Universidade Federal do Rio de Janeiro
Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Escola de Química

Tese de Doutorado

"Biotratamento de Resíduo Oleoso da Indústria do Petróleo por Batelada Seqüencial e Avaliação da Ecotoxicidade"

Edelvio de Barros Gomes

Orientadores: Professor Nei Pereira Jr., *PhD*
Professora Iracema Andrade Nascimento, *DSc*

Rio de Janeiro, 2008

Edelvio de Barros Gomes

Tese de Doutorado

"Biotratamento de Resíduo Oleoso da Indústria do Petróleo por Batelada Seqüencial e Avaliação da Ecotoxicidade"

Tese de Doutorado apresentada por Edelvio de Barros Gomes ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor

Orientadores: Professor Nei Pereira Jr., *PhD* &
Professora Iracema Andrade Nascimento, *DSc*

Rio de Janeiro, 2008

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Escola de Química

Tese de Doutorado apresentada por Edelvio de Barros Gomes ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio De Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor

Defendida publicamente, em 10 de dezembro de 2008 diante da banca examinadora:

Professor Nei Pereira Jr *PhD* (Orientador – Presidente)

Professora Dra Iracema Andrade Nascimento (Orientadora)

Professor Dr. Antônio Carlos Augusto da Costa (UERJ)

Professor Dr. Alexandre Soares dos Santos (UFVJM)

Dra Adriana Ururahy Soriano (CENPES-Petrobrás)

Professora Dra Magali Christe Cammarota (EQ-UFRJ)

Professora Dra Lidia Yokoyama (EQ-UFRJ)

FICHA CATALOGRÁFICA

GOMES, EDELVIO DE BARROS

Biotratamento de Resíduo Oleoso da Indústria do Petróleo por Batelada Seqüencial, e Avaliação da Ecotoxicidade / Edelvio de Barros Gomes. Rio de Janeiro, 2008.
xix, 219p. 29,7cm.

Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Escola de Química, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2008.
Orientadores: Professor Nei Pereira Jr., *PhD* &
Professora Iracema Andrade Nascimento, *DSc*

1. Processos Periódicos
2. Biotratamento
3. Batelada Sequencial
4. Biomonitoramento
5. Resíduo Oleoso

I. Pereira Jr., & Nascimento, I. A.
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Escola de Química. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive

Ricardo Reis (Fernando Pessoa)

A minha irmã, Wilma Gomes (*in memorian*),

Dedico

A Rita, João e Júlia

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Aqui nasci para a academia. Agradeço ao meu orientador Professor Nei, pela sua generosidade como pessoa e como intelectual vanguardista que é, dando-me liberdade para escrever e para buscar por novos conhecimentos, atividades estas que amo desempenhar, cujos frutos contribuíram na minha formação e certamente contribuirão na formação de outros. Obrigado mestre!

A minha orientadora Professora Iracema, pela acolhida em sua residência e em seus laboratórios, pelo carinho, pelo exemplo de força e empreendedorismo, e ao mesmo tempo, humildade e gentileza, e por me iniciar nesse rico e vasto mundo da ecotoxicologia

Ao Professor Rosado, por me abrir as portas dos seus laboratórios, pela presteza com que me recebeu e pelos ensinamentos profícuos, me apresentando a este universo magnífico dos estudos da ecologia molecular microbiana

A Doutora Adriana Soriano, pela generosidade de sempre, e pelo apoio logístico que possibilitou o deslocamento das amostras de SUAPE (PE) para o LADEBIO (RJ)

A Professora Maria de Fátima (UFPE), por ter cedido suas instalações para a realização de experimentos preliminares. ...parafraseando Jean-Paul Sartre... "o importante não é o que fazem conosco, mas sim o que nós fazemos com o que fazem conosco"

Ao Professor Alexandre Soares (UFVJM), pela contribuição nos ajustes analíticos, pela atenção, apoio e amizade

Ao técnico Luiz Cláudio (Luizão) pelo apoio técnico e pelo companheirismo

A Rita, sem a qual nada disso faz sentido

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, pelo amor e pelo aconchego

A equipe do Professor Rosado, em especial a Adriana, Flávia e Ricardo

A equipe da Professora Iracema: Berna, Solange, Jársia, Débora e Andréa

Aos amigos da UFPE: Pérsio, Breno, Cynthia, Carla, Tati, Beta, Mala, Poli e Gleice, pelo apoio técnico e moral nos momentos mais labirínticos

A todos os companheiros do LADEBIO

A FAPERJ, a Petrobras, ao CNPq, a TRANSPETRO-PE (na pessoa do engenheiro Ubirajara Santos) e a todos que contribuíram para que este trabalho se materializasse

RESUMO

BIOTRATAMENTO DE RESÍDUO OLEOSO DA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO POR BATELADA SEQÜENCIAL, E AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE

A tratabilidade de resíduo de óleo Diesel proveniente de tanques de armazenamento do terminal da Petrobrás em SUAPE-PE foi investigada, utilizando-se biorreatores operados por batelada seqüencial. O resíduo foi caracterizado química e composicionalmente e em seguida foram elaborados e executados dois planejamentos fatoriais fracionados e um experimento univariado a fim de se determinar os ótimos de: fonte de nitrogênio, relação C:N, pH, condições de aeração e carga orgânica inicial. As condições em biorreator foram delineadas a partir da condução de bateladas simples com a finalidade de se determinar: perdas abióticas, condições gerais de tratabilidade, crescimento microbiano e a reprodutibilidade dos experimentos em frascos. Duas bateladas seqüenciais foram conduzidas: uma com três ciclos de 110h e outra com quatro ciclos de 72h. A efetividade do processo foi avaliada através das taxas de biodegradação ao final de cada ciclo. As condições preconizadas na batelada de ciclos de 72h demonstraram ser mais efetivas na degradação dos hidrocarbonetos. As taxas de biodegradação ao final dos ciclos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, foram $0,74\%.h^{-1}$, $1,33\%.h^{-1}$, $1,06\%.h^{-1}$ e $1,04\%.h^{-1}$. Mudanças nos membros da comunidade microbiana (observadas através do emprego da técnica de DGGE utilizando-se fragmentos da subunidade 16S do rDNA), ao final do ciclo 1 e início do ciclo 2, parecem estar conectadas às mudanças nas taxas de biodegradação. Os perfis de taxas de assimilação de oxigênio da comunidade aclimatada proveniente do final de cada ciclo corroboraram com as taxas de biodegradação ($124,9mgO_2.L^{-1}.h^{-1}$, $252,9mgO_2.L^{-1}.h^{-1}$, $120,4mgO_2.L^{-1}.h^{-1}$, e $108,8mgO_2.L^{-1}.h^{-1}$). Avaliações nas respostas de ecotoxicidade realizadas com organismos-teste autóctones (ouriço-do-mar: *Echinmometra lucunter*, ostra: *Crassostrea rhizophorae* e microalga: *Pseudokirchneriella subcaptata*) revelaram a capacidade do processo de reduzir a toxicidade do resíduo. Altos valores de percentagem de redução de toxicidade foram observados para o final do ciclo 2 (70,1% quando *E. lucunter* foi o organismo-teste, e 78,5% quando *C. rhizophorae* foi o organismo-teste). O resíduo proveniente do ciclo 4 não promoveu resposta tóxica para *E. lucunter* (redução de 100% da toxicidade) e promoveu baixa resposta para *C. rhizophorae* (redução de 86.6% na toxicidade original).

ABSTRACT

BIO-TREATMENT OF PETROLEUM INDUSTRY OIL WASTE BY SEQUENCING BATCH-REACTOR (SBR) AND ECOTOXICITY ASSESSMENT

Treatability of Diesel oil waste from the storage tanks of Petrobras Oil Company in Pernambuco state - Brazil, was investigated by sequencing batch bioreactor operation mode. Preliminarily, waste was compositionally and chemically characterized, and afterwards, factorial fractional designs were elaborated and executed as well as univriated experiments with the purpose of to establish optimal nitrogen source, C:N ratio; aeration condition; pH and initial waste concentration. Conditions of experiments in the bioreactor were firstly delineated conducting four single batches in order determine abiotic losses, general conditions of waste treatability, microbial growth and to verify the reproduction of the flasks experiments results. Two sequencing batches were carried out at three cycles of 110h and four cycles of 72h, respectively. The effectiveness of the process was assessed by the biodegradation rates at the end of each cycle of sequencing batches. Conditions in the 72h/cycle sequencing batch, demonstrate to be more effective in the reduction of hydrocarbons of waste. Biodegradation rates at the end of the cycles 1, 2, 3 and 4 were, respectively $0.74\%.h^{-1}$, $1.33\%.h^{-1}$, $1.06\%.h^{-1}$ and $1.04\%.h^{-1}$. Changes in the microbial community members (verified by means of DGGE of the 16s sub-unities of total rDNA), at the end of the cycle 1 and at the beginning of the cycle 2, appear to be connected to changes in the biodegradation rates. Oxygen uptake rate profile of the acclimated community sampled at the end of each cycle corroborated with the biodegradation rates ($124.9mgO_2.L^{-1}.h^{-1}$, $252.9mgO_2.L^{-1}.h^{-1}$, $120.4mgO_2.L^{-1}.h^{-1}$, and $108.8mgO_2.L^{-1}.h^{-1}$). Evaluations in ecotoxicological responses of autochthonous test-organisms (sea urchin *Echinmometra lucunter*, estuarine oyster *Crassostrea rhizophorae* and freshwater algae *Pseudokirchneriella subcaptata*) revealed the capacity of the process to reduce the toxicity of waste. Highest percentages of relative toxicity reduction were observed at the end of cycle 2 (70.1% when *E. lucunter* was tested, and 78.5% when *C. rhizophorae* was the test organism). The waste from cycle 4 did not promote toxic response to *E. lucunter* (reduction 100% of toxicity) and promoted lower toxic response to *C. rhizophorae* (reduction of 86.6% in the toxicity).

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 APRESENTAÇÃO DA TESE 20

CAPÍTULO 2 INTRODUÇÃO 28

CAPÍTULO 3 REVISÃO DA LITERATURA 32

3.1 Origem e Classificação dos Resíduos Oleosos 34

3.2 Movimentação dos Hidrocarbonetos de Petróleo nos ambientes 39

3.2.1 Hidrocarbonetos do Petróleo nos Ambientes Aquáticos 44

3.2.2 Hidrocarbonetos do Petróleo no Solo 46

3.2.3 Hidrocarbonetos do Petróleo no Ar 47

3.3 Tecnologias de Remediação 48

3.3.1 Processos Abióticos de Remediação 49

3.3.2 Processos Bióticos de Remediação 50

3.4 Microbiologia Associada à Degradação de Hidrocarbonetos 54

3.4.1 Microrganismos Degradadores de Hidrocarbonetos 54

3.4.2 Aspectos Bioquímicos da Biodegradação de Hidrocarbonetos 58

3.4.3 Aspectos Físico-químicos e Ambientais da Biodegradação de Hidrocarbonetos 63

3.4.4 Fenômenos Interfaciais 66

3.5 Estudos de Ecotoxicologia e Avaliação da Ecotoxicidade 71

3.6 Considerações Acerca da Introdução e da Revisão da 75

Literatura

CAPÍTULO 4 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 77

4.1 Objetivos Específicos 80

CAPÍTULO 5 MATERIAIS E MÉTODOS 82

5.1 Amostragem 85

5.2 Caracterização do Resíduo Oleoso 85

5.2.1 Caracterização Composicional e Físico-Química 86

5.2.2 Diversidade Microbiana no Resíduo não tratado e no Resíduo Tratado 89

5.3 Ensaios em Frascos Agitados 95

5.4 Experimentos em Biorreator 101

5.4.1 Ajustes das Condições Operacionais 102

5.4.2 Bateladas Simples e Seqüenciais 104

5.4.3 Ensaios de Respirometria 104

5.4.4 Determinações Analíticas 105

5.5 Ensaios de Ecotoxicidade 109

5.5.1 Testes com Embriões de Ouriço-do-Mar *Echinometra lucunter* (LINNAEUS, 1758) 110

5.5.2 Testes com Embriões de Ostra de Mangue *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) 113

5.5.3 Testes com Microalga Dulciaqüícola *Pseudokirchneriella subcaptata* 115

CAPÍTULO 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 117

6.1 Características do Resíduo Oleoso 119

6.1.1 Características Composicionais e Físico-Químicas 119

6.2 Experimentos em Frascos Agitados 127

6.3 Experimentos em Biorreator 140

6.3.1 Bateladas de Ajuste 141

6.3.2 Batelada simples 144

6.3.3 Bateladas Seqüenciais 147

6.4 Ensaios Respirométricos 159

6.5 Microbiota Associada ao Processo 165

6.6 Avaliação Ecotoxicológica 174

6.7 Considerações Gerais 182

CAPÍTULO 7 CONCLUSÕES E SUGESTÕES 184

CAPÍTULO 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 188

CAPÍTULO 9 ANEXOS 207

9.1 ANEXO 9.1 - Cromatogramas 208

9.2 ANEXO 9.2 - Espectro de Massa de alguns Hidrocarbonetos Identificados no Resíduo 211

9.3 Anexo 9.3 - Produções decorrentes da Tese 215

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
3.1	Fluxograma para classificação dos resíduos oleosos (CONCAWE)	36
3.2	Reações de degradação de *n*-alcanos (BAKER & HERSON, 1994)	60
3.3	Degradação do benzeno: (a) catecol e (b) protocatecolato (SEEGER *et al.* 1997)	62
3.4	Clivagem do anel: (a) Ortoclivagem (b) Metaclivagem (BAKER & HERSON, 1994)	63
3.5	Estruturas de biossurfactantes - esquerda soforolipídio; direita - raminolipídio	69
5.1	Esquema genérico do sistema de amostragem do resíduo	86
5.2	Agitador rotativo para os ensaios com frascos agitados	100
5.3	Montagem do biorreator	103
5.4	Sistema de amostragem do biorreator	106
5.5	Tensiômetro Krüss – método do anel (ASTM D - 971)	108
5.6	Obtenção FSA: Agitação em Frascos Mariott	110
5.7	Espécimes de *E. lucunter* em habitat natural, Praia da Barra (Salvador, Bahia, Brasil: 12º 97’33”S e 38º 51’33”W)	110
5.8	Embrião de *E. lucunter* (desenvolvimento normal: esquerda; desenvolvimento anormal: direita)	111
5.9	Frascos utilizados com *E. lucunter* e *C. rhizophorae*	113
5.10	Desenvolvimento normal e anormal de embriões de *C. rhizophorae*	114
5.11	Fotomicrografia de células da espécie *P. subcaptata*	116
6.1	Aspecto visual do resíduo oleoso não tratado	121
6.2	Espectro de RMN-H^+ do resíduo oleoso	122
6.3	Cromatograma da amostra de resíduo oleoso não tratado	123

(GC-FID)

