 65,20 mg de CO₂, enquanto a cepa 13 associada ao mesmo hidrocarboneto apresenta uma produção de 35,05 mg de CO₂. A cepa 2 associada ao hidrocarboneto C apresenta 17,28 mg de CO₂, enquanto que a cepa 1 associada ao hidrocarboneto C apresenta uma produção de 14, 52 mg de CO₂. A cepa 2 quando associada ao hidrocarboneto D produz 16,08 mg de CO₂ enquanto que a cepa 14 associada ao mesmo hidrocarboneto produz apenas 14,72 mg de CO₂. Dessa forma, afirma-se que a avaliação da biodegradabilidade ocorre de

acordo com o tipo de cepa que é utilizada nos experimentos e a composição dos compostos orgânicos.

Levando em consideração os tratamentos da fase rápida, a maior produção de CO₂ (81,54 mg), foi observada pela cepa 1 quando associada ao hidrocarboneto A e a menor produção de CO₂ (14,52 mg), foi observada pela cepa 1 quando associada ao hidrocarboneto C. dessa forma, afirma-se que o hidrocarboneto A é mais biodegradável em relação aos demais hidrocarbonetos.

Tabela 16 – Médias de CO₂ acumulado (mg) das cepas e dos hidrocarbonetos A, B, C e D, do oitavo ao vigésimo nono dia de ensaio.

Hidrocarbonetos					
Cepas	A	B	C	D	\bar{x}
1	183,03	137,60	59,91	69,90	112,61
2	172,45	146,55	57,41	60,53	109,24
13	178,94	146,66	70,94	67,37	115,98
14	189,38	141,01	74,08	53,86	114,58
\bar{x}	180,95	142,96	65,59	62,92	

\bar{x} = média

A tabela 16 mostra os dados da fase lenta do experimento, do oitavo ao vigésimo nono dia. Observa-se que, a cepa 13 relacionada aos hidrocarbonetos A, B, C e D apresenta, em média, a maior produção de CO₂ (115,98 mg), em relação às demais cepas estudadas, portanto é a cepa com maior potencial de biodegradação nesta etapa do oitavo ao vigésimo nono dia de experimento. Já a cepa 2 quando relacionada aos hidrocarbonetos A, B, C e D apresenta, em média, a menor produção de CO₂ (109, 24 mg).

Os tratamentos compostos pelo hidrocarboneto A apresentaram, em média, a maior produção de CO₂ (180,95 mg) emanado nesta etapa do experimento, sendo, portanto, considerado o composto orgânico mais facilmente biodegradável em relação aos demais hidrocarbonetos.

A cepa 14 relacionada ao hidrocarboneto A apresentou, em média, maior potencial de biodegradabilidade (189,38 mg), em contrapartida, a cepa 2 quando relacionada ao hidrocarboneto A apresentou, em média, uma produção de CO₂ (172,45 mg).

Já a cepa 13 quando associada ao hidrocarboneto B apresenta uma produção de 146,66 mg de CO₂, enquanto a cepa 1 associada ao mesmo hidrocarboneto apresenta uma produção de 137,60 mg de CO₂. A cepa 14 associada ao hidrocarboneto C apresenta 74,08 mg de CO₂, enquanto que a cepa 2 associada ao hidrocarboneto C apresenta uma produção de 57,41 mg de CO₂. A cepa 1 quando associada ao hidrocarboneto D produz 69,90 mg de CO₂ enquanto que a cepa 14 associada ao mesmo hidrocarboneto produz 53,86 mg de CO₂. Dessa forma, afirma-se que a avaliação da biodegradabilidade ocorre de acordo com o tipo de cepa que é utilizada nos experimentos e da composição do composto orgânico.

Levando em consideração os tratamentos da fase lenta, a maior produção de CO₂ (189,38 mg), foi observada pela cepa 1 quando associada ao hidrocarboneto A e a menor produção de CO₂ (53,86 mg), foi observada pela cepa 14 quando associada ao hidrocarboneto D. Dessa forma, afirma-se que o hidrocarboneto A é mais biodegradável em relação aos demais hidrocarbonetos.

Tabela 17– Médias de CO₂ acumulado (mg) das cepas e dos hidrocarbonetos A, B, C e D do primeiro ao vigésimo nono dia de ensaio.

Hidrocarbonetos					
Cepas	A	B	C	D	\bar{x}
1	145,64	110,93	43,19	49,98	87,43
2	120,36	108,98	42,62	44,15	79,03
13	122,92	105,54	50,78	48,26	81,88
14	128,15	104,29	52,64	39,44	81,13
\bar{x}	129,27	107,44	47,31	45,46	

A partir da tabela 17, observa-se que a cepa 1 relacionada aos hidrocarbonetos A, B, C e D apresenta, em média, a maior produção de CO₂ (87,43 mg) em relação as demais cepas estudadas, portanto é a cepa com maior potencial de biodegradação.

Já a cepa 14 quando relacionada aos hidrocarbonetos A, B, C e D apresenta, em média, a menor produção de CO₂ (81,13 mg).

Os tratamentos compostos pelo hidrocarboneto A apresentaram, em média, a maior produção de CO₂ (129,27 mg), sendo, portanto, considerado o composto orgânico mais facilmente biodegradável em relação aos demais hidrocarbonetos.

Observa-se que a cepa 1 associada ao hidrocarboneto A apresenta uma produção de 145,64 mg de CO₂, ao passo que quando utiliza-se o mesmo hidrocarboneto com a cepa 2 a produção é de 120,36 mg de CO₂. Já a cepa 1 associada ao hidrocarboneto B produz 110,93 mg de CO₂ enquanto que a cepa 14 relacionada ao mesmo hidrocarboneto produz 104,29 mg de CO₂. A cepa 14 associada ao hidrocarboneto C produz 52,64 mg de CO₂ e a cepa 2 com o mesmo hidrocarboneto produz 42,62 mg de CO₂. Já a cepa 1 quando associada ao hidrocarboneto D produz 49,98 mg de CO₂ enquanto que a cepa 14 associada ao hidrocarboneto D produz 39,44 mg de CO₂. Esse fato confirma que a avaliação da biodegradabilidade ocorre de acordo com o tipo de cepa que é utilizada nos experimentos e a composição do composto orgânico.