6.4 Percentual de hidrocarbonetos presentes no resíduo oleoso 125

6.5 Contribuições bióticas e abióticas para a redução percentual de HTCD no experimento univariado 128

6.6 Valores observados para o FFD 2^{4-1} *versus* valores preditos pelo modelo 131

6.7 Diagrama de Pareto para o FFD 2^{4-1} 133

6.8 Valores observados para o FFD 3^{4-1} *versus* valores preditos pelo modelo 135

6.9 Diagrama de Pareto, da análise do planejamento 3^{4-1} evidenciando a contribuição do termo quadrático da agitação no processo 136

6.10 Percentual de redução de HTCD, e respectivas perdas abióticas para cada condição 137

6.11 Superfície Resposta dos HTCD para Agitação e Carga Orgânica. As variáveis pH e C:N foram fixadas em valores ótimos, 6,75 e 400:1, respectivamente 139

6.12 Superfície resposta dos HTCD para C:N e Carga Orgânica. As variáveis pH e Agitação foram fixadas em valores ótimos, 6,75 e 140rpm, respectivamente 140

6.13 Percentuais de perda abiótica nas bateladas de ajuste 143

6.14 Crescimento microbiano durante a batelada simples S_{01} 146

6.15 Aspecto da biomassa microbiana na batelada S_{01} 147

6.16 Perfil de crescimento microbiano na batelada seqüencial Sq_{01} 148

6.17 Perfil de crescimento microbiano na batelada seqüencial Sq_{02} 149

6.18 Taxas de crescimento nas bateladas sequenciais Sq_{01} e Sq_{02} 150

6.19 Eficiência de Biodegradação percentual (E_B) nas bateladas Sq_{01} e Sq_{02} 153

6.20 Eficiência de Específica de Biodegradação (E_{EB}) nas bateladas Sq_{01} e Sq_{02} 155

6.21 Taxas de biodegradação nas bateladas Sq_{01} e Sq_{02} 155

6.22 Tensão superficial da fase aquosa nas bateladas Sq_{01} e Sq_{02} 156

6.23 Meio reacional após 120 horas – SA_{01} (esquerda) e Sq_{01} (direita) 159

6.24 Perfil de consumo de O_2 a partir do inóculo aclimatado do ciclo 1 161

6.25 Perfis de consumo de O_2 dos inóculos aclimatados de todos os ciclos 162

6.26 Relação entre taxas de biodegradação e consumo de oxigênio 163

6.27 Fragmentos de rDNA em gel de agarose 167

6.28 Dendrograma - Análise da distância de ligação entre os fragmentos de 16S rDNA extraídos de amostras das diversas etapas da batelada seqüencial Sq_{02} 169

6.29 Comparação entre as Reduções percentuais da toxicidade relativa com os três organismos-teste 175

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1.1	Movimentação de gasolina e óleo Diesel pelo terminal da TRANSPETRO (01/2008 a 04/2008)	22
1.2	Volume de drenagem de claros: período de 02/2001 a 13/05/2008	22
3.1	Alguns resíduos primários gerados nas operações de E&P (API, 1997).	39
3.2	Gêneros de microrganismos degradadores (ATLAS, 1984; ENGLERT & KENZIE, 1993)	56
3.3	Solubilidade em Água de Alguns Hidrocarbonetos do Petróleo (Alexander, 1994)	67
5.1	Especificações do equipamento e condições das análises por GC-MS	87
5.2	Parâmetros para análises por GC-MS	88
5.3	Parâmetros para análises por GC-FID	88
5.4	Condições das análises de $RMNH^+$	89
5.5	Condições analíticas para análise elementar	92
5.6	Reagentes, soluções, meios requeridos para DGGE	93
5.7	Concentrações dos reagentes do PCR – 16S (U968-L1401)	96

5.8	Massas dos sais nas condições: C/N 50/1; volume de resíduo 5mL; volume útil 50mL; velocidade de agitação 250rpm e temperatura 30ºC	98
5.9	Planejamento experimental FFD 2^{4-1}: valores mínimos, centrais e máximos	98
5.10	Quantidades de meio, resíduo e NH_4NO_3 para as condições exigidas no planejamento FFD 2^{4-1}	99
5.11	Meio mineral de Büshnnell-Haas (ATLAS 1995b)	100
5.12	Variáveis e níveis estudados: Planejamento fatorial fracionado 3^{4-1}	101
5.13	Quantidades de meio, resíduo e NH_4NO_3 para as condições exigidas no planejamento FFD 3^{4-1}	103
5.14	Condições operacionais do biorreator nas bateladas de ajuste	104
5.15	Parâmetros das bateladas simples e seqüenciais	105
5.16	Condições operacionais do respirômetro	108
5.17	Validação da amostragem em biorreator	113
6.1	Porpriedades físico-químicas do resíduo oleoso	120
6.2	Identificação dos compostos por GC-MS	124
6.3	Análise elementar do resíduo oleoso não tratado	126
6.4	Valores obtidos, Médias das reduções de HTCD e das Perdas abióticas nos experimentos univariados	127
6.5	Teste t de *student* para as diferenças entre médias das reduções de HTCD de acordo com a fonte de nitrogênio	128

empregada, com 8 graus de liberdade; t_8 =2,306

6.6 Matriz experimental do planejamento $FFD2^{4-1}$ 129

6.7 Análise de variância para o FFD 2^{4-1} com R^2 = 99,40% e erro puro = 0,95 130

6.8 Valores médios observados e valores preditos pelo modelo estatístico 132

6.9 Matriz experimental FFD 3^{4-1} 134

6.10 Análise de variância para o FFD 3^{4-1} com R^2 = 90,00% e erro puro = 2,9 135

6.11 Percentuais de redução de HTCD e as respectivas perdas abióticas por experimento e perda global ($FFD3^{4-1}$) 138

6.12 Perdas abióticas observadas mediante amostragem direta no biorreator 142

6.13 Perdas abióticas observadas mediante uso de filtro 142

6.14 Biomassa nas bateladas de ajuste 143

6.15 Valores de E_B, E_{EB} e biomassa na batelada S_{01} 145

6.16 Isolados fúngicos 165

6.17 Isolados bacterianos 165

6.18 Identidade das seqüências das bandas derivadas dos fragmentos de 16S rDNA 168

6.19 Histórico das referências do *GenBank* 173

6.20 Valores de CE_{50} e UT nos testes com larvas de *E.* 176

lucunter

6.21 Percentuais de risco líquido nos testes com *E. lucunter* 179

6.22 Valores de CE_{50} e UT nos testes com embriões de C. *rhizophorae* 180

6.23 Percentuais de risco líquido nos testes com *C. rhizophorae* 181

6.24 CI_{50} e UT nos testes com *Pseudokirchneriella subcaptata* 182

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO DA TESE

Os avanços tecnológicos do final do século XIX e início do século XX trouxeram o progresso e a mudança na qualidade de vida da humanidade. Porém, concomitante com tais avanços, vieram também desafios. Com a industrialização, novos padrões de consumo foram estabelecidos, e a dependência de fontes energéticas, como os combustíveis fósseis e particularmente o petróleo, tornou-se inevitável. Os efeitos globais do acúmulo de gás carbônico resultante principalmente da queima de petroderivados, os derramamentos acidentais de óleo e a contaminação de aqüíferos, tornaram-se pauta de discussão, não mais apenas no âmbito acadêmico, mas nos diversos segmentos sociais. O destino a ser dado aos resíduos produzidos pelas atividades ligadas ao setor petrolífero é, particularmente, uma preocupação ao mesmo tempo original e recorrente. Compostos hidrocarbônicos provenientes do petróleo e derivados, quando presentes no solo, em lençóis freáticos, em ambientes marinhos e estuarinos, podem representar danos incalculáveis ao meio ambiente e às populações humanas.

A preocupação com o destino ambientalmente adequado para o resíduo gerado quando do armazenamento de óleo Diesel em tanques, tornou-se a mola propulsora do presente trabalho. Desta forma, a presente Tese de Doutorado propõe o desenvolvimento de um processo biotecnológico aplicável a uma unidade de armazenamento de combustíveis líquidos derivados de petróleo.

O objeto de estudo surgiu a partir de contatos com a unidade da Petrobras Transportes SA (TRANSPETRO) em SUAPE, Pernambuco, que nos apresentou à problemática e nos cedeu o material, bem como o acesso às informações acerca do volume de material movimentado, e às análises físico-químicas. Para o desenvolvimento da Tese, foram estabelecidas parcerias com gestores ligados ao Centro de Desenvolvimento de Pesquisas da Petrobrás Leopoldo A. Miguez de Mello (CENPES) e com o Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento (LABIOMAR) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). O CENPES, em parceria com os Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) da Escola de Química (EQ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), acumula experiência em biotratamento *ex situ* de material recalcitrante proveniente da produção e exploração de petróleo. O LABIOMAR desenvolve trabalhos no campo da ecotoxicologia marinha, dulciaqüícola e estuarina, tendo realizado recentemente trabalhos no âmbito da investigação da ecotoxicidade de diversas formulações de gasolina automotiva, e de combustíveis alternativos, como o biodiesel.

Segundo dado da Agência Nacional de Petróleo (ANP) estima-se que no ano de 2005 foram movimentadas cerca de 1.144.308 toneladas de óleo Diesel em todo o terminal de SUAPE (ANP, 2005). Particularmente, a TRANSPETRO movimentou cerca de 118.680 m^3 de óleo diesel no período de janeiro a abril de 2008, em operações de descarga e de bombeio para terceiros. Neste mesmo período, foram movimentados cerca de 236.400 m^3 de gasolina nas mesmas operações (Tabela 1.1) (SANTOS, 2008).

De acordo ainda com a gerência operacional da TRANSPETRO, as atividades de drenagem de tanques de derivados líquidos claros no ano de 2008 produziram cerca de 8.610,5 litros de resíduo drenado no período de 2 de janeiro de 2008 a 13 de maio do mesmo ano, sendo que deste total, 4.143,0 litros são provenientes de tanques de óleo diesel (Tabela 1.2).

Tabela 1.1: Movimentação de gasolina e óleo Diesel pelo terminal da TRANSPETRO (01/2008 a 04/2008)

Diesel D	Meses			
	Jan	Fev	Mar	Abr
Descarga de Navios	4.500,000	5.000,000	5.900,000	2.400,000
Bombeio para Terceiros	4.500,000	1.700,000	5.900,000	2.800,000
TOTAIS (m^3)	9.000,000	6.700,000	11.800,000	5.200,000
Diesel B	**Meses**			
	Jan	Fev	Mar	Abr
Descarga de Navios	11.400,000	13.980,000	13.500,000	7.200,000
Bombeio para Terceiros	11.100,000	9.400,000	10.100,000	9.300,000
TOTAIS (m^3)	22.500,000	23.380,000	23.600,000	16.500,000
Gasolina	**Meses**			
	Jan	Fev	Mar	Abr
Descarga de Navios	31.800,000	33.000,000	25.000,000	30.500,000
Bombeio para Terceiros	25.300,000	30.300,000	30.100,000	30.400,000
TOTAIS (m^3)	57.100,000	63.300,000	55.100,000	60.900,000

Tabela 1.2: Volume de drenagem de claros: período de 02/01/2001 a 13/05/2008

Produto	Volume drenado (litros)
Diesel D	3.916,0
Diesel B	227,0
Gasolina	4.467,5
Total Diesel	4.143,0
Total geral	8.610,5

Existem dois tanques de armazenamento de óleo Diesel de 12.600m^3 e dois outros tanques de 5.800m^3 de capacidade. A capacidade dos tanques de armazenamento e descarte (TAD) é de 9,6 m^3. Partindo

da perspectiva de duplicação dos tanques de óleo Diesel (SANTOS, 2008) e por conseqüência, da duplicação do volume médio de resíduo gerado de 4.143 litros em 4 meses para 8.286 litros, estima-se que o TAD será esvaziado a cada 3,4 meses. Projeta-se ainda, uma produção anual de resíduo de óleo Diesel de aproximadamente 24.858 litros, e de resíduo de derivados claros de aproximadamente 38.259 litros anuais.

Uma vez conhecida a problemática, foram delimitadas as estratégias para desenvolvimento do processo. Era necessário em primeira instância conhecer o resíduo nos seus aspectos químicos, físico-químicos e ecotoxicológicos. Neste ponto, cabe salientar que a efetividade do processo deverá ser evidenciada principalmente nas características ecotoxicológicas do resíduo tratado. Ao estudarmos previamente o resíduo a ser descartado, levando em conta os aspectos descritos acima, e analisando o histórico de descarte, vislumbramos a possibilidade do tratamento *ex situ* a exemplo de estudos realizados pelo CENPES e pelo LADEBIO-EQ/UFRJ. Como resultado deste estudo prévio, observamos algumas peculiaridades no resíduo: tratava-se de um material de recalcitrância moderada, evidenciada sobretudo pela presença majoritária de alcanos, porém de elevada ecotoxicidade e de características físico-químicas bastante próximas àquelas especificadas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2000) para óleo Diesel.

Por conseguinte, nos arrimamos à literatura a fim de embasarmos nosso processo nos diversos aspectos que permeiam a biodegradabilidade de compostos orgânicos presentes no petróleo. Detivemos nosso olhar sobre os processos periódicos *ex situ* em biorreatores, considerando os diversos modos de operação. Ponderamos acerca dos modos de operação em que as condições operacionais, tanto em escala de bancada quanto em escala piloto, se aproximam mais de condições realísticas. Desta forma, elegemos o modo de operação por batelada seqüencial.

As referências bibliográficas são encontradas nos Capítulos 2 e 3 da presente Tese. Embora o tema "Biodegradação de Hidrocarbonetos de Petróleo" seja recorrente, uma atualização da literatura se fez necessária. Já no que diz respeito aos resíduos provenientes de terminais de armazenamento, percebemos a escassez de referências, tendo-se que estabelecer paralelos com temas e aplicações correlatas. Observamos a diversidade de tratamentos alternativos apontados pela literatura. Trabalhos de revisão, como o de Khan & Hussein (2004), detalharam tais tratamentos alternativos expondo as vantagens e desvantagens relacionadas. As referências de Cassidy (2000) contribuíram como base de discussão acerca da relação entre os modos de operação do biorreator no tratamento de resíduos. Chamamos a atenção no Capítulo 3, para os estudos de ecotoxicidade das frações hidrossolúveis de hidrocarbonetos de petróleo, sobretudo para os estudos com organismos-testes representativos da biota local. Até então, estudos envolvendo tratamentos alternativos de resíduos oleosos realizados no Brasil têm tido como parâmetro testes ecotoxicológicos consagrados em que são utilizados organismos alóctones. Embora tais testes atendam aos diversos critérios estabelecidos para sua legitimação e confiabilidade, não são representativos dos ambientes em que ocorre o estudo. Dada a singularidade das interações ocorridas entre o poluente e o ambiente, e dada a susceptibilidade dos organismos autóctones ao poluente, os testes ecotoxicológicos que preconizam a utilização de tais organismos assumem um caráter realístico. Desta forma, nos respaldamos principalmente nos trabalhos de Nascimento *et al.* (2000), que são norteadores neste âmbito da ecotoxicologia, para avaliarmos a efetividade do nosso processo.

No Capítulo 4 expomos a justificativa da Tese e em seguida delineamos os objetivos gerais e específicos. No Capitulo 5, estão apresentados os materiais e os métodos que foram utilizados no desenvolvimento experimental.

Estrategicamente, a etapa experimental foi dividida em quatro partes, as quais se prestam a esclarecimentos específicos, que, ao seu turno, contribuem em conjunto para a elucidação de questões originais levantadas durante a formulação do trabalho.

A primeira parte da etapa experimental trata da caracterização prévia do resíduo, através de análises físico-químicas, químicas e ecotoxicológicas. Tais análises foram de suma importância, sobretudo para a configuração do biorreator a ser utilizado, e para a otimização das condições de biodegradação.

A segunda parte refere-se aos ensaios de biodegradabilidade em frascos agitados, cuja finalidade foi a de estudar os parâmetros influenciadores da biodegradação do resíduo. Nesta parte estão descritos detalhadamente os procedimentos experimentais, desde a preparação dos frascos e o planejamento estatístico até a extração e avaliação da eficiência de biodegradação dos microrganismos frente aos hidrocarbonetos do resíduo.

Na terceira parte do trabalho experimental foram realizados os experimentos em biorreator aerado e agitado. Foram conduzidas bateladas de ajuste para investigar parâmetros importantes como a perda por volatilização e a reposição de fase aquosa. Foram também realizadas bateladas simples e seqüenciais, sendo conduzido um estudo comparativo entre os modos de operação. Ainda nesta etapa, foram realizados estudos de ecologia microbiana para entender a dinâmica da microbiota presente e atuante ao longo do processo.

Por fim, a quarta parte teve como finalidade a avaliação da efetividade do processo mediante a realização de ensaios ecotoxicológicos. Estes ensaios foram realizados com organismos representativos da biota local, provenientes de ambientes estuarinos, dulciaqüícolas e marinhos.

No Capítulo 6 apresentam-se os resultados e as discussões, chamando-se a atenção para os resultados que estão relacionados à redução da carga orgânica e à diminuição da ecotoxicidade, bem como à definição das melhores condições para biodegradação efetiva, e as interconexões com as mudanças na comunidade microbiana ao longo do processo.

No Capítulo 7, são apontadas as conclusões e as proposições para trabalhos futuros, bem como as sugestões para otimização do processo de forma que seja exeqüível e viável economicamente.

Os resultados mais expressivos obtidos ao longo da execução da etapa experimental, os resultados da etapa preliminar, bem como aqueles provenientes do fechamento da Tese, propiciaram a produção de algumas publicações:

- Avaliação de Biodegradabilidade de Resíduo Oleoso, em Biorreator, por Batelada Simples e Batelada Seqüencial (Diálogos & Ciência, n. 12, v.1, dez. 2007, ISSN1678-0493). Autores: Edelvio de Barros Gomes, Nei Pereira Jr.;

- Avaliação da Eficiência do Modo de Operação de um Biorreator no Tratamento de Resíduo Oleoso (Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – XVII COBEQ 2008). Autores: Edelvio de Barros Gomes, Adriana Ururahy Soriano, Nei Pereira Jr.;

- Physical-Chemical Parameters Affecting Biodegradation of Diesel Oil Residue (Anais do "II Brazilian Symposium of Petroleum Biotechnology" – II BSPB, 2006) Edelvio de Barros Gomes, Nei Pereira Jr.;

- Biodegradation of Stored Jet Fuel by a *Nocardia sp.* Isolated From Contaminated Soil (Brazilian Archives of Biology and Technology – trabalho aceito para publicação em abril de 2008) Autores: Edelvio de Barros Gomes, Adriana Ururahy Soriano, Nei Pereira Jr.;

- Ecotoxicological Evaluation of Treated Oil Waste by Sequential Batch in Bioreactor. (Anais do II Workshop Internacional de Meio Ambiente – II WIMA 2008). Autores: Edelvio de Barros Gomes, Adriana Ururahy Soriano, Iracema Andrade Nascimento, Nei Pereira Jr.;

- Avaliação da Ecotoxicidade de Resíduo Oleoso Tratado. (Anais do XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental – XI ENAMA 2008). Autores Edelvio de Barros Gomes; Rita C. M. de Miranda; Iracema Andrade Nascimento; Nei Pereira Jr.

CAPÍTULO 2

INTRODUÇÃO

Problemas ambientais decorrentes da presença de compostos hidrocarbônicos do petróleo têm despertado a atenção de órgãos governamentais e da sociedade civil nas últimas décadas. Como se sabe descargas acidentais ou intencionais, derramamentos, vazamentos e inúmeros outros incidentes são responsáveis pela liberação e acúmulo desse material (GUPTA *et al*., 1996; TSUTSUMI, 1999). Como conseqüência, um maior número de estudos de caso surge a cada incidente, haja vista que, paralelamente à preocupação com a segurança operacional, existe também o interesse no desenvolvimento de tecnologias mitigadoras dos danos ambientais causados pela presença destes compostos.

Dentre as diversas técnicas empregadas com o intuito de mitigar os danos ao ambiente causados por compostos de petróleo, as de natureza biotecnológica surgem como alternativas que representam maior compatibilidade ambiental, podendo levar à recuperação do ambiente com a minimização da toxicidade. As técnicas de natureza biotecnológica se baseiam na capacidade de microrganismos ou produtos biotecnológicos degradarem esses compostos orgânicos, sob determinadas condições. Assim sendo, lançam mão de conhecimentos nos ramos da engenharia química, da química e da microbiologia, para sua efetivação.

Em termos práticos, na ocorrência de um incidente como derramamento ou vazamento de óleo, as primeiras providências a serem tomadas são de natureza física (geralmente, remoção mecânica). Em seguida, podem ser utilizados produtos químicos (surfactantes químicos) para dispersão do óleo (GLAZER & NIKAIDO, 1995). Em tese, as técnicas biotecnológicas são utilizadas num terceiro momento, para a biotransformação do material restante, podendo chegar à mineralização, fenômeno caracterizado pela conversão dos hidrocarbonetos em gás carbônico (CO_2) e água. Tais técnicas podem ser *in situ*, ocorrendo no local, a exemplo da atenuação natural e do bioaumento; e *ex situ*, onde o material é tratado fora do local. Nestes casos, são utilizadas biopilhas e biorreatores.

O emprego de biorreatores ocorre principalmente quando da necessidade do tratamento de material líquido armazenado em tanques intermediários, ou quando da necessidade do tratamento de lodos e borras de produção. Para estas finalidades, diferentes modos de operação de biorreatores têm sido estudados, tanto em escala de bancada como em escala piloto. Sistemas operados por batelada simples, bateladas seqüenciais, bateladas alimentadas, processos contínuos e biorreatores em série, são exemplos dos mais amplamente estudados. Os modos operacionais influenciam sobremaneira na eficiência do processo de degradação do poluente. Considerações importantes devem ser feitas

quando da escolha do modo de operação. A natureza do resíduo poluente também deve ser levada em consideração. Por exemplo, um sistema utilizado para tratar um poluente que seja tóxico a baixas concentrações pode atingir baixas taxas de degradação se o processo for conduzido por batelada simples. Já o modo de operação por batelada seqüencial, preconiza alimentação do biorreator com quantidade fixa de material, e logo após um dado período de tempo (período de reação) ocorre a descarga do material tratado e a adição de uma nova carga na mesma quantidade inicial, propiciando uma maior exposição da microbiota à toxicidade do resíduo e possibilitando a ocorrência de aclimatação. Esse modo parece ser mais interessante, sobretudo quando se deseja avaliar a biodegradação do resíduo a cada período de reação ou ciclo.

Os trabalhos de Cassidy *et al*. (2000) e Cassidy & Hudak (2001) são reveladores no que concerne à investigação da eficiência de biorreatores operando em modo contínuo e por batelada seqüencial, no tratamento de sedimento contaminado com óleo Diesel. Estes autores mostram as vantagens associadas aos dois modos de operação, chamando a atenção para a capacidade de remoção da carga orgânica associada aos requerimentos operacionais de cada modo de operação.

Periodicamente os tanques dos terminais de armazenamento e distribuição necessitam ser esvaziados e limpos a fim de manter a integridade do produto comercial. O resíduo de fundo de tanque é um material bastante recalcitrante, cuja suscetibilidade à biodegradação tem relação direta com a natureza do petróleo ou do derivado armazenado. Aliado a este fato, estão os fatores físicos, químicos e biológicos que produzem mudanças nas propriedades intrínsecas do produto comercial. Genericamente, há nesse material residual grande quantidade de substâncias formadas por processos de complexação, oxidação, polimerização de grupos terminais de cadeias hidrocarbônicas e interações químicas entre esses hidrocarbonetos. São encontrados neste resíduo, compostos de reconhecida toxicidade, situados entre os mais perigosos

que apresentam genotoxicidade, fetotoxicidade e ecotoxicidade (IRWIN *et al.* 2001; EPA, 1997).

Desta forma, as atenções são voltadas para um destino mais adequado para os resíduos de fundo de tanque. Processos biotecnológicos *ex situ* podem apresentar uma alternativa ambientalmente correta. Embora careçam de estudos econômicos mais aprofundados, trabalhos nesse campo têm suscitado a elaboração de sistemas fechados de tratamento de resíduos.

CAPÍTULO 3

REVISÃO DA LITERATURA

A pesquisa no campo do biotratamento de sítios contaminados por petróleo, derivados, e resíduos oriundos das atividades ligadas ao setor petrolífero tem ocupado espaço considerável na academia nas últimas três décadas. Não obstante o grande número de publicações recentes (décadas de 1990 e de 2000), as primeiras revisões podem ser encontradas já no final da década de 1940, suscitando a potencialidade microbiana na degradação de hidrocarbonetos de petróleo, a exemplo da revisão de Zobel, datada de 1947 (ZOBEL *apud* URURAHY, 1998).

No decurso da década de 1970, mais trabalhos relacionados ao tema surgem explorando o fenômeno da biodegradabilidade e vislumbrando o uso de técnicas de remediação que se utilizam de princípios biotecnológicos (ATLAS & BARTHA, 1970; DAVIS *et al*., 1970; FLOODGATE *et al*., 1971; CUNDELL & TRAXLER, 1973; CUNDELL & YOUNG, 1975; DAVIS & GIBBS, 1975; GIBBS, 1976; MILNER *et al.*, 1977).

Na década de 1980, despontam trabalhos que arrecadam informações preciosas do ponto de vista bioquímico, geológico e analítico. Atlas (1984), em sua obra *Petroleum Microbiology*, reúne as principais publicações escritas até então, enfocando os aspectos físico-químicos e microbiológicos relacionados à degradação do petróleo, bem como o comportamento dos hidrocarbonetos de petróleo nos diversos ambientes, sua dinâmica e distribuição. Trabalhos como os de Sassen, 1980; Keck *et al*.,1989; Scherrer & Mille, 1990; Oudot *et al*., 1989; Oudot & Dutrieux, 1989; Mackay & McAullife, 1987; Mille *et al*., 1989; Okpokwasili & Amanchukwu, 1988, mostram os avanços nos conhecimentos das tecnologias de biorremediação a partir das simulações em laboratório e projeções. Bonnamy *et al*., (1987) estudam mudanças microtextuais e estruturais em asfaltenos provenientes de óleos betuminosos, as quais são associadas à biodegradação. Spaulding (1988) em sua revisão enfoca a trajetória de tipos diferentes de óleos nos ambientes, enquadrando este deslocamento num modelo matemático que inclui os fatores abióticos e bióticos, atentando, sobretudo para a biodegradação.

Por fim, verifica-se que a maior parte dos trabalhos surgidos nas décadas de 1990 e de 2000, abaliza a utilização de biotratamentos e ratifica sua efetividade na mitigação da contaminação por resíduos. Destacam-se aqueles trabalhos que se baseiam em estudos de caso, simulações em campo e em laboratório (GUPTA *et al*., 1995; CHO *et al*., 1997a; CHO *et al*., 1997b; IJAH, 1998; TSUTSUMI, 2000; TAM *et al*., 2002; GARY *et al*., 2003). Atenção especial deve ser dada à revisão de Khan *et al*., (2004). Neste trabalho, os autores avaliam uma variedade de tecnologias de remediação (de natureza física e biotecnológica) disponíveis e discutem as limitações e vantagens de cada uma, bem como apontam para a possibilidade de sua utilização em conjunto no intuito de otimizar o processo de descontaminação do ambiente poluído.

É partindo dessa perspectiva, e com esse arcabouço teórico, que os trabalhos contemporâneos no âmbito da biorremediação e dos

biotratamentos de materiais recalcitrantes e xenobióticos, ganham força e base de sustentação para atingirem seus objetivos e reafirmarem suas particularidades.

Desta forma, a presente Tese utilizou-se desse legado para fundamentar seu referencial teórico, levando em conta os aspectos supracitados *en passant*, e trazendo outros aspectos originais a serem abordados, mediante a observância de correlações existentes com trabalhos contemporâneos, para que as discussões levantadas aqui sejam conduzidas a contento e para motivar a proposição de trabalhos futuros.

A presente revisão da literatura está dividida de forma esquemática, trazendo ao conhecimento as considerações mais importantes sobre o tema, em concordância com os objetivos desta Tese (ver capítulo 4). Primeiramente, esta revisão se detém aos estudos dos aspectos relevantes relacionados aos resíduos oleosos: suas características, composição e classificação; em seguida, apresenta os fatores influenciadores da movimentação dos hidrocarbonetos de petróleo nos ambientes. Na secção seguinte, explana sobre as tecnologias de remediação existentes, quer sejam de origem biótica ou abiótica. Por fim, estão expostas nas duas últimas secções, as bases conceituais concernentes aos estudos da microbiologia associada à degradação de hidrocarbonetos, e aos estudos de ecotoxicologia e ecotoxicidade.

3.1 Origem e Classificação dos Resíduos Oleosos

Muito embora os termos "**borra oleosa"** e "**resíduo oleoso"** tenham sido utilizados amiúde como sinônimos, as definições para ambos carecem de maior detalhamento, necessitando-se de um limite conceitual claro entre eles. São designados usualmente como **borras de petróleo**, **borras oleosas** ou simplesmente **borras,** os resíduos oleosos altamente recalcitrantes gerados nas atividades de refino, transporte, exploração e produção (E&P), que apresentam larga variabilidade composicional e, freqüentemente, alta toxicidade (URURAHY & PEREIRA Jr., 2006). O termo

borra oleosa também tem sido empregado em alguns casos para mencionar os resíduos encontrados nos fundos de tanques de armazenamento de derivados de petróleo. Entretanto, o termo **resíduo oleoso** parece ser mais abrangente, por designar, além dos resíduos descritos anteriormente, a água oleosa encontrada em separadores de água-óleo (SAO) dos terminais de armazenamento (ABNT, 1984).