Levando em consideração os tratamentos desta segunda etapa (fase lenta), a maior produção de CO₂ (145,64 mg), foi observada pela cepa 1 quando associada ao hidrocarboneto A e a menor produção de CO₂ (39,44 mg), em média, foi observada pela cepa 14 quando associada ao hidrocarboneto D.

Foram realizados testes descritivos para as cepas de acordo com as categorias de “hidrocarbonetos”. Para verificar a existência de diferença de médias entre categorias dos hidrocarbonetos (A, B, C e D) para cada cepa, foi utilizada a técnica de análise de variância, ANOVA, considerando um nível de significância de 5%.

Através do resultado do teste conclui-se que existe diferença significativa (valor – p < 0,05) entre as categorias dos hidrocarbonetos com todas as cepas.

Para detectar as diferenças entre as categorias, foi realizado um teste de comparação múltipla onde foi realizado o *teste de Tukey*, considerando um nível de significância de 5%, conforme mostra a tabela 18.

Tabela 18 – Valores médios de biodegradabilidade de frações de hidrocarbonetos, expostos em mg de CO₂ cumulativo, durante 29 dias.

Hidrocarbonetos				
Cepas	A	B	C	D
1	81,54A	65,20A	14,52B	15,83B
2	31,05A	44,59A	17,28B	16,08B
13	16,23A	35,05A	16,23B	15,50B
14	23,18A	41,35A	15,89B	14,72B

De acordo com o teste de média, descrito na tabela 18, observa-se que os hidrocarbonetos A e B são iguais entre si e os hidrocarbonetos C e D também são iguais entre si, embora o primeiro grupo (A e B) são diferentes do segundo grupo (C e D).

5.3 Avaliação das cepas isoladas – Ensaio III

O ensaio III foi realizado com 2 cepas (1 e 14) e 4 hidrocarbonetos (A, B, C e D, respectivamente, óleo bruto 1, fração 6, fração 29 e fração 31), e com dois tipos de solos diferentes (arenoso e argiloso). O solo arenoso possui 70% de areia e 30% de argila e o solo argiloso possui 70% de argila e 30% de areia. As terminações X identificam os solos arenosos e as terminações Y identificam os solos argilosos. Os

gráficos relacionados ao ensaio II do experimento estão apresentados nas figuras 20 e 21, e os tratamentos estão descritos na tabela 8.

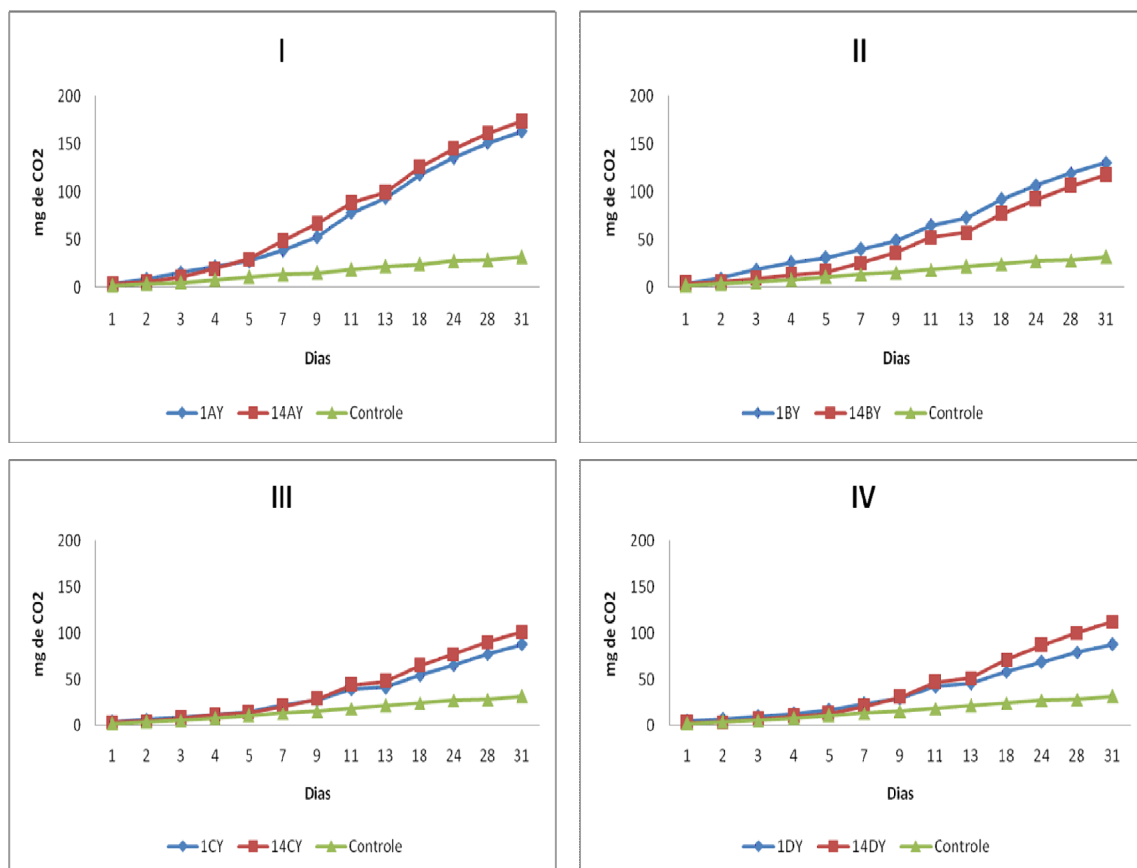


Figura 23 – Ensaio de biodegradabilidade (I – IV) dos hidrocarbonetos A, B, c e D (óleo bruto 1, fração 6, fração 29 e fração 31, respectivamente), por respirometria aeróbia, com as cepas 1 e 14, utilizando solo argiloso (Y) como substrato, por um período de 31 dias.

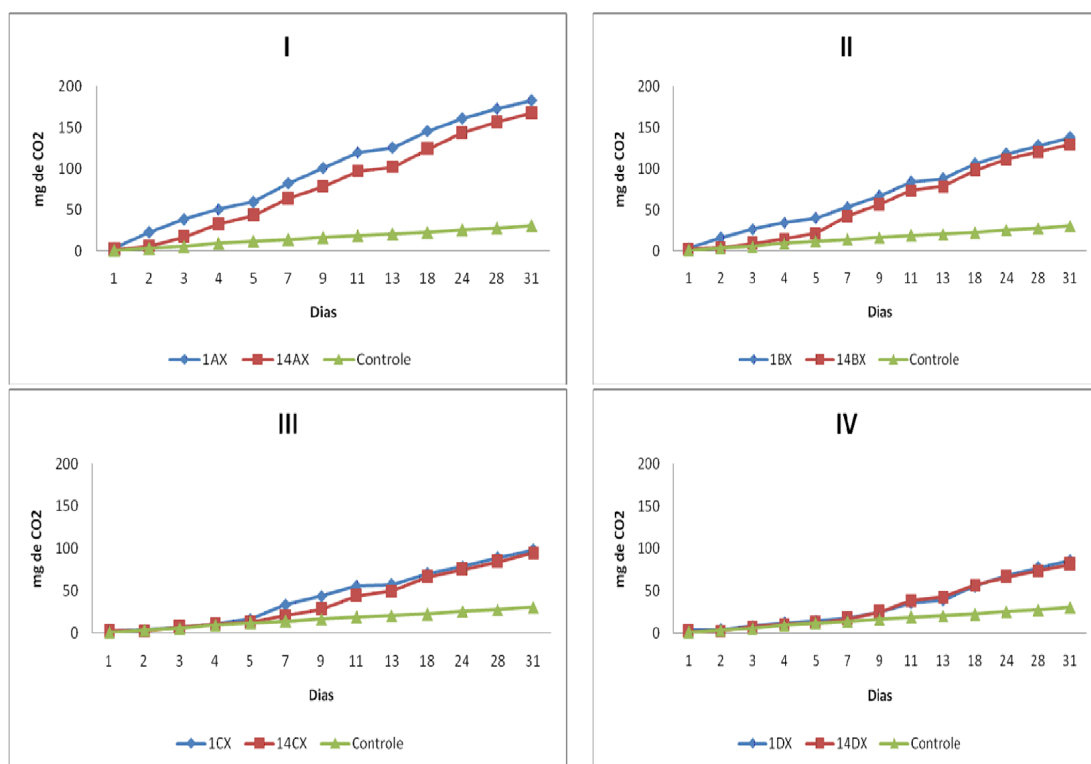


Figura 24 – Ensaio de biodegradabilidade (I-IV) dos hidrocarbonetos A, B, C e D (óleo bruto 1, fração 6, fração 29 e fração 31, respectivamente), por respirometria aeróbia, com as cepas 1 e 14, utilizando solo arenoso como substrato, por um período de 31 dias.

Observa-se que, os tratamentos em solos arenosos apresentam maior capacidade de biodegradação dos hidrocarbonetos em relação aos tratamentos em solos argilosos.

Isso se deve à quantidade de oxigênio que é maior nos solos arenosos, facilitando a biodegradabilidade. As cepas que estão relacionadas aos hidrocarbonetos A e B, tanto para os tratamentos em solo arenoso quanto para o argiloso, são mais biodegradáveis em relação às cepas que estão relacionadas aos hidrocarbonetos C e D.

Os gráficos das figuras 23 e 24 representam os ensaios de biodegradabilidade em solos argilosos e arenosos, respectivamente. Os tratamentos, em solos arenosos, 1AX, 1BX e 1CX apresentaram uma produção maior de CO₂ em relação aos

tratamentos 1AY, 1BY e 1CY, em solos argilosos. Em contrapartida, os tratamentos 14AY, 14CY, 1DY e 14DY, em solos argilosos, apresentaram uma produção maior de CO₂ em relação aos tratamentos 14AX, 14CX, 1DX e 14DX, em solos arenosos.

A tabela 19 apresenta os valores da constante de biodegradação (k) e o respectivo ajuste de reta (R²) dos tratamentos 1AX, 1BX, 1CX, 1DX, 14AY, 14BY, 14CY, 14DY, 1AY, 1BY, 1CY, 1DY, 14AY, 14BY, 14CY e 14DY em ordem crescente de biodegradabilidade.

Utilizou-se a cinética de primeira ordem para avaliar os dados obtidos na respirometria. Os valores da constante de biodegradação (k) dos tratamentos do ensaio III e seus respectivos ajustes de reta (R²) estão ilustrados na tabela 19 e os valores de k₁ e k₂ e seus respectivos ajustes são demonstrados na tabela 20 em ordem decrescente de biodegradabilidade dos compostos.

Tabela 19– Valores da constante de biodegradação (k) e respectivo ajuste da reta (R²) para os tratamentos ensaio III do experimento.

Tratamentos	k (dia ⁻¹)	R ²
14DY	0,1101	0,8089
14BX	0,1091	0,6786
14CX	0,1079	0,7649
14AY	0,1064	0,7235
14DX	0,1047	0,7537
14AX	0,1009	0,5989
1AY	0,1009	0,7503
14CY	0,1005	0,8193
14BY	0,1003	0,8137
1CX	0,0997	0,7144
1DX	0,0947	0,8227
1CY	0,0882	0,8354
1BY	0,0871	0,7040
1DY	0,0838	0,8270
1AX	0,0785	0,5428
1BX	0,0783	0,6169

Observa-se que o tratamento 14DY foi o que apresentou a maior taxa de degradação, com $k=0,1101$ e o tratamento 1BX com a menor taxa de degradação, com $k=0,0783$.

De acordo com a figura 25, pode-se afirmar que o tratamento 14DY apresentou um potencial de biodegradação de 11% da concentração inicial do hidrocarboneto presente neste tratamento, da mesma forma que o tratamento 1BX foi somente 7% biodegradado em 31 dias de experimento.

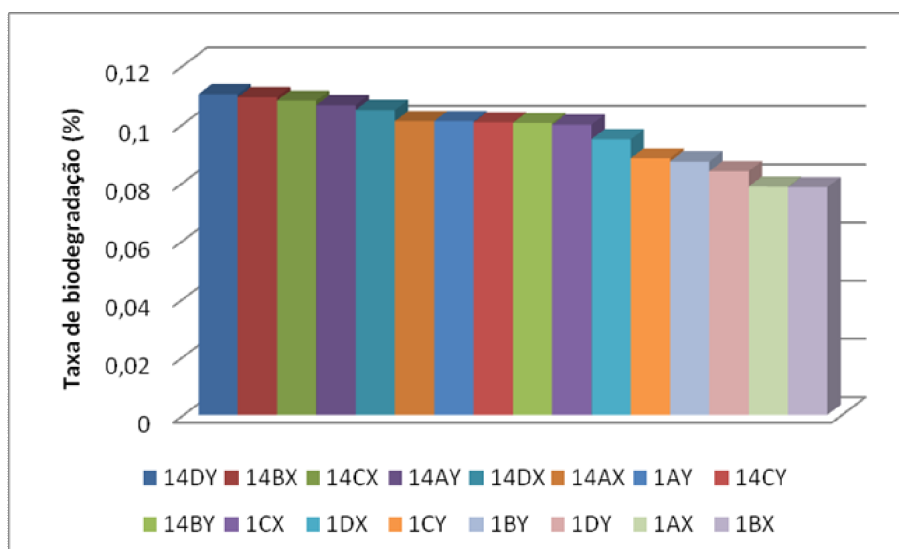


Figura 25 – Taxa de biodegradação (k) dos tratamentos do ensaio III, por um período de 31 dias.