Segundo especificações do órgão Europeu para a Conservação da Água e do Ar (CONCAWE) e da Agência Ambiental Inglesa (*Environmental Agency* - EA), os **resíduos oleosos** podem ser classificados em grupos distintos dependendo do produto e do tipo de processamento que os gerou. Esta divisão em grupos é importante, sobretudo quando não se tem em mão ou não se conhecem os dados de toxicidade referentes aos componentes do resíduo, mas se conhece pelo menos a fração do destilado que o gerou. Deste modo, os resíduos oleosos podem ser classificados como resíduos de naftas, de gasolinas, querosenes ou de óleo diesel, dentre outros, desde que tenham sido gerados na produção ou armazenamento destes produtos. Por conseguinte, serão categorizados quanto à sua periculosidade, carcinogenicidade e ecotoxicidade, recebendo a mesma nomenclatura e codificação que é dada aos respectivos produtos que os gerou. A Figura 3.1 mostra os passos seguidos para a determinação da periculosidade do resíduo oleoso, com base nas listas de classificação de risco e periculosidade dos produtos de petróleo da CONCAWE (CONCAWE apud Environmental Agency, 2007).

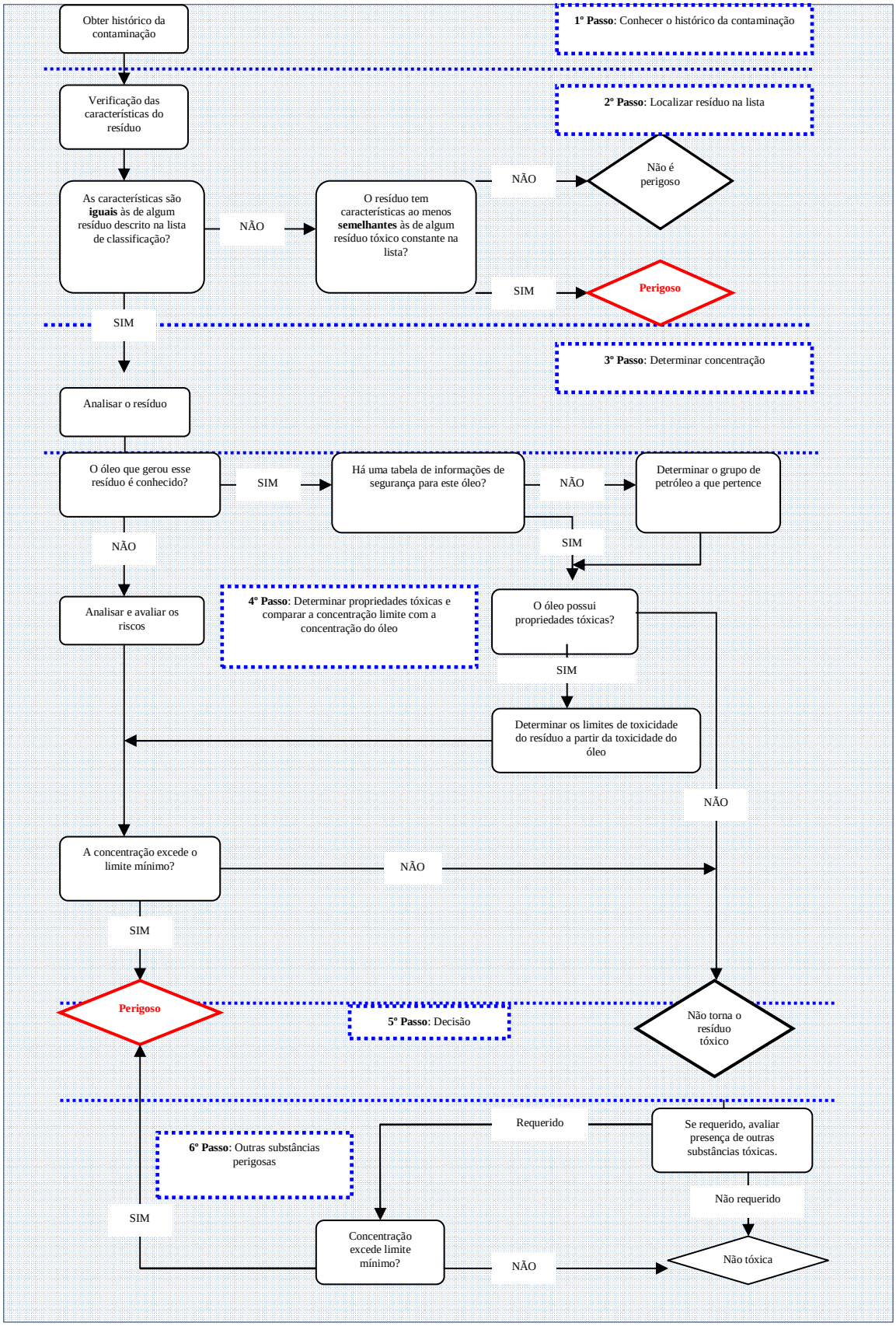


Figura 3.1: Fluxograma para classificação dos resíduos oleosos (CONCAWE)

O Instituto Americano do Petróleo (*American Petroleum Institute* API) catalogou alguns resíduos oleosos numa extensa lista, publicada em 1997 (API, 1997; API, 2001) a qual se baseia em fases operacionais específicas, como: (1) exploração, (2) perfuração, (3) finalização, (4) produção de campo, e (5) planta de gás. A tabela 3.1 mostra algumas destas operações e os respectivos tipos de resíduos primários gerados.

No Brasil, os resíduos oleosos são enquadrados na categoria de **resíduos sólidos** segundo consta na norma brasileira de referência NBR 10.004 de setembro de 1984, publicada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1984). De acordo com esta norma, os resíduos sólidos são definidos como "... *resíduos nos estados sólidos, semi-sólido, que resultam de atividades da comunidade de origem: industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e varrição. Ficam incluídos nesta definição os lodos provenientes de sistemas de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos de água, ou exijam para isso soluções técnica e economicamente inviáveis em face a melhor tecnologia disponível*...". Mais especificamente, esta norma inclui os resíduos oleosos na classe I, na qual estão relacionados os resíduos descritos como "*... aqueles que em função de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade e patogenicidade, podem apresentar risco à saúde pública, provocando ou contribuindo para o aumento de mortalidade ou incidência de doenças e/ou apresentar efeitos adversos ao meio ambiente, quando manuseados ou dispostos de forma inadequada*...". Esta classificação, embora seja bastante usual no Brasil, apresenta controvérsias quando se trata de borras de refino de petróleo podendo ser classificados por alguns autores como classe II (URURAHY & PEREIRA Jr., 2006).

Tabela 3.1: Alguns resíduos primários gerados nas operações de E&P (API, 1997)

Exploração	Perfuração	Finalização	Produção	Operação de planta de gás
▪ Fluido hidráulico ▪ Lodo ▪ Solos contaminados ▪ Solventes (Nafta de petróleo) ▪ Água de lavagem	▪ Fluidos de tratamento de poços ▪ Fluidos de perfuração ▪ Fluidos hidráulicos ▪ Areia de produção ▪ Água de produção ▪ Solos contaminados ▪ Solventes ▪ Resíduo de hidrocarbonetos	▪ Fluidos de tratamento de poços ▪ Lodos de "pitting" ▪ Areia de produção ▪ Água produzida ▪ Resíduo de óleo cru/ condensado ▪ Cortes de perfuração ▪ Fluidos de perfuração ▪ Fluidos hidráulicos ▪ Materiais radioativos naturais ▪ Fluidos de empacotamento ▪ Parafinas ▪ Solos contaminados ▪ Solventes ▪ Resíduo de hidrocarbonetos	▪ Catalisadores ▪ Resíduos de limpeza de equipamentos ▪ Fluidos de tratamento de poços ▪ Torre de resfriamento ▪ Resíduos de óleo cru /condensados ▪ Fluidos hidráulicos ▪ Mercúrio líquido metálico ▪ Sólidos de mercúrio ▪ Material radioativo ▪ Solos contaminados ▪ Lodos de "pitting" ▪ Areia produzida ▪ Água produzida ▪ H_2S ▪ Solos contaminados ▪ Solventes ▪ Fundos de tanques ▪ Parafinas ▪ Resíduos de "pigging" ▪ Dióxido de enxofre ▪ Resíduos de tubulação ▪ Resíduo de hidrocarbonetos	▪ Catalisadores ▪ Resíduos de limpeza de equipamentos ▪ de poços ▪ Torre de resfriamento ▪ Resíduos de óleo cru /condensados ▪ Filtros ▪ Fluidos hidráulicos ▪ Mercúrio líquido metálico ▪ Sólidos de mercúrio ▪ Material radioativo ▪ Solos contaminados ▪ Lodos de "pitting" ▪ Areia produzida ▪ Água produzida ▪ Solos contaminados ▪ Solventes ▪ Resíduos de "pigging" ▪ Dióxido de enxofre ▪ Resíduos de tubulação / equipamentos ▪ Resíduo de hidrocarbonetos

3.2 Movimentação dos Hidrocarbonetos de Petróleo nos Ambientes

O petróleo é constituído por uma mistura complexa de compostos orgânicos como olefinas, n-alcanos, parafinas ramificadas, parafinas cíclicas, compostos aromáticos e alguns compostos oxigenados e sulfurados. Contudo, os hidrocarbonetos são majoritários. A fração líquida total do petróleo é denominada de óleo cru, a qual é constituída de quatro classes principais de hidrocarbonetos: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos (FLOODGATE, 1984; WALTER, 1997; GLAZER & NIKAIDO, 1995; ATLAS, 1995a). Em linhas gerais, o Instituto Americano do Petróleo (API), classifica os hidrocarbonetos do petróleo em dois grandes grupos: saturados e insaturados. Os saturados são referidos também como alcanos ou parafinas. Entre eles encontram-se os alcanos de cadeia aberta ou *n*-alcanos, os de cadeia ramificada ou isoalcanos e os cíclicos ou cicloalcanos. Entre os insaturados há duas subclasses, os aromáticos e os olefínicos (API, 2001).

Não obstante sua origem biogênica, que remonta do período permiano, a partir de organismos presentes em mares rasos, as características originais do petróleo foram modificadas ao longo dos séculos por processos geológicos, e nos últimos dois séculos por ações antrópicas. Estas ações, particularmente, embora ocorridas num curto período na escala geológica de tempo, têm sido responsáveis pela aceleração da formação de novos compostos que são lançados no ambiente e que, por sua vez, são mais recalcitrantes e tóxicos que os compostos de origem (ATLAS & BARTHA, 1972; ATLAS, 1995a; ATLAS, 1995c).

A natureza química da fonte hidrocarbônica poluente e as peculiaridades do ambiente em que ela se encontra, são responsáveis pela extensão e velocidade da contaminação, pela dispersão do poluente, e pelos danos causados aos ecossistemas. Assim, ambientes diferentes, respondem de forma diferente a um mesmo contaminante, bem como um

mesmo ambiente responde de formas diferentes a diferentes contaminantes.

É sabido que a movimentação da mistura hidrocarbônica no ambiente constitui num aspecto importante na avaliação dos riscos ambientais. É essa movimentação que irá resultar na exposição dos seres humanos ou do ambiente às substâncias químicas danosas presentes. Algumas características físico-químicas dos hidrocarbonetos têm efeito direto sobre sua movimentação no meio ambiente. As mais influentes são:

i) Solubilidade em água – Esta propriedade é talvez o mais importante fator determinante do transporte de hidrocarbonetos nas águas residuárias e nas águas superficiais;

ii) Volatilidade – a volatilidade dos hidrocarbonetos é determinante da movimentação dessas substâncias através do ar atmosférico e gases em geral;

iii) Densidade – a densidade de um hidrocarboneto ou de uma mistura de hidrocarbonetos representa a quantidade dessas substâncias presente na mistura, e pode ser expressa em API, unidade que representa a medida da massa específica do hidrocarboneto. A densidade em API é inversamente proporcional à massa específica a 60ºF (15ºC) e é expressa por um número constando de um a dois dígitos, tendo como unidade o grau API (ºAPI). No Brasil, a unidade utilizada para representar a densidade ou massa específica dos hidrocarbonetos de petróleo é o quilograma por metro cúbico (kg/m^3) ou o grama por centímetro cúbico (g/cm^3) (ANP, 2000). Como ponto de referência, a água possui densidade 10º API;

iv) Viscosidade – Este parâmetro representa a medida da resistência interna de um fluido ao seu escoamento. Materiais altamente viscosos, com viscosidade maior que a da água, não escoam facilmente sob força

da gravidade, ao contrário da água. A viscosidade de um fluido tende a decrescer com o aumento da temperatura;

v) Ponto de orvalho: representa a temperatura abaixo da qual um determinado óleo não escoa de modo bem definido. O ponto de orvalho ocorre a partir da precipitação de parafinas, onde uma espessa massa interligante é formada. Óleos isentos de parafinas, por exemplo, possuem ponto de orvalho dependente apenas da viscosidade, tendendo a se solidificar, formando um material vítreo, na medida em que a temperatura diminui e a viscosidade aumenta. Ao contrário, muitos óleos crus com altas concentrações de parafinas, podem apresentar-se como sólidos já a temperaturas em torno dos 32ºC (API, 2001; PLICE, M. J., 1948; WSPA, 1993).

A movimentação de uma mistura hidrocarbônica líquida no ambiente, logo dependerá da interação entre estes cinco principais parâmetros supracitados. A liberação de hidrocarbonetos líquidos na superfície de um solo insaturado, por exemplo, pode resultar na migração vertical (percolação) atingindo prontamente o lençol freático. Este movimento vertical é influenciado pela densidade, viscosidade e pelo ponto de orvalho da mistura hidrocarbônica. Em outros exemplos, óleos com elevados pontos de orvalho podem apresentar-se muito viscosos e com pouca mobilidade no solo em um ambiente de clima frio, mesmo que sua baixa densidade sugira que esta movimentação seja rápida. Quando na mistura hidrocarbônica existem compostos voláteis, estes podem ser liberados no espaço de vapor existente entre os poros do solo. Se essa liberação ocorre numa magnitude suficientemente grande, os hidrocarbonetos líquidos podem atingir rapidamente a lâmina capilar sobre o lençol freático, e se espalhar horizontalmente. A extensão desse espalhamento é inicialmente controlada pela saturação e permeabilidade relativa na sub-superfície do solo. Entre outras interações, há de se considerar a solubilidade das substâncias que chegam ao lençol freático. Também fica claro que essas relações não estão totalmente estabelecidas

e que muitas propriedades apresentam comportamentos diferentes do esperado, sendo necessário estudo detalhado de cada caso (API, 2001; API 2000a; API, 2000b).