Os tratamentos que foram testados em solos arenosos apresentaram, em média, uma velocidade de degradação maior que a dos tratamentos testados em solos argilosos.

O cálculo da taxa de biodegradação (k) do ensaio III também foi realizado em duas etapas, segundo Firme (2005). A fase rápida (k_1), considerando os dados do primeiro ao nono dia de experimento e a fase lenta (k_2), considerando do décimo ao trigésimo primeiro dia de experimento, conforme tabela 20.

Richard e Vogel (1999) analisaram a cinética de degradação de óleo diesel por duas linhagens de *Pseudomonas fluorescens* e constataram que 10,4% e 12,3% dos hidrocarbonetos foram degradados pelas bactérias ao final de 50 dias de experimento.

Tabela 20 – Valores das constantes de biodegradação (k_1 e k_2) e respectivos ajustes da reta (R^2) para os tratamentos do ensaio III do experimento.

Tratamentos	k_1 (d ⁻¹)	$R^2(1)$	k_2 (d ⁻¹)	$R^2(2)$
14AX	0,5549	0,8814	0,0316	0,9525
14BX	0,4886	0,9630	0,0333	0,9219
1BY	0,4528	0,9026	0,0393	0,9339
1AX	0,4419	0,7255	0,0243	0,9457
14AY	0,4306	0,9732	0,0384	0,9256
1CX	0,4036	0,9870	0,0325	0,9550
1BX	0,3854	0,7543	0,0288	0,9367
14DX	0,3771	0,8682	0,0454	0,8892
14CX	0,3768	0,9153	0,0459	0,8756
1AY	0,3714	0,8847	0,0436	0,8709
14DY	0,3411	0,9589	0,0515	0,9282
14CY	0,3064	0,9587	0,0494	0,9273
14BY	0,3053	0,9742	0,0469	0,9342
1CY	0,2691	0,9847	0,0462	0,9497
1DX	0,2906	0,8855	0,0506	0,9352
1DY	0,2577	0,9750	0,0428	0,9330

No ensaio III, os valores da cinética da biodegradação (k) e o tempo (t) só são inversamente proporcionais se o valor de k for calculado em uma única fase ou se for considerado o valor da taxa de biodegradação na fase lenta (k_2).

Os dados estatísticos do ensaio III foram realizados em duas etapas, sendo que a primeira etapa (fase rápida) foi realizada do primeiro ao nono dia. A segunda etapa (fase lenta) foi realizada do décimo ao trigésimo primeiro dia de experimento. Realizou-se também a análise dos dados em uma única etapa, do primeiro ao trigésimo primeiro dia de experimento. Os resultados estão dispostos em mg de CO₂ e estão apresentados nas tabelas de 21a 23.

Tabela 21 - Estatísticas descritivas das Cepas 1 e 14 , utilizando solos texturizados, sendo solo X (arenoso) e solo Y (argiloso) e dos hidrocarbonetos A, B, C e D (petróleo leve, fração 6, fração 29 e fração 31), considerando a análise do primeiro ao décimo dia.

Hidrocarbonetos					
Cepas	A	B	C	D	\bar{x}
1Y	24,01	25,56	13,38	15,37	19,58
14Y	26,76	15,81	13,22	12,85	17,16
\bar{x}	25,39	20,69	13,30	14,11	

Y = solo argiloso

Hidrocarbonetos					
Cepas	A	B	C	D	\bar{x}
1X	51,10	36,64	17,03	12,26	29,26
14X	34,74	21,60	12,04	11,11	19,87
\bar{x}	42,92	29,12	14,54	11,69	

X= solo arenoso

Observa-se, a partir da tabela 21, que os tratamentos em solos arenosos apresentam um potencial de biodegradação maior aos tratamentos em solos argilosos, isso se deve ao fato da aeração ser maior em solos arenosos, facilitando, assim, a biodegradação. A cepa 1, mostra mais facilidade na degradação do hidrocarboneto B (25,56 mg), em solo argiloso, e na degradação do hidrocarboneto A (51,10 mg) em solo arenoso. A cepa 14X apresentou maior produção de CO₂ (34,74 mg) quando associada ao hidrocarboneto A, em solo arenoso. O hidrocarboneto D é o que apresenta, em média, o menor potencial de degradação microbiana, em relação aos demais hidrocarbonetos.

Tabela 22 - Estatísticas descritivas das Cepas 1 e 14, utilizando solos texturizados, sendo solo X (arenoso) e solo Y (argiloso) e dos hidrocarbonetos A, B, C e D (petróleo leve, fração 6, fração 29 e fração 31), considerando a análise do décimo primeiro ao trigésimo primeiro dia.

Hidrocarbonetos					
Cepas	A	B	C	D	\bar{x}
1Y	123,05	97,82	61,21	63,99	86,52
14Y	132,45	83,84	71,25	78,54	91,52
\bar{x}	127,75	90,83	66,23	71,27	

Y= solo argiloso

Hidrocarbonetos					
Cepas	A	B	C	D	\bar{x}
1X	151,40	110,42	74,76	60,13	99,18
14X	131,60	102,02	69,01	59,87	90,63
\bar{x}	141,50	106,22	71,89	60,00	

X= solo arenoso

Nesta etapa (fase lenta), ocorre a maior parte de degradação dos hidrocarbonetos. As maiores produções de CO₂ foram observadas nos tratamentos realizados em solos arenosos, devido à aeração. A cepa 1Y, em solo argiloso, produz 123,05 mg de CO₂ quando associada ao hidrocarboneto A, já a cepa 1X, em solo arenoso, produz 123,05 mg de CO₂. A cepa 14Y, em solo argiloso, associada ao hidrocarboneto produz 132,45mg de CO₂, enquanto que a cepa 14X, em solo arenoso, produz 131,50 mg de CO₂.

Tabela 23 - Estatísticas descritivas das Cepas 1 e 14, utilizando solos texturizados, sendo solo X (arenoso) e solo Y (argiloso) e dos hidrocarbonetos A, B, C e D (petróleo leve, fração 6, fração 29 e fração 31), considerando a análise do primeiro ao trigésimo primeiro dia.

Hidrocarbonetos					
Cepas	A	B	C	D	\bar{x}
1Y	69,72	58,91	35,70	37,81	50,54
14Y	75,54	47,21	40,00	43,17	51,48
\bar{x}	72,63	53,06	37,85	40,49	

Y= solo argiloso

Hidrocarbonetos					
Cepas	A	B	C	D	\bar{x}
1X	97,39	69,62	43,67	34,35	61,26
14X	79,44	58,71	38,34	33,62	52,53
\bar{x}	88,42	64,17	41,01	33,99	

X=solo arenoso

A partir da análise da tabela 23 observamos que, nesta etapa única (do primeiro ao trigésimo primeiro dia), as maiores produções de CO₂ são dos tratamentos realizados em solos arenosos. A cepa 1Y produziu 69,72 mg de CO₂ quando associada ao hidrocarboneto A. Já a cepa 1X produziu 97,39 mg de CO₂, associada

ao hidrocarboneto A. A cepa 14Y produziu 75,54 mg de CO₂ quando associada ao hidrocarboneto A, já a cepa 14X, produziu 79,44 mg de CO₂ quando associada ao hidrocarboneto A.

5.4 Comparação das taxas de biodegradação nos ensaios I, II e III

Tabela 24 – Comparação das taxas de biodegradação (k) entre os tratamentos nos três ensaios

Tratamentos	Ensaio I	Ensaio II	Ensaio III	
			arenoso	argiloso
1	0,1301	0,0636	0,0785	0,1009
2	0,1998	0,0833		
13	0,2078	0,0951		
14	0,1878	0,0835	0,1047	0,1101

O tratamento apresentou um potencial de biodegradação de 13% no ensaio I, com 15 dias de experimento, 6% no ensaio II, com 29 dias de experimento e 7% no ensaio III (solos arenoso) e 10% (solo argiloso), em 31 dias de experimento. O tratamento 14 apresentou um potencial de biodegradação de 18% no ensaio I, 8% no ensaio II e 10% (solo argiloso) e 11% (solo arenoso) no ensaio III. O tratamento 14 apresentou um comportamento de biodegradação similar ao primeiro, diferenciando na biodegradação dos solos, sendo mais biodegradável no solo argiloso.

O tratamento 2 apresentou um potencial de 19% de biodegradação no ensaio I e 8% no ensaio II. O tratamento 13 apresentou um potencial de biodegradação de 20% no ensaio I e 9% no ensaio II.

No ensaio I e II, o tratamento 13 foi o que apresentou o maior potencial de biodegradação e no ensaio III, o tratamento 14 foi o que apresentou o maior potencial de biodegradação, tanto para solo arenoso quanto para o argiloso.

6. CONCLUSÕES

As cepas isoladas neste trabalho apresentam potencial de biodegradabilidade de hidrocarbonetos derivados do petróleo. Assim, as mesmas podem ser utilizadas como uma alternativa eficaz no tratamento de áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo.

Foram isoladas um total de 19 cepas, a partir de solos de horta e mangue, que apresentam capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo.

Observou-se, a partir dos controles, que a adição do inóculo bacteriano nos tratamentos é fundamental para a biodegradação dos compostos orgânicos, influenciando diretamente nos resultados dos ensaios de biodegradabilidade.

Os testes morfológicos e bioquímicos realizados nas cepas isoladas neste experimento são insuficientes para a classificação das bactérias.

O hidrocarboneto A (petróleo leve) apresentou ser mais biodegradável em relação aos hidrocarbonetos B (fração 6), C (fração 29) e D (fração 31).

Estatisticamente, não existe diferença significativa entre os hidrocarbonetos A e B e os hidrocarbonetos C e D, nos estudos realizados neste experimento.

De acordo com a cinética empregada neste estudo, a fase rápida (k_1) dos experimentos representam a maior parte da degradação dos hidrocarbonetos derivados do petróleo.

7. RECOMENDAÇÕES

- Analisar os compostos orgânicos estudados através de cromatografia com a finalidade de identificá-los.
- Caracterizar o solo utilizado como fonte de inóculo sob os aspectos físicos, químicos e biológicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE, E. Petróleo e seus derivados. Rio de Janeiro. Petrobrás/DIVEN/SEM-RIO, 122p., 1984.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Resíduos em solos: determinação da biodegradação pelo método respirométrico. NBR 14.283. Rio de Janeiro, 1999.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 13786. Seleção de equipamentos e sistemas para instalações subterrâneas de combustíveis em postos de serviço. Rio de Janeiro, 1997.

ALABURDA, J. NISHIHARA, L. Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. Revista de Saúde Pública, 32:160-165, 1998.

ALMEIDA, M. H.; CARVALHO, F. P. Manual de Operação do Landfarming. PETROBRAS - REPAR, Araucária, 1995.

ANDRADE, C.A.; OLIVEIRA, C.; CERRI. Cinética de Degradação da Matéria Orgânica de Biossólidos após aplicação no solo e relação com a composição química inicial. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo – USP, 2006.

ARAÚJO, A.S.F. Biodegradação, extração e análises de glifosato em dois tipos de solo. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2002.

ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. 2ª ed. New York: John Wiley & Sons, 1977.

ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology. 4º Ed., John Wiley, New York, 472p., 1967.

ALEXANDER, M. Introducción a la microbiología del suelo. 2º. Ed. Planta Alta, México: libros y editoriales, 1980.

ATLAS, R. M. Stimulated petroleum biodegradation. *Critical Reviews in Microbiology*, 9(1):371-386, 1977.

ATLAS, R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, v.31, nº 9, p. 178-182, 1995.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. 1973. Inhibition by fatty acids of the biodegradation of petroleum. *Antoine van Leeuwenhoek Journal of Microbiology & Serology*, V. 39, p. 257-271, 1973.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: na environmental perspective. *Microbiological Reviews*, V 45, p. 180-209, 1981.