Como conseqüência da composição química, os diferentes grupos de hidrocarbonetos de petróleo apresentam peculiaridades quanto à disposição nos ambientes. De tal modo, frações distintas do petróleo, como os óleos crus, os produtos refinados, os condensados e os resíduos oleosos, por apresentarem proporções diferentes de grupos de hidrocarbonetos em sua composição, movimentam-se de maneiras singulares nos ambientes.

Desta forma, antes de descrevermos as singularidades das maneiras como os hidrocarbonetos se deslocam em diferentes ambientes, vamos classificar e descrever sucintamente as frações de petróleo, de acordo com a API:

i) Óleos Crus - Em 1993, a *Western States Petroleum Association* dos Estados Unidos (WSPA) em estudo comparativo, relacionou as características físico-químicas de diferentes óleos crus, gasolinas e óleos Dieseis, às suas características ambientais (WSPA, 1993). Alguns óleos crus, por exemplo, são menos densos que a água (densidade em torno de 0,85g.cm^{-3} a 0,98g.cm^{-3}). Devido à grande diversidade entre os óleos crus, a densidade pode ter variações significativas. Valores típicos de densidade variam entre 10 e 45º API. Os óleos apresentam-se em geral como líquidos viscosos a temperaturas e pressões de superfície com ponto de orvalho tipicamente alto a temperaturas mais baixas. A temperatura e o ponto de orvalho são extremamente importantes devido à sua implicação direta na fluidez, influenciando na percolação através do solo.

ii) Produtos Refinados - Os produtos refinados derivados dos óleos crus possuem densidade menor que 1,0g.cm^{-3} (ou entre 15 e 62ºAPI). As solubilidades desses produtos em água tendem a aumentar com o aumento do seu grau API, como exemplificado na escala de solubilidade: Gasolina > querosene > diesel nº2 > óleo combustível nº2 > óleo combustível nº6. A viscosidade dos produtos refinados aumenta em função da massa molecular e do ponto de ebulição, aumentando da gasolina (menor viscosidade e ponto de ebulição) para o óleo lubrificante (maior viscosidade e ponto de ebulição). O ponto de orvalho dos refinados depende da fração parafínica do óleo cru, embora, geralmente, o ponto de orvalho aumente junto com a viscosidade.

iii) Condensados – Embora não exista muita informação disponível sobre as propriedades físico-químicas dos condensados, estas misturas hidrocarbônicas em geral apresentam densidade API maior que 45º. Esta informação sugere que estes produtos não são muito viscosos à temperatura ambiente, e que são relativamente voláteis e solúveis em água. Ao mesmo tempo, dados composicionais em um levantamento realizado com quatro tipos diferentes de condensados, revelaram a presença de alcanos de alta massa molecular (HAWTHORNE & MILLER, 1998). A presença desses alcanos tende a aumentar a densidade e a viscosidade, e diminuir a solubilidade e a volatilidade da mistura hidrocarbônica.

iv) Resíduos de Exploração e Produção (E&P) e Resíduos de Refinados – Devido à natureza composicional diversificada dos resíduos de E&P, torna-se praticamente impossível uma avaliação de suas propriedades físico-químicas puras, como é observado para os óleos crus e para os produtos refinados. A maioria desses resíduos consiste de uma matriz sólida ou líquida contendo hidrocarbonetos

originados de óleo cru ou de gás natural. Nestes casos, o objeto de investigação passa a ser a tendência que esses hidrocarbonetos têm, de serem liberados a partir dessa matriz complexa para o ambiente. As propriedades físicas de importância, relacionadas às substâncias químicas presentes no resíduo são: a) sorção/dessorção; b) solubilidade; c) volatilidade e; d) saturação do solo. Além destas propriedades, deve-se observar também, aquelas inerentes à matriz na qual o resíduo está agregado, a exemplo de alguns tipos de solos que podem estabelecer maior força de ligação com determinados compostos do que com outros (AMELLAL, 2001; WSPA, 1993). Os Resíduos de Produtos Refinados apresentam propriedades físicas diretamente relacionadas às do produto original. Portanto, resíduos de óleo diesel ou gasolina, terão propriedades semelhantes às da gasolina ou do óleo diesel que os originou. Como conseqüência, uma vez que não haja alterações significativas na composição, o deslocamento dos hidrocarbonetos presentes nesses resíduos estará susceptível aos mesmos princípios físico-químicos que determinam o deslocamento dos produtos refinados ou mesmo dos óleos crus originais.

3.2.1 Hidrocarbonetos do Petróleo nos Ambientes Aquáticos

Devido ao espalhamento lateral do óleo, à dificuldade de sua contenção na superfície da água e aos danos causados a biota marinha, maior atenção tem sido dada à remediação de ambientes aquáticos. Nestes ambientes, o petróleo provoca a morte de peixes, aves marinhas e outras formas de vida. O óleo derramado pode permanecer por mais ou menos tempo numa determinada área, dependendo da corrente marinha, da sua composição e de uma série de fatores, tais como:

Fatores físicos - sendo um dos mais importantes a turbulência da água; Fatores químicos – especial atenção é dada ao fenômeno da fotodecomposição, e fatores biológicos, sobretudo a biodegradação.

Esse conjunto de fatores e condições determinará o percurso do petróleo e seus derivados no mar, bem como seu grau de ecotoxicidade e seu tempo de persistência no ambiente marinho (ATLAS, 1984).

As águas dos mares e oceanos são constituídas de uma mistura complexa de sais cuja concentração varia de acordo com a estação do ano e a região geográfica. Esta variação associada à degradação química e física do petróleo contribui para a formação de centenas de compostos complexos, com graus específicos de toxicidade e recalcitrância (FLOODGATE, 1984).

Descargas de óleo no mar, apesar de serem quase sempre em maior quantidade do que em terra, são mais susceptíveis à biodegradação. Devido ao menor tempo de residência das águas dos mares, o óleo nessas áreas tem mais facilidade de ser biodegradado do que em áreas próximas a estuários, onde o tempo de residência das águas é bem maior, causando maiores danos à biota local. O aporte de minerais e de oxigênio, que são fatores de elevada importância na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, estão diretamente relacionados ao tempo de residência da água (ATLAS, 1981a; ATLAS, 1981b; ATLAS, 1984; ATLAS, 1995a).

Grande parte das descargas de petróleo e de seus derivados se dá por lavagens de tanques de navios em alto mar. Após a descarga do produto, os tanques são cheios com a água do mar, para que seja mantida a estabilidade do navio. Antes de fazer uma nova carga com produto, essa água de lavagem é descartada no mar, e com ela são descartadas algumas dezenas de milhares de litros de petroderivados. Outra forma, bem mais drástica, se dá pelo vazamento de produto por naufrágios, decorrentes de rupturas na estrutura do navio. Em regiões

próximas a terminais portuários, a possibilidade de ocorrer derrames devido às falhas operacionais é bastante freqüente (LEVY *et al*, 1981; WHYTMAN *et al*, 1975).

O petróleo é encontrado no ambiente marinho em quatro estados: filme, solução, emulsão e em grumos. Muitos tipos de óleos são espalhados rapidamente e reduzidos a uma camada muito fina. A espessura dessa camada numa área de águas paradas dependerá da taxa de evaporação, da tensão superficial do óleo e da água do mar neste local. O acúmulo de hidrocarbonetos nesta camada, afeta diretamente a vida marinha que se encontra imediatamente abaixo dela (ATLAS, 1984). Os grumos são encontrados em tamanhos variados, sendo depositados no fundo do mar devido ao seu peso, e essas partículas se acumulam e se complexam, formando uma camada de material altamente recalcitrante (MARTY & SALIOT, 1976).

Nos rios e lagos, o petróleo e seus derivados podem persistir por mais tempo, dependendo da natureza do óleo e da sua composição, além do tempo de residência da água, que nesses casos é bem maior que nos mares e oceanos. Por exemplo, os óleos leves, que são ricos em material tóxico constituído por aromáticos voláteis, permanecem menos tempo que os óleos pesados e os combustíveis marítimos. O óleo cru, por sua vez, é menos susceptível a degradação do que os seus derivados (ATLAS & BARTHA, 1972).

3.2.2 Hidrocarbonetos do Petróleo no Solo

Sabe-se que no solo, o óleo além de sofrer processo de fotodecomposição, percola e pode atingir o lençol freático. Em ambientes terrestres a distribuição dos derivados líquidos de petróleo é pontual, com espalhamento lateral pouco extenso e de fácil controle. A área atingida no solo é bem pequena quando comparada à área de mesma quantidade de poluente derramado no mar ou mesmo em lagoas.

Os principais problemas da contaminação em solo estão relacionados ao espalhamento vertical (percolação), devido ao constante risco de atingir o lençol freático (CORSEUIL *et al* 1997). A natureza físico-química do solo e o tamanho de suas partículas influenciam diretamente na percolação e na degradação do poluente. Frações de argila e silte-argila, por exemplo, são mais susceptíveis à formação de complexos com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que as frações de areia. Tal fenômeno se deve não somente à granulometria, mas também à presença de argilo-minerais (filossilicatos) que são capazes de formar complexos com substâncias cíclicas de baixa massa molecular e alquil-substituídas (AMELLAL *et al.*, 2001; NOCENTINI *et al.,* 2000; IJAH, 1998; IJAH & ANTAI, 2003).

3.2.3 Hidrocarbonetos do Petróleo no Ar

No ar, os hidrocarbonetos de petróleo podem ser encontrados como pequenas partículas dispersas, ou como componentes de material particulado complexo. Sua concentração é variável, porém em áreas próximas a fontes fixas de contaminação, tende a ser maior.

Em especial, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) têm sido bastante estudados quanto à sua dispersão e ocorrência. Um dos mais importantes fatores de risco que deve ser levado em conta quando se pensa em contaminação do ar é a exposição aos carcinogênicos levados pelo ar, como os HPA, que geralmente ocorrem próximo aos pontos de emissão como automóveis, indústria de refino, transporte de petróleo e derivados, sobretudo de querosene de aviação (KANIKKANAN, 2004). O nível de exposição aos HPA emitidos por estas fontes é baixo quando comparado com outras fontes, como tabaco por exemplo. A meia vida dos HPA espalhados pelo ar é da ordem de dias, mas pode ser maior quando os HPA são associados ao material particulado do ambiente. O material particulado poluente do ar é formado por uma mistura complexa e

heterogênea de compostos (metais, sais, material carbônico, compostos orgânicos voláteis, HPA) e componentes biológicos (bactérias, endotoxinas, fungos) que podem ser acoplados ao centro hidrocarbônico, que serve como um núcleo de condensação (BILLET *et al*., 2008).

Zhu *et al*. (2008) verificam que os HPA formando particulados complexos são mais danosos para os seres humanos do que as frações isoladas desses hidrocarbonetos. Isto se deve ao fato de que os HPA de alta massa molecular são predominantes na fase particulada.

Outra fonte importante de contaminação do ar atmosférico nas metrópoles é o gás liquefeito de petróleo – GLP, que consiste em uma mistura em proporções variáveis de propano e butano. Gasca *et al*. (2004), estudando as concentrações de GLP na região metropolitana da cidade do México, correlacionam o aumento na concentração de GLP com o aumento da produção de ozônio na mesma região.

3.3 Tecnologias de Remediação

Uma grande variedade de tecnologias utilizadas na remediação de ambientes impactados por petróleo e seus derivados, é conhecida. Diante de um acidente envolvendo a liberação de grandes quantidades de petróleo ou produtos derivados, as medidas tomadas inicialmente são de natureza física, através de remoção mecânica do óleo. Em seguida, utilizam-se substâncias químicas capazes de dispersar o contaminante, os surfactantes químicos. Em última instância, lança-se mão das medidas de natureza biológica, mediante o emprego de técnicas biotecnológicas.

A biorremediação é um conjunto de técnicas biotecnológicas em que se utilizam microrganismos ou produtos e processos microbianos para a redução de impactos causados ao meio ambiente por contaminantes (ATLAS, 1995a).

Em muitos casos é comum utilizar tecnologias de biorremediação concomitantemente com outras tecnologias de remediação. É preciso conhecer a natureza química bem como as características físico-químicas do contaminante e as características do ambiente contaminado. Assim cada ambiente contaminado requer uma combinação de procedimentos que permitam a otimização do processo de remediação. Todas essas tecnologias que utilizam os princípios biológicos, físicos ou químicos podem ser utilizadas conjuntamente para reduzir a contaminação a níveis seguros e aceitáveis.

3.3.1 Processos Abióticos de Remediação

Os processos abióticos de descontaminação de áreas poluídas são definidos como aqueles que envolvem métodos químicos ou físicos de remoção de poluentes. Os métodos químicos mais comuns são: a neutralização, a precipitação, oxidação, aplicação de surfactantes e a extração por solventes (KOVALICK, 1991; PIÑA *et al*., 2002; YERUSHALMI *et al*., 2003). Há de se ressaltar ainda a remoção por separadores de água e óleo, que é um método mecânico simples baseado na diferença de densidade entre a água e a fase oleosa apolar (MAIER 1999).

Alguns processos abióticos ocorrem naturalmente, não dependendo de aplicação de métodos físicos ou químicos, como é o caso da evaporação. A fotoxidação ou fotodecomposição é outra forma natural de atenuação do poluente, que é observável em locais contaminados, sendo esse processo o responsável pela transformação do petróleo em ambientes aquáticos (PATEL *et al*., 1979; FERNANDES, 1994).

3.3.2 Processos Bióticos de Remediação

Entende-se por processo biótico de remediação de poluentes, a biorremediação. Quanto ao local onde ocorre, o processo de biorremediação pode ser classificado como:

Biorremediação *in situ* – é o tipo de biorremediação que ocorre no local onde houve o derrame e os microrganismos presentes no sítio poluído conduzem o processo de biodegradação. Pode ocorrer com a adição de nutrientes para aumentar a velocidade de biodegradação, sendo esse procedimento chamado de bioestimulação, ou com a adição de microrganismos exógenos à microbiota nativa, o bioaumento. Exemplo: bioventing (WALTER, 1997; KOWALICK, 1991).

Biorremediação *ex situ* – modalidade de biorremediação que envolve a remoção do material contaminado para outra área na qual este é tratado. Exemplos: biorreatores (GLAZER & NIKAIDO, 1995; ALEXANDER, 1994; IJAH & ANTAI, 2003).