BAIRD, C. Química Ambiental. Ed. Bookman. São Paulo-SP. p. 662, 2002.

BENTO, A.M. Análise química da degradação de hidrocarbonetos de óleo diesel no estuário da Lagoa dos Patos - Rio Grande- RS. Dissertação de mestrado, Rio Grande do Sul, 2005.

BÍCEGO, M.C.. Contribuição ao estudo de hidrocarbonetos biogênicos e do petróleo no ambiente marinho. Ed. Resenha Tributária. São Paulo. 156p, 1988.

BOUCHEZ, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J.P.. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 43, 156±164, 1995.

BORDEN, R. C.; GOMES, C. A. & BECKER, M. T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. *Ground Water*, 33:180-189, 1995.

BORGES, F.A.T. Biodegradação de fluidos de base e de cascalhos oriundos da perfuração de poços de petróleo e gás. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, 2006.

BOSSERT, I.; BARTHA, R. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas, R.M. (Ed.), Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Company, New York. p. 435–473, 1984.

CALDEIRA, D.S.A. Cinética da degradação de compostos orgânicos no solo. Piracicaba. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1997.

CARDOSO, L.C. Petróleo : do poço ao posto. Rio de Janeiro: Qualitymark, 192 p, 2005.

CANSFIELD, P.E., RACZ, G.J. Degradation of hydrocarbon sludges in the soil. Canadian Journal of Soil Science. Vol. 58, p. 339- 345, 1978.

CHAÎNEAU, C.H., MOREL, J., DUPONT, J., BURY, E., OUDOT, J. Comparison of fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *The Sci. of the T. Environ.*, v.227, p.237-247, 1999.

CHANG, B.V.; SHIUG, S.Y.Y. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere* 48 (717-724), 2002.

CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, vol. 5, Reatores Anaeróbios. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 1997.

CHOSSON,P.;LANAN,C.;CONNAN J.; DEEORT,D. Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions. *Nature London*, V.351, p. 640-642, 1991.

CNUMAD – Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento. Agenda 21. 3ª ed. Brasília: Senado Federal, subsecretaria de edições técnicas, 598 p., 2001.

CORSEUIL, H.X.; MARINS, M.D.M. Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave? Revista Eng. Ambiental, Vol 2, p.50-54, 1997.

CURY, J. C. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. Dissertação de mestrado. Piracicaba – São Paulo, 2002.

CUTRIGHT, T.J. LEE, S. In Situ Soil Remediation: bacteria or fungi? Department of Chemical Engineering. University of Akron – Ohio. USA.. P. 413-419, 1994.

DOMINGUES, R.F. Estudo da Biodegradação de Efluente Oleoso Automotivo. Rio Claro: PIBIC/CNPq. Relatório de bolsa PIBIC/CNPq, 2005.

FALL, R.R.; BROWN, J.L.; SHAEFFER, T.L. Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. Applied & Environment Microbiology, V.38. p.715-722, 1979.

FEEMA – Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente. Vocabulário básico de meio ambiente. 4ª ed. Rio de Janeiro: Petrobrás. Serviço de Comunicação Social 246p, 1992.

FELLENBERG, G. Introdução aos problemas da poluição ambiental. EPU: São Paulo, 1980.

FERREIRA, J.; ZUQUETTE, L. V. Considerações sobre as interações entre contaminantes constituídos de hidrocarbonetos e os componentes do meio físico. In: Geociências: São Paulo, n. 2, v. 17, p. 527 – 557, 1998.

FETTER, C. W. Contaminant Hydrogeology. New York: Macmillan, 1993.

FIRME, L.P. Cinética de degradação microbiológica de torta de filtro no solo na presença de cádmio e níquel. Dissertação (Mestrado). Piracicaba. São Paulo, 2005.

FINOTTI, A. R.; Caicedo, N.L.; Rodriguez M.T.R. Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados do petróleo: toxicidade e a legislação brasileira, Revista Brasileira de Recursos Hídricos/Associação Brasileira de Recursos Hídricos, ABRH, vol. 6, nº 2, p. 29-46, 2001.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; VAN HAANDEL, A.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P.F.F. Fundamentos do Tratamento Anaeróbio. In: CAMPOS, J.R. (Coord.). Tratamento de Esgotos Sanitários por Processo Anaeróbio e Disposição Controlada no Solo. Rio de Janeiro: ABES, p. 29-52, 1999.

FORNO, R.G. D. Avaliação da Poluição do Solo por Derivados de Petróleo e sua Remediação. Dissertação (Mestrado). Curitiba, 2006.

FLOODGATE, G. 1984. The of petroleum in marine ecosystems. In: Atlas, R. M. ed. Petroleum Microbiology. New York, Macmillan. p. 355-398.

GERSON, D. F. Biosurfactants: production – properties – applications / editado por Naim Kosaric. 269-286, 1993.

GHAZALI, F.M; RAHMAN,R.N.Z.A.; SALLEH,A.B.; BASRI,M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation, 2004.

GHAEMGHAMI, J.; BAKER, R.S.; SIMKINS, S. Outgassing losses of Toluene and M-xylene Evaluated by ¹⁴C-based Mass Balances for Laboratory Bioventing Simulations. Journal of Soil Contamination. Vol. 7, p.697-708, 1998.

GIBSON, A.T. The microbial oxidations of aromatic hydrocarbons. Critical reviews in microbiology, V .1, p.199-223, 1971.

GRADY, C. P. L., LIM, H. Biological wastewater treatment: theory and application. Marcel Dekker, New York. 1980.

GRISHCHENKOV, V.G.; Townsend, R.T.; McDonald, T.J.; Autenrieth, J.S.; Boronin, A.M. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. Process Biochemistry 35 (889-896), 2000.

GHOLSON, Guire, e Friede, 1972; Soli, 1973, em: RISER-ROBERTS, E. Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical and chemical processes. Lewis publishers. Washington, D.C.,1998.

GOMES,G.M. Desenvolvimento Sustentável no Nordeste Brasileiro: uma interpretação impopular. In: GOMES,G.M.; SOUZA, H.R.; MAGALHÃES, A.R. (Orgs.). Desenvolvimento sustentável no Nordeste. Brasília: IPEA, p.9-60. 372 p., 1995

HAINNES, J.R.; ALEXANDER,M. Microbial degradation of high molecular weight alkanes. Applied microbiology, V. 28, p.1084-1085, 1974.

HAIMANN, R.A. Fungal Technologies for the treatment of hazardous waste. Environmental Progress, Santa Ana. Califórnia, vol.14 nº 3, p.201-203, 1995.

HASAN, S.E. Geology and hazardous waste management, Printice hall, USA, 387p. 1996.

HEELY, D.A.; WERK, E.S.; KOWALSKI, R.G. Bioremediation and Reuse of Soils Containing nº5 Fuel Oil in New England Using an Aboveground Treatment Cell: a Case Study. Hidrocarbon Contaminated Soils VII. Lewis Publishers, Chelsea, 1992.

HUESEMANN, M.H. Guidelines for Treating Petroleum Hydrocarbon – Contaminated Soils – Journal of Contamination, Vol.3, nº 3, p. 299-318, 1994.

JAIN. D.K.; Lee, H.; Trevors, J.T. “Effect the addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of select hydrocarbons in soil”. Journal Ind. Microbiol. 10: 87-93, 1992.

JENKINSON, D.S.; RAYNER, J.H. The turnover of soil organic matter in some of Rothamsted Classical Experimentes. Soil Science. V.123, p. 298-305, 1977.

JONES, J. G.; EDDINGTON, M. A. An ecological survey of hydrocarbon oxidizing microorganisms. Journal of General Microbiology, V. 52, p. 381-390, 1968.

KABATA-PENDIAS, A.; Pendias, H. Trace elements in soils and plants, Boca Raton, USA, 315 p., 1986.

KENNISH, M.J. Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects. CRC Press, Inc. Florida, p. 133-181, 1992.

KOBAYASHI e Rittmann, 1982, em: RISER-ROBERTS, E. Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical and chemical processes. Lewis publishers. Washington, D.C.,1998.

LATHAN, J.L. Cinética elementar de reação. São Paulo. Edgard Blucher, EDUSP, 1974.

LANGENBACH, T. *et alli* . Microrganismos de Importância Agrícola. EMBRAPA, s/v., p.217-228. Rio de Janeiro, 1994.

MACKENNA, E.J.;KALLIO,R.E. Hydrocarbon structure its effect on bacterial utilizations of alkanes. In: HEUKEKIAN,H.; DONDERO,N.C.. Ed. Principles and application in aquatic microbiology. New York. P.1-14, 1964.

MAGALHÃES, H.M. Bolsista de Iniciação Científica. Quantificação de proteínas como resultado da biodegradação de naftaleno por *Pseudomonas Fluorescens* HK44.

MARIANO, J. B. Impactos ambientais do refino do petróleo. Rio de Janeiro: Interciência, 2005.

MARTINS, C. A. Introdução da concorrência e barreiras à entrada na atividade de refino de petróleo no Brasil. Dissertação de Mestrado em Economia. Rio de Janeiro: Instituto de Economia/UFRJ, 2003.

MARTINS, B.A.D. Avaliação da cinética de biodegradação em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes nitrogênio e fósforo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

MARTINS, A.; DINARDI, A.L.; FORMAGI, V.M.; LOPES, T.A.; BARROS, R.M.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N.N.; SOBRINHO, G.D.; TONSO, S. E PELEGRINI, R. Biorremediação. Centro Superior de Educação Tecnológica (CESET) – UNICAMP. III Fórum de Estudos Contábeis, 2003

MARQUES JR, A.N.; MORAES, R.B.C. & MAURAT,C.M. Biologia Marinha. Rio de Janeiro. 311-334. In: PEREIRA, R.C.; GOMES,A.S. (org). Interciência. P382, 2002.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing area. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.67, n.7, p.3127-3133, 2001.

MANCINI, T.M. Métodos de caracterização de áreas potencialmente contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Geociências Exatas. Rio Claro, São Paulo, 2002.

MACIEL, N. C. CPRH. Alternativas de uso e proteção dos manguezais do nordeste. Series publicações técnicas nº003, p 9-37, 1991

MS (Ministério da Saúde), 2000. *Portaria No. 1469*. 17 Setembro 2001. <<http://www.funasa.gov.br/amb/pdfs/portaria-1469.pdf>>.

MICHEL, J. Adverse effects from oil. www.darcnw.noaa.gov/iad_apd.pdf (16/04/02)

MOLLEA, C.; Bosco, F.; Ruggeri, B. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. Itália, .Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/chemosphere> , 2005.

MORAIS, E.B. Biodegradação de Resíduos Oleosos Provenientes de Refinaria de Petróleo através do sistema de biopilhas. Rio Claro, São Paulo, 2005.

MORAES, L.M. Avaliação da Biodegradabilidade Anaeróbia de Lodos de Esgoto Provenientes de Reatores Anaeróbios Seqüenciais. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP Faculdade de Engenharia Agrícola – FEAGRI, 2005.

MUSUMECI, M.R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. In: CARDOSO, EJB; TSAI; SM; NEVES; MCP(ed). Microbiologia do solo. 1ª edição. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 1992.

NEDER, R.N. Microbiologia: Manual de Laboratório. São Paulo: Nobel, 1992.

NITSCHKE, M. Pastore, G.M. “Biossurfactantes: propriedades e aplicações”. Química Nova, vol. 25, No. 5, pp. 772-776, 2002.

NOCENTINI, M. PINELLI, D. FAVA, F. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixture: the residual concentration problem. Chemosphere, Oxford, v.41, p.1115-1123, 2000.

OLIVEIRA, S.D. Biodegradação de Petróleo de solo areno-argiloso por fungo filamentosos. Bolsista de Iniciação Científica, Química, UFF. XIII Jornada de Iniciação Científica – CETEM

PANTAROTO, S. Isolamento, Seleção, Identificação e Avaliação de Microrganismos Aeróbios "*In Situ*", com habilidade à biodegradação de linamarina. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrônômicas Campus de Botucatu, 2001.

PALUTO, D.; LIMAS, M.M. de; CORESUIL, H.X. Intemperização de fontes de diesel em sistemas superficiais. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Trindade. Florianópolis, 2006.

PELCZAR, J.M. Jr, CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. Microbiologia – Conceitos e Aplicações. 2ª ed. São Paulo. Makron Books, 1996.

PETERS, K.E.; MOLDOWAN, J.M. The biomarkers guide: Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. First Edition, Englewoods Cliffs, New Jersey Prentice Hall, 363p, 1993.