Em uma revisão recente, Khan *et al.* (2004) mostram algumas tecnologias de remediação que utilizam processos bióticos, abióticos ou ambos, e discutem as vantagens e desvantagens associadas. Destacamos aqui algumas dessas tecnologias:

- Lavagem de solo

Baseia-se na utilização de líquidos (em geral água, ocasionalmente combinada com solventes) e processos mecânicos para a lavagem de solos. Os solventes são selecionados de acordo com sua habilidade de solubilizar contaminantes específicos e de acordo com seus efeitos à saúde e ao meio ambiente. Este processo separa a fração mais fina do solo (silte-argila) da porção de maior granulometria. Uma vez que os contaminantes orgânicos tendem a ligar-se às frações mais finas, a separação destas frações reduz significativamente a contaminação do

solo. A menor fração de solo que contém a maioria de partículas silte e argila pode ser tratada separadamente por diferentes métodos como incineração ou biorremediação, ou ainda descartada de acordo com a legislação vigente. Cabe ressaltar que, a afirmação de que a menor fração do solo é constituída em sua maioria de partículas silte-argila, não será verdadeira para solos tropicais, aplicando-se a solos de países de clima temperado. Esta tecnologia pode ser combinada com outras. Os grupos de contaminantes-alvos, inclui compostos orgânicos semi-voláteis, petróleo e resíduos de combustíveis, metais pesados, bifenilas policloradas, HPA e pesticidas.

- Extração de vapores do solo

Também conhecida como extração a vácuo, tem sido bastante aceita e reconhecida por apresentar boa relação custo-benefício na remediação de solos insaturados contaminados com compostos orgânicos semi-voláteis e voláteis. Envolve a instalação de poços horizontais e/ou verticais na área da contaminação do solo. Sopradores de ar são freqüentemente utilizados para auxiliar no processo. O vácuo é aplicado através dos poços no local próximo à fonte de contaminação a fim de evaporar o constituinte volátil o qual é subseqüentemente retirado por um poço de extração adjacente. Os vapores extraídos são tratados (em geral por adsorção com carbono) antes de serem liberados na atmosfera (USEPA, 1995a). O aumento do fluxo de ar através da superfície promovido por esse sistema também estimula a biodegradação dos contaminantes, em especial aqueles que são menos voláteis (USEPA, 1996; 1998). Outra utilização deste processo é no tratamento de águas residuárias, através de bombeamento de água e espargimento simultâneo de ar.

- *Landfarming*

É uma tecnologia de remediação aplicada sobre o solo que reduz a concentração de constituintes de petróleo presentes neste, através de

processo associado à biorremediação. Esta tecnologia envolve o espalhamento da camada superficial do solo contaminado escavado (não mais que 1,5 metros) promovendo a atividade microbiana aeróbia, podendo ser auxiliada pela adição de nutrientes, minerais e água (USEPA, 1998; HEJAZI, 2002). Espécies bacterianas comprovadamente degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo, podem ser adicionadas ao processo para aumentar a taxa de degradação. A magnificação da atividade microbiana aumenta a degradação dos compostos adsorvidos (RISER-ROBERTS, 1998). O solo deve ser bem misturado para aumentar o contato entre os compostos orgânicos e os microrganismos e fornecer o oxigênio necessário à degradação biológica aeróbica. Segundo Harmsem, (1991) e segundo os protocolos definidos pelo Grupo de Avaliação de Remediação Alternativa (Remediation Alternative Assessment Group - RAAG, 2000), dependendo da taxa de degradação, os solos com histórico de contaminação com compostos hidrocarbônicos, e que estão sendo biotratados podem ser reaplicados ao sítio contaminado a intervalos regulares ajudando a amplificar a atividade biológica. A tecnologia *landfarming* é praticada há cerca de 100 anos, e na indústria do petróleo, há cerca de 30 anos. Os hidrocarbonetos mais voláteis e frações de óleos de menor massa molecular tendem a evaporar durante o processo de revolvimento do solo, enquanto que a redução dos compostos mais pesados se dá essencialmente por atividade microbiana aeróbia.

- Dessorção Térmica

É uma tecnologia de tratamento de resíduos inovadora na qual o solo contaminado é escavado, peneirado, e aquecido para liberar o petróleo de seus interstícios (USEPA, 1995b). As temperaturas de aquecimento do solo variam numa faixa de 100 a 600ºC, para que aqueles contaminantes que possuem ponto de ebulição nesta faixa vaporizem e se separem. Os contaminantes vaporizados são então coletados e tratados por outros métodos. Há uma ligeira confusão conceitual que se faz em relação à dessorção térmica e a incineração:

dessorção térmica não objetiva destruir os compostos orgânicos, mas sim transformá-los numa forma mais tratável, enquanto que a incineração objetiva destruir o contaminante. O real processo de dessorção térmica envolve o aquecimento do solo em uma câmara onde os contaminantes orgânicos e alguns metais são vaporizados. A partir daí, um gás ou um sistema de vácuo transporta o material vaporizado para tratamento fora do sítio contaminado. Se ocorrer a oxidação no lugar da vaporização, o processo se transforma em incineração. Com base na temperatura da câmara de vaporização, o processo pode ser classificado como: dessorção térmica de baixa temperatura ou dessorção térmica de alta temperatura.

- Biopilhas

Também chamadas de biocélulas ou células de compostagem, pilha de biorremediação e pilha estática. Este tratamento consiste no envolvimento do solo contaminado com petróleo em montes ou pilhas, e a estimulação da atividade aeróbia microbiana com a adição de minerais e água. Temperatura e pH podem também ser controlados para magnificar a biodegradação. As áreas tratadas são providas de cobertura impermeável (geralmente) para reduzir as perdas por lixiviação para as áreas de solo não contaminado. Estas pilhas que tem um sistema de ventilação por onde o ar passa, podem situar-se a seis metros e devem ser cobertas para prevenir encharcamentos e evaporação. Se existirem compostos voláteis, o ar deve ser tratado. As biopilhas são similares ao *Landfarming*, sendo que, neste último, o solo é aerado através de pás e escavadeiras.

Apesar da grande quantidade de tecnologias conhecidas atualmente, se faz necessário o conhecimento do maior número de variáveis possíveis em relação ao sítio contaminado e ao poluente, para que uma técnica seja escolhida com segurança e precisão. Somente desta forma é possível chegar ao maior nível de eficiência (REDDY *et al.*, 1999; RAAG, 2000; KHAN *et al.*, 2004). Portanto, mesmo dispondo-se de muitas

tecnologias, a escolha da mais adequada dependerá pelo menos de cinco fatores fundamentais:

i) as características do sítio contaminado;

ii) os requerimentos regulatórios legais;

iii) os custos;

iv) o tempo total do processo;

v) dos riscos ambientais envolvidos e das metas de remediação de acordo com tais riscos.

3.4 Microbiologia Associada à Degradação de Hidrocarbonetos

Para melhor compreensão e utilização dos processos microbianos na degradação de poluentes orgânicos, se faz necessário conhecer não só os microrganismos envolvidos, mas também os mecanismos por eles utilizados bem como os fenômenos físicos, químicos e bioquímicos relacionados. Como em qualquer processo em que se empregam microrganismos, é fundamental a otimização dos parâmetros relacionados aos nutrientes, fornecimento de oxigênio, pH entre outros. Particularmente, a biodegradação de compostos orgânicos envolve a biodisponibilidade e a toxicidade destes substratos. Analisaremos aqui, os principais tópicos relacionados à microbiologia associada à degradação de hidrocarbonetos:

i) os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos;

ii) os aspectos bioquímicos da biodegradação; e os

iii) fenômenos interfaciais.

3.4.1 Microrganismos Degradadores de Hidrocarbonetos

Uma grande diversidade microbiana está associada à degradação de hidrocarbonetos do petróleo, principalmente espécies bacterianas e fúngicas, sobre as quais existe uma extensa lista de trabalhos e revisões bibliográficas. As contribuições relativas de bactérias e fungos para mineralização de hidrocarbonetos têm sido relatadas desde a década de 1940, com a clássica revisão de Zobel, em 1947 (Zobel *apud* URURAHY, 1998) que investigou mais de 100 espécies as quais são representativas de 30 gêneros, que tem habilidade de degradar hidrocarbonetos. Muitos outros trabalhos e revisões sobre microrganismos degradadores de hidrocarbonetos do petróleo foram produzidos ao longo das décadas subseqüentes (ZAJIC & SUPPLISSON, 1972; SONG *et al.*, 1986; FEDORAK *et al.*, 1984; OKPOKWASILI & AMANCHUKWU, 1988; ROSENBERG, 1991). Song *et al.* (1986), por exemplo, observaram que em solo arenoso sem histórico de contaminação, 82% de *n*-hexadecano foi mineralizado por bactérias, enquanto que fungos mineralizaram 13% desse hidrocarboneto. De forma similar, em outros trabalhos, bactérias foram evidenciadas como mais eficientes degradadoras do que fungos leveduriformes. Complementarmente, poucos trabalhos reportam que espécies de leveduras sejam melhores degradadoras que espécies bacterianas (WALKER *et al.*, 1978; ROSENBERG, 1991; IJAH, 1998). Atlas (1981a), em sua revisão faz um relato de inúmeras experiências que apresentam gêneros e espécies microbianas isoladas de ambientes contaminados por óleo. Grande parte destes trabalhos reflete preocupações com derramamentos de óleo. Como marco, o acidente ocorrido com o petroleiro Torrey Canyon em 1967 impulsionou a produção de inúmeras pesquisas e isolamentos de microrganismos. Acidentes ocorridos com outros petroleiros como: Exxon Valdez, Amoco Cadiz, IXTOC I e Maersk Navigator, também serviram de base para comparações e estudos de caso (ATLAS, 1981b; ATLAS, 1995a; ATLAS, 1995b; GUPTA *et al*, 1996). Desta forma, uma grande variedade de gêneros de microrganismos degradadores isolados de ambientes aquáticos ou mesmo de solos e sedimentos em regiões costeiras, passa a ser conhecida. Bartha & Atlas

(1977) isolaram de ambientes aquáticos, 22 gêneros de bactérias, 14 de fungos e 1 de alga. Entre outros, foram isolados os gêneros *Pseudomonas, Achromobacter, Arthrobacter, Micrococcus, Nocardia, Vibrio, Acinetobacter, Brevibacterium, Corynebacterium, Flavobacterium, Candida, Rhodotorula e Sporobolomyces.* Com base nos trabalhos de Englert & Kenzie (1993) e Atlas (1984), podemos listar os principais gêneros de bactérias e fungos encontrados associados à degradação de hidrocarbonetos de petróleo (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Gêneros de microrganismos degradadores (ATLAS, 1984; ENGLERT & KENZIE, 1993)

Bactérias	Fungos
Achromobacter, Acinetobacter, Anthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Chromobacterium, Corynebacterium, Cytiphaga, Flavobacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Proteus, Pseudomonas, Sarcina, Serratia, Spirillum, Streptomyces, Vibrio, Xanthomonas.	*Acremonium, Aspergillus, Aureobasidium, Beauveria, Botrytis, Candida, Chrysosporium, Cladosporium, Cochliobolus, Cylindrocarpon, Debaryomyces, Fusarium, Geotrichum, Glicocladium, Graphium, Humicola, Monilia, Mortierella, Paecilomyces, Penicillium, Phoma, Rhodotorula, Saccharomyces, Scolecobasidium, Sporobolomyces, Sprotrichum, Spicaria, Tolypocladium, Torulopsis, Trichoderma, Verticillium.*

Nas últimas três décadas, porém, a utilização de técnicas moleculares, a exemplo daquelas baseadas no emprego do DNA ribossomal (rDNA), deu uma nova dimensão aos estudos de ecologia microbiana e, conseqüentemente, ao conhecimento da microbiota

associada à degradação de hidrocarbonetos. A partir daí, os microbiologistas verificaram que as populações microbianas naturais são, de fato, muito maiores e muito mais diversas do que se imaginava antes, quando as informações baseavam-se em técnicas dependentes do cultivo. Esta nova dimensão é extensiva aos microrganismos envolvidos na degradação de poluentes orgânicos, uma vez que o ambiente natural dá suporte a uma grande variedade de microrganismos com potencialidades degradadoras, que ainda não foram identificados, e que por sua vez, desempenham um papel fundamental na biorremediação (WATANABE, 2001; WATANABE, 2002). De tal modo, as informações moleculares passaram a ser utilizadas no desenvolvimento de estratégias que visam à magnificação da biorremediação (especialmente na bioaumentação), à avaliação das conseqüências da presença do poluente sobre as populações naturais (avaliação dos riscos à microbiota nativa) e à avaliação da dinâmica das populações presentes no processo (LI *et al*, 2008).

Estudos clássicos de biodegradação de poluentes orgânicos principiam pelo isolamento de um ou mais microrganismos capazes de degradar um determinado poluente alvo. Como nem todas as espécies microbianas são de fato cultiváveis, estes isolados representam uma fração muito pequena das populações totais. Estima-se que apenas 1 a 10% dos microrganismos podem ser isolados por técnicas clássicas (ROSADO, 1997; WATANABE, 2001). Por outro lado, ferramentas moleculares como a Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes (DGGE) e a Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura (TGGE), têm sido cada vez mais aplicadas na determinação direta da diversidade genética de populações microbianas presentes em ambientes contaminados. Estas metodologias se baseiam na eletroforese dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) de genes da subunidade 16S do rDNA, em géis de poliacrilamida, contendo um gradiente crescente de agentes desnaturantes (no caso do DGGE), ou de temperaturas (no caso do TGGE). Os genes das subunidades 16S estão

presentes em todos os organismos e a partir deles pode-se diferenciar uma espécie bacteriana de outra. Os fragmentos que possuem o mesmo tamanho e seqüências nucleotídicas diferentes podem ser separados em bandas no eletroferograma, baseando-se na diferença de mobilidade das moléculas após desnaturação química ou térmica de seus domínios. Desta forma, o número de bandas fornecidas por DGGE ou por TGGE pode ser utilizado como um estimador da abundância das espécies no ambiente submetido à presença do poluente orgânico, bem como da persistência de algumas espécies durante o processo (Li *et al.*, 2008).

Watanabe (2001), em uma revisão, apresenta alguns grupos de microrganismos identificados por técnicas moleculares, os quais estão associados à degradação de hidrocarbonetos, ao tratamento de águas residuárias e à oxidação de metano. São levantados trabalhos nos quais filotipos afiliados à subclasse α (alfa) do grupo *Proteobacteria* (α-*Proteobacteria*) aparecem com freqüência nos "*fingerprints*" obtidos por DGGE a partir de amostras de sedimentos contaminados com óleo, o que sugere associação desses filotipos à degradação dos hidrocarbonetos presentes no óleo. Em outros trabalhos, como o de Gross *et al.* (2000), que estuda sedimento contaminado por óleo na costa da Noruega, é relatada a presença majoritária de filotipos provenientes da subunidade 16S rDNA afiliados à subclasse γ (gama), γ-*Proteobacteria*, sobretudo representando os gêneros *Pseudomonas* e *Cycloclasticus*, encontrados em sedimento arenoso contaminado com óleo aditivado com fertilizante. Li *et al*. (2006), em um estudo da dinâmica microbiana durante a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, mostra a ligação da subclasse
α-*Proteobacteria* e particularmente da família *Sphingomonadaceae* à degradação de óleo Diesel.