PICARELLI, S. Avaliação de contaminação de solos por hidrocarbonetos e metais pesados em diques de contenção. Dissertação de mestrado. Porto Alegre – RS, 2003.

PRINCE, M.; SAMBASIVAM, Y. Biorremediation of petroleum wastes from the refining of lubricant oils. Environmental Progress, v.12, nº 1, 1993.

POTTER, T.L.; SIMMONS, K.E. Composition of Petroleum Mixtures. Amherst, Massachusetts: Amherst Scientific (Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series, V3), 1998.

RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. International Biodeterioration & Biodegradation 44 (93-100), 1999.

REIS, T.C. RODELLA, A.A. Cinética da degradação da matéria orgânica e variação do pH do solo sob diferentes temperaturas. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.26, nº 3, p.619-626, 2002.

RISER-ROBERTS, E. Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical and chemical processes. Lewis publishers. Washington, D.C.,1998.

ROCCA, A.C.C.; IACOVONE, A.M.M.B.; BARROTTI, A.J.; CASARINI, D.C.P.; GLOEDEN, G.E.; STRAUS, E.L.; ROMANO, J.A.; RUIZ, L.R.; SILVA, L.M.; SAITO, L.M; PIRES, M.C.; LEÃO, M.L.G.; CASTRO NETO, P.P.; COLUCCI, R.; CUNHA, R.C.A. Resíduos Sólidos Industriais. 2ª ed. Rev. ampl. São Paulo. CETESB, 233 p, 1993.

RODELLA, A. A. & SABOYA, L.V., Calibration for conductimetric determination of carbon dioxide. Soil Biology & Biochemistry 31 (2059-2060), 1999.

ROBBINS, E. A., ROBERTSON, M., STEUBE, G. False identification of BTEX compounds using EPA method 8020. Hydrocarbon contaminated soils and groundwater. v.3, p. 93 – 110,1993,.

RODRIGUEZ, C.P.M. A influência das Características dos Solos na Remediação de Solos Contaminados Através de Processos Oxidativos Avançados com Persulfato e Reagente de Fenton. Universidade de São Paulo, 2006.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do Petróleo. In: Microbiologia Ambiental. ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CNPMA). Jaguariúna, SP, 1997.

SCHERRER, P. Mille, G. Biodegradation of crude oil in a experimentally polluted peaty mangrove soil. Marine Pollution Bulletin, v.20, nº 9, p. 430-432, 1989.

SANTOS, L.C. Bolsista de Iniciação Científica, Eng. Química, UFRJ. Avaliação da potencialidade do uso de biossurfactante na biorremediação de solo contaminado por óleo cru.

SEABRA,P.N. Uso de biorremediação em áreas impactadas pela indústria de petróleo. In: MELO,I.S et al. Biodegradação. Jaguariúna. São Paulo. Embrapa Meio Ambiente, p.41-59. 440p, 2001.

SKLADANY, G.J., METTING JR., F.B. Bioremediation of contaminated soil. p. 483 – 513. In: Metting Jr, F.B. (ed.) Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management. Marcel Dekker, Inc. New York. 646 p, 1993.

SILVA, C. H. P. de M. Bacteriologia; um texto ilustrado. Teresópolis –RJ: Eventos, 1999.

SILVA,R.L.B; BARRA, C.M.; MONTEIRO, T.C.do N.; BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Cad. Saúde Pública vol.18 no.6. Rio de Janeiro, Brasil,2002.

SOLOMONS, T. W. G. Organic Chemistry. New York: John Wiley, v. 1. p.777, 1996.

STRECK, E.V. Kampf, N.; Dalmolin, RSD.; Klamit, E.; Nascimento, P.C.; Schneider, P. Solos do Rio Grande do Sul, Editora da Universidade – UFRGS, Porto Alegre, RS, 107 p, 2002.

STRALHER, A.N.; Stralher, A.H. geografia física. 3ª ed. Barcelona: Omega, 550p, 2000.

TAVARES, M. E. E. Análise do refino no Brasil: estado e perspectiva – uma análise “cross-section”. Tese de Doutorado em Ciências em Planejamento Energético. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ, 2005.

TAUK, S.M. Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. Revista Brasileira de Geociência, v 20, n ¼, 299-301, 1990.

TELES, C.R. Monitoramento da Biodegradação Aeróbia de Lodo de Esgoto em Solo via Modelos Matemáticos. VIII Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2006.

TIBURTIUS, E.R.L; ZAMORA, P.P.; LEAL, E.S.; Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. Departamento de química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR e Centro Federal de Educação Tecnológica, Ponta Grossa – PR.

URURAHY, A.F.P. Biodegradação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria de Petróleo. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1998.

VAN EYK,J.; BARTELS,J.J. Paraffin oxidation in pseudomonas aeruginosa.In: Introduction of paraffin oxidation. Journal of bacteriology. V.96. p.706-712,1968.

VANNUCCI, M. Os manguezais e nós: Uma síntese de percepções. São Paulo: DUSP, . 233 p,1999

VOLKERING, F., BREURE, A.M., van ANDEL, J.G. and RULKENS, W.H. "Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons". Appl. Environ. Microbiol. vol. 61 pp. 1699-1705, 1995..

WALKER,J. D; COLWELL,R.R.;VAITUZIS,Z.; MEYER,S.A. Petroleum degrading achlorophyllous alga Prototbeca zopfi. Nature London, V.254, p.423-434, 1975.

WEISMAN, W. Analysis of petroleum hydrocarbon in environmental. Amherst, Massachusetts: Amherst Scientific (Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series, V1),1998.

WOODHOUSE, W.W.; Seneca, E.D.; Broome, S.W. Propagation of *Spartina Alterniflora* for substrate stabilization and salt-marsh development. Fort Belvoir. U.S. Army Coastal Engineering Research Center, 155 p. (Technical Memo, 46),1974

YUAN, S.Y., WEI, S.H, CHANG, B.V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere*, v.41, p.1463-1468, 2000.

YERUSHLMI,L.; Rocheleau, S.; Cimpoaia, R. ; Sarrazin, M; Sunahara, G.; Peisajovich, A; Leclair,G, and Guiot, S.R. Enhanced Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soil. *Bioremediation Journal* 7(1), 37-51, 2003.

ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; FORESTI, E. Intrinsic Kinetic Parameters of Substrate Utilizations by Immobilized Anaerobic Sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, v.53, p.220-225, 1997.