3.4.2 Aspectos Bioquímicos da Biodegradação de Hidrocarbonetos

O fenômeno da biodegradação de hidrocarbonetos tem como fundamentação a capacidade que muitos microrganismos possuem de utilizar tais substâncias como única fonte de carbono e energia (ATLAS, 1981, ATLAS, 1984, ALEXANDER, 1994). Embora muitos mecanismos de biodegradação sejam conhecidos, alguns aspectos precisam ser ainda elucidados. Portanto, a bioquímica da degradação de hidrocarbonetos está longe de ser um tema trivial. Contudo, algumas generalizações podem ser feitas:

i) Hidrocarbonetos alifáticos são geralmente mais facilmente biodegradados que os aromáticos;

ii) Hidrocarbonetos alifáticos de cadeia normal são mais fáceis de serem biodegradados que os de cadeia ramificada. A introdução de uma ramificação dentro de uma molécula do hidrocarboneto diminuirá sua degradabilidade;

iii) Hidrocarbonetos saturados são mais susceptíveis à degradação que os insaturados. A presença de dupla ou tripla ligação carbono-carbono dificulta a biodegradação;

iv) Hidrocarbonetos alifáticos com tamanho de cadeia a partir de 8 átomos de carbono são mais facilmente degradados tanto menor seja o tamanho de sua cadeia. O comprimento de cadeia ótimo para a biodegradação parece ser de dez a vinte átomos de carbono (BRITTON, 1984).

Os alcanos de cadeia normal são degradados primariamente por oxidação do grupo metil terminal, seguido de uma clivagem da molécula na região entre o segundo e o terceiro carbono da cadeia (β-clivagem). Outras vias como a oxidação subterminal pela metanooxigenase encontrada em *Pseudomonas methanica*, também têm sido documentadas (BRITTON, 1984). A reação inicial na degradação do grupo metil envolve a adição direta do oxigênio ao carbono terminal do hidrocarboneto. Esta

reação é mediada por uma classe de enzimas chamadas oxigenases. A adição do oxigênio ao carbono primário promove a formação de um álcool primário, que é oxidado a aldeído e finalmente transformado a ácido graxo. Um fragmento longo de dois carbonos terminais é clivado produzindo o acetil CoA, que entra na via metabólica do ciclo de Krebs. Uma repetição seqüencial destas reações resulta na completa oxidação da molécula de hidrocarboneto. Na figura 3.2, observa-se a seqüência de reações proposta como via de degradação de alcanos (BAKER & HERSON, 1994).

A presença de ramificações na molécula de alcano dificulta a β-clivagem e torna a molécula refratária a biodegradação. O pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) por exemplo, é extremamente resistente à biodegradação devido às suas ramificações (RONTANI & GIUSTI, 1986).

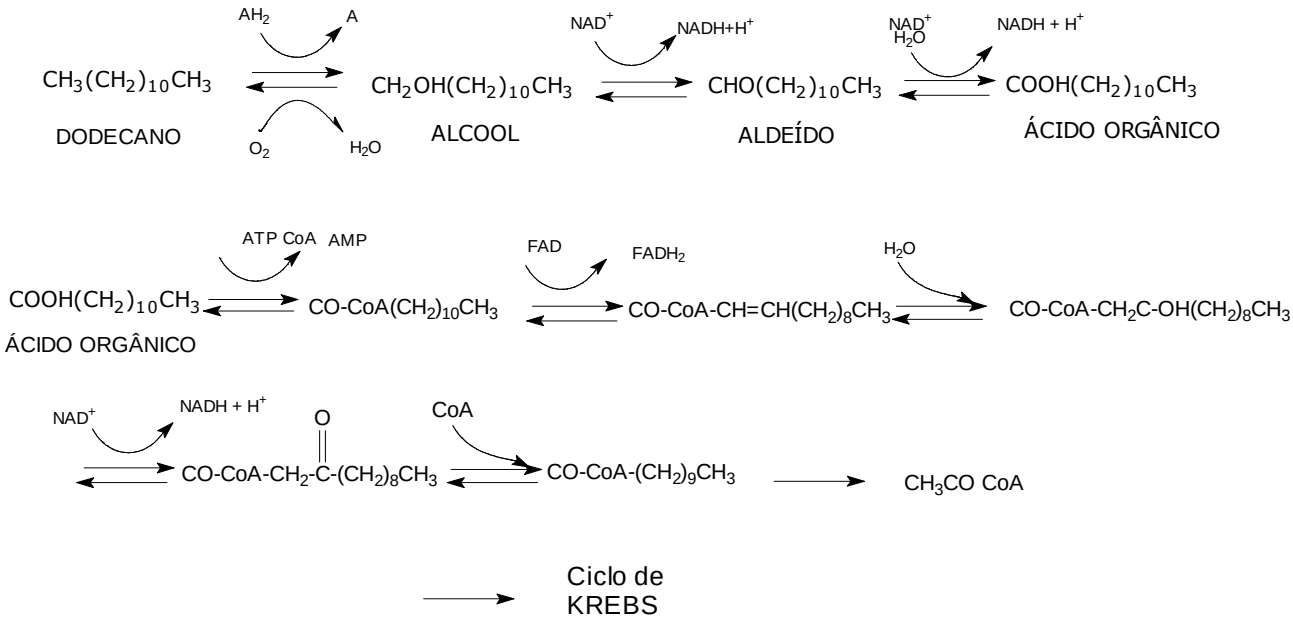


Figura 3.2: Reações de degradação de *n*-alcanos (BAKER & HERSON, 1994)

A oxidação dos hidrocarbonetos alifáticos insaturados não ocorre da mesma forma que a dos alcanos. Muitos estudos de degradação de alcenos têm focalizado moléculas que contém dupla ligação no carbono

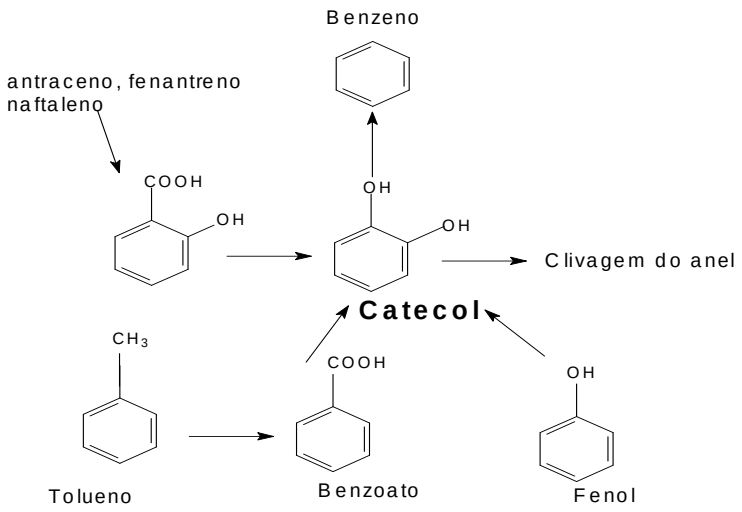
terminal. Esta posição permite vários mecanismos de ataque, e diversas maneiras de degradação de alcenos têm sido observadas (SEEGER *et al*, 1997).

Hidrocarbonetos aromáticos como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno são encontrados, predominantemente, nas frações leves de petróleo, como a gasolina, muito embora possam também estar presentes em quantidades sob a forma de traços, em diversas frações pesadas. A degradação aeróbica de aromáticos por bactérias foi demonstrada pela primeira vez em meados de 1900 (ALEXANDER, 1994). Há um número elevado de vias metabólicas envolvidas na degradação de aromáticos.

O benzeno é degradado primeiro pela conversão em catecol ou em protocatecolato. O núcleo aromático nesses compostos é subseqüentemente aberto por uma dessas duas vias: a ortoclivagem (via do 3-oxodipato) ou pela metaclivagem. A ortoclivagem envolve a clivagem de catecol ou protocatecolato entre os dois grupos hidroxil. Este processo leva à formação dos respectivos compostos: muconato e mucolactona, os quais são também metabolizados a 4-oxadipato enol-lactona e depois ao 3-oxiadipato (beta-cetoadipato). O metabolismo procede à formação do acetil-CoA e succinato. Na metaclivagem, por outro lado, a clivagem inicial do anel ocorre adjacente ao grupo hidroxil, formando o semi-aldeído 2-hidroxil-mucônico como produto inicial da clivagem do anel. Subseqüentemente, a orto e metaclivagem do anel aromático procede à formação de piruvato, formiato, e acetaldeído, que vão alimentar o ciclo de Krebs. A figura 3.3, mostra a seqüência de reações para a formação do catecol e protocatecolato, proveniente da degradação de benzeno e de poli-aromáticos (antraceno, fenantreno e naftaleno), e na Figura 3.4 estão apresentados os esquemas das reações de orto e metaclivagem do anel aromático (SEEGER *et al.* 1997; BAKER & HERSON, 1994).

Os compostos benzênicos alquil substituídos (tolueno, etilbenzeno) são inicialmente oxidados utilizando uma das vias existentes. Se o ataque inicial ocorrer no anel aromático, é formado o alquil-catecol, o qual pode ser clivado utilizando-se a meta ou a ortoclivagem. Se o grupo alquil for oxidado inicialmente, quase sempre são formados ácidos carboxílicos aromáticos. Por exemplo, a oxidação inicial da alquil-substituição do *p*-xileno leva à formação do ácido tolúico. Esse ácido carboxílico aromático pode ser convertido em homoagentisato ou gentisato. A clivagem do anel aromático ocorre, subseqüentemente, com a formação de intermediários como fumarato e acetoacetato, que alimentam o ciclo de Krebs (ALEXANDER, 1994).

(a)



(b)

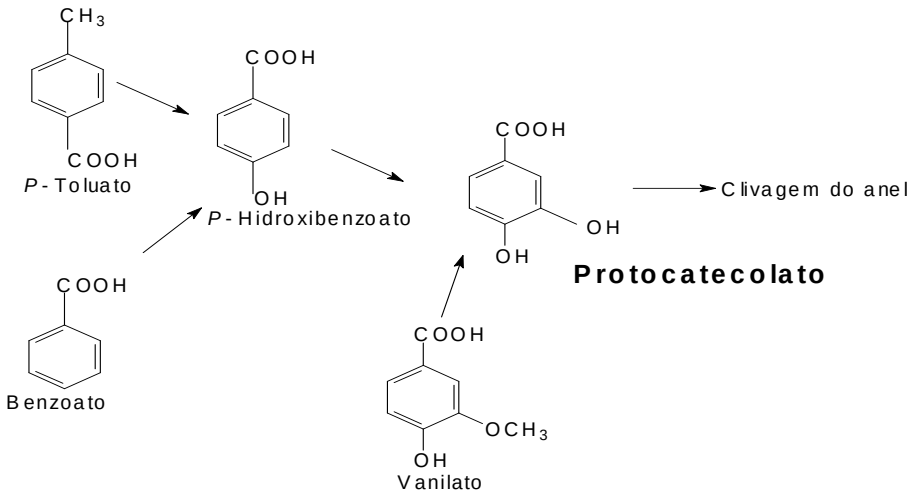


Figura 3.3: Degradação do benzeno: (a) catecol e (b) protocatecolato (SEEGER *et al.* 1997)

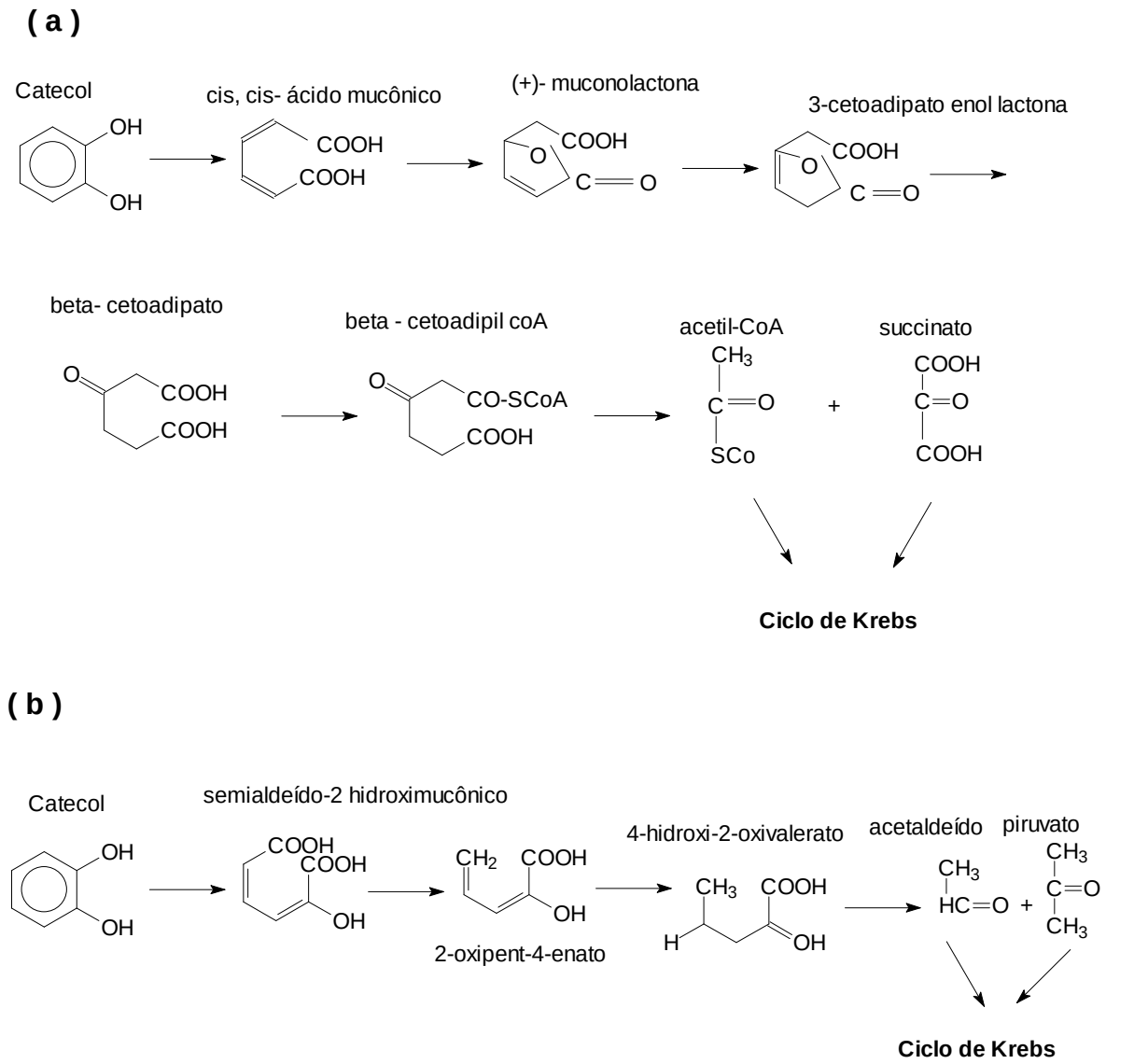


Figura 3.4: Clivagem do anel: (a) Ortoclivagem (b) Metaclivagem (BAKER & HERSON, 1994)

3.4.3 Aspectos Físico-químicos e Ambientais da Biodegradação de Hidrocarbonetos

Como descrito anteriormente, a biodegradação de materiais orgânicos no ambiente é mediada geralmente por bactérias e fungos. As bactérias possuem características metabólicas diversas que as colocam num grupo de microrganismos de reconhecida atividade degradadora. Variabilidade genética, crescimento rápido e facilidade para se aclimatar

rapidamente em diversos ambientes são as principais características. Essas características são fundamentais na seleção de microrganismos para processos de biorremediação. A otimização de parâmetros como: pH, nutrientes, oxigênio e temperatura possibilitam um melhor desempenho dos microrganismos na biodegradação. Uma máxima eficiência nesse processo de biodegradação levará a mineralização do poluente com a produção de CO_2 e água (FRANKENBERGER Jr, 1992; ATLAS & BARTHA, 1972).

Citaremos aqui alguns aspectos de relevância para a biodegradação.

- Disponibilidade de Oxigênio

Geralmente, sob condições aeróbicas, a biorremediação ocorre mais facilmente. Regiões próximas à superfície do solo têm demonstrado maior taxa de biodegradação, enquanto que em regiões mais profundas verifica-se que estas taxas diminuem (NOCENTINI *et al*, 2000; AMELLAL, 2001).

- Presença de Matéria Orgânica

A presença de matéria orgânica pode indicar a presença de elementos alternativos que aumentam a taxa de biodegradação (IJAH, 1998).

- Disponibilidade de Nitrogênio e Fósforo

Bactérias heterotróficas e fungos, além de uma fonte de carbono, necessitam para o crescimento, de um outro grupo de nutrientes e de um aceptor de elétrons. Este aceptor de elétrons é o O_2 para os aeróbios, mas pode ser nitrato, sulfato, CO_2, ferro férrico ou compostos orgânicos para bactérias que têm habilidades para utilizar essas substâncias como aceptor de elétrons no processo de metabolização da fonte de energia. Muitas bactérias ou fungos requerem baixas concentrações de vitaminas, aminoácidos, vitaminas lipossolúveis, que são moléculas orgânicas chamadas de fatores de crescimento. A ausência

dessas moléculas no ambiente pode prejudicar o crescimento microbiano (ATLAS & BARTHA 1972). Descargas de óleo por vazamentos acidentais de tanques de navios, em ambientes marinhos e estuarinos, têm suscitado muitos estudos a respeito das condições nutricionais em tais ambientes. Estas investigações mostram que a degradação do óleo em água do mar é mais rápida quando compostos à base de nitrogênio e fósforo são adicionados (FERNANDES, 1994; RAMADAN, 1990).

- Temperatura

A temperatura varia de ambiente para ambiente e de acordo com a sazonalidade. Para um determinado aumento ou decréscimo de temperatura a magnitude da resposta quanto à biodegradação varia com o ambiente e com o tipo de poluente, o que é refletido na fisiologia dos microrganismos envolvidos. Em geral, temperaturas ideais para a biodegradação estão na faixa entre 20 e 35ºC (LEAHY & COLWELL, 1990).

- pH

Para a maioria dos microrganismos envolvidos no processo de biorremediação, a faixa de pH mais favorável para o seu crescimento se situa entre 6,0 e 8,0 com um valor ótimo em torno de 7,0, sendo que os fungos são mais tolerantes à condições ácidas. Em solos, os valores de pH podem ser muito variados, estendendo-se desde de 2,5 a 11,0 em solos ácidos e em desertos alcalinos, respectivamente. Esse parâmetro nesses valores extremos influencia negativamente a capacidade dos microrganismos degradarem hidrocarbonetos em solo (ATLAS,1998; LEAHY & COLWEL, 1990).

- Salinidade

Alta salinidade parece afetar negativamente a atividade microbiana. É sabido que os fungos resistem menos à condições de alta salinidade do que as bactérias. Em ambientes costeiros, a biorremediação

é afetada pela alta concentração salina (YANG *et al*, 1999; DEL'ARCO & FRANÇA, 1999).

- Atividade de Água

A atividade de água se refere à quantidade de água que efetivamente está disponível para os microrganismos no processo de biodegradação. Esta atividade está condicionada ao tipo de solo e à estrutura do poluente (DIBBLE & BARTHA, 1976).

Além dos fatores já mencionados, pode-se citar ainda um fator biótico importante, que é a predação por protozoários. Alguns protozoários são predadores naturais de bactérias e sua presença, muitas vezes, é inevitável no ambiente que precisa ser biorremediado (RAMADAM *et al.,* 1990).

3.4.4 Fenômenos Interfaciais

A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo ocorre em um sistema multifásico composto por matéria orgânica insolúvel, água, sais e microrganismos. Neste sistema, a interface água-óleo é bastante distinta, por causa da imiscibilidade das fases aquosa e oleosa. A compreensão dos fenômenos ocorridos nesta interface permite fazer o controle dos processos de assimilação de compostos orgânicos, e a otimização de parâmetros nutricionais e respiratórios (URURAHY, 1998).

Segundo Rosemberg (1991), a assimilação de hidrocarbonetos exige hidrofobicidade da superfície celular, embora nem todos os microrganismos que possuem esta hidrofobicidade são degradadores de hidrocarbonetos e nem todos os degradadores de hidrocarbonetos são capazes de sobreviver em superfície oleosa (RON & ROSEMBERG, 2001; 2002).

O grau de solubilidade dos hidrocarbonetos de petróleo é um fator importante para avaliar o mecanismo utilizado pelos microrganismos na degradação. Na Tabela 3.3, estão apresentadas as solubilidades de alguns hidrocarbonetos encontrados no petróleo e seus derivados (ALEXANDER, 1994).

Tabela 3.3: Solubilidade em Água de Alguns Hidrocarbonetos do Petróleo (Alexander, 1994)

Grupo	Composto	$mg.L^{-1}$
Hidrocarbonetos alifáticos	Heptano	$2,9x10^{0}$
	Octano	$6,6x10^{-1}$
	Nonano	$2,2x10^{-1}$
	Decano	$5,2x10^{-2}$
	Hexadecano	$2,0x10^{-5}$
	Eicosano	$1,1x10^{-6}$
Hidrocarbonetos aromáticos	Naftaleno	$3,1x10^{1}$
	Bifenil	$7,2x10^{0}$
	Acenafteno	$4,3x10^{0}$
	Antraceno	$5,0x10^{-2}$
	Fenantreno	$1,1x10^{0}$
	Pireno	$1,3x10^{-1}$
	Criseno	$2,0x10^{-3}$
	1,2 – Benzopireno	$5,3x10^{-3}$

Existem três mecanismos através dos quais se explica a assimilação de hidrocarbonetos por via microbiana. Estes mecanismos focalizam a forma como o hidrocarboneto é transferido do ambiente à superfície da célula, e depois é transportado através da membrana para regiões intracelulares por ação enzimática (ALEXANDER, 1994; URURAHY, 1998). Tais mecanismos são:

a) Utilização do composto orgânico apenas na fase aquosa

O microrganismo é capaz de utilizar apenas as moléculas que estão dissolvidas na fase aquosa. Estes microrganismos são comumente encontrados associados a substratos de baixa solubilidade. A presença de substância ou mistura de substâncias de baixa solubilidade na fase aquosa pode ser medida pelo coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), que é a

razão entre a quantidade da substância que está efetivamente dissolvida em octanol e a quantidade que está dssolvida em água, num sistema com quantidades iguais de água e octanol. Desta forma, a utilização de substrato disponível apenas na fase aquosa é comum em substâncias com baixos valores de K_{ow}. O crescimento microbiano (decorrente da degradação do poluente) está condicionado à disponibilidade do composto orgânico a estes microrganismos, presumivelmente não produtores de biossurfactantes. Para que haja uma degradação efetiva, é necessário que a taxa de dissolução espontânea seja maior que a taxa de biodegradação. Quando ocorre um aumento significativo de biomassa, a demanda biológica de carbono excede a taxa de dissolução espontânea da substância e a atividade microbiana ficará limitada a esta taxa de dissolução.

b) Contato direto dos microrganismos com a fase não-aquosa

Os microrganismos aderem diretamente à superfície da fase oleosa e metabolizam os seus constituintes. Bactérias que crescem em hidrocarbonetos alifáticos em solução aquosa freqüentemente se fixam ao substrato orgânico e, se este se encontra sob a forma de gotículas, as células retidas por estas gotículas também podem formar aglomerados. Para muitos microrganismos, a aderência da célula é um pré-requisito para a degradação.

c) Excreção de produtos que induzem a formação de gotículas de substrato menores que 1μm

Em muitos casos é evidenciada a produção de substâncias que são capazes de aumentar a taxa de consumo de substrato oleoso. Nestes casos, a taxa de biodegradação aumenta concomitantemente com a biomassa e não há dependência direta da taxa de dissolução espontânea da fase não-aquosa. Estas substâncias são chamadas de biossurfactantes, ou bioemulsificantes, e sua produção aumenta o coeficiente de partição da substância para a fase aquosa, potencializando a taxa de biodegradação.

Os surfactantes de um modo geral são moléculas anfifílicas, que possuem uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Em baixas concentrações, os surfactantes são solúveis em água e a proporção em que se aumenta a concentração, os surfactantes se agregam em micelas. A menor concentração em que se observa a produção de micelas é chamada de concentração micelar crítica (CMC). As micelas são formadas por uma região interna hidrofóbica e uma região externa hidrofílica. A porção terminal hidrofílica fica voltada para o meio aquoso. O substrato hidrofóbico não-solúvel fica presumivelmente incorporado no interior da micela aparentando estar dissolvido na fase aquosa. Este fenômeno é conhecido como "pseudossolubilização", uma vez que a gotícula oleosa está retida na região interna da micela e não está dissolvida na fase aquosa. Muitos microrganismos degradadores de alcanos ou de óleo cru, excretam agentes emulsificantes que induzem a formação de gotículas de substrato, de tamanhos que variam entre 0,1 e 1,0μm.

De acordo com a classificação de Zajic & Mahomedy (1984), podem-se dividir os biossurfactantes em: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídios e ácidos graxos. A Figura 3.5 mostra dois exemplos de glicolipídios: soforolipoídio e raminolipídio.

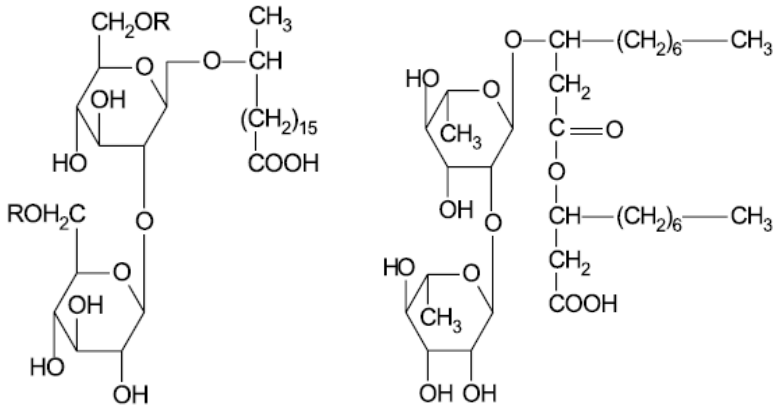


Figura 3.5: Estruturas de biossurfactantes - esquerda soforolipídio; direita - raminolipídio

As principais vantagens que os biossurfactantes apresentam sobre os surfactantes químicos convencionais, e que os evidencia como mais indicados no processo de biodegradação, são:

i) Biodegradabilidade;

ii) Tolerância à temperatura pH e força iônica - a elevada estabilidade térmica e de pH, possibilita sua utilização em condições ambientais variadas (BOGNOLO, 1999);

iii) Atividades superficiais e interfaciais maiores – quantidades pequenas desses compostos são capazes de produzir maiores abaixamentos na tensão superficial e interfacial dos compostos hidrofóbicos do que é observado para os surfactantes químicos (COOPER & PADDOCK, 1984).

A recuperação de pétroleo em poços maduros pode ser conduzida por processos mecânicos (injeção de água) (Enhanced Oil Recovery - EOR) ou por processos e produtos microbianos (Microbiologically Enhanced Oil Recovery - MEOR). Quando se aplica o processo MEOR, lança-se mão de microrganismos que produzem uma variedade de biomoléculas como biossurfactantes, polissacarídeos, capazes de reduzirem a tensão interfacial entre a rocha e o óleo, o que promove a movimentação do mesmo através dos poros das rochas (BANAT *et al.*, 2000). A recuperação por MEOR pode chegar a percentuais próximos a 62% (MAKKAR & CAMEOTRA 1997).

Finalmente, estas moléculas anfifílicas apresentam importante papel no processo de biorremediação de solos impactados, emulsionando hidrocarbonetos, aumentando a solubilidade e disponibilizando-os para a biodegradação realizada pelos microrganismos autóctones (BANAT *et al.*, 2000; SHULGA *et al.* 2000); na limpeza de reservatórios de óleo, promovendo a redução da viscosidade de metais pesados e a formação de emulsões óleo/ água, facilitando a recuperação e transporte em oleodutos (BANAT *et al.*, 2000).

Há pelo menos duas maneiras pelas quais os biossurfactantes estão envolvidos na biodegradação de hidrocarbonetos: através do aumento da superfície de contato do material oleoso e do aumento da biodisponibilidade do hidrocarboneto. Neste último caso, o biossurfactante atua na dessorção das moléculas do hidrocarboneto de baixa solubilidade (RON & ROSEMBERG, 2002).

3.5 Estudos de Ecotoxicologia e Avaliação da Ecotoxicidade

O domínio da toxicologia inclui a compreensão dos tipos de efeitos causados pelas substâncias, os processos bioquímicos e fisiológicos responsáveis por esses efeitos, as sensibilidades relativas dos diferentes tipos de organismos à exposição a estas substâncias e a toxicidade relativa das diferentes substâncias e classes de substâncias (BAIRD *et al*., 1996; CHAPMAN, 1995; CHAPMAN, 2002)

Durante muito tempo, estudos toxicológicos do ambiente têm sido caracterizados como estudos de toxicologia ambiental. Tais estudos são conduzidos independentemente de considerações ecológicas e subseqüentemente comparados com estudos ecológicos por aproximação. Porém, muitas considerações sobre ecologia, são em geral mais extrínsecas do que intrínsecas e estes testes clássicos, embora conduzidos com organismos que podem ser facilmente isolados e testados, não levam em conta a significância ecológica, ou lhe confere uma importância quase sempre secundária (INGERSOLL *et al*, 1997).

Uma mudança de paradigma surge no campo da observação dos efeitos tóxicos das substâncias, assumindo crescente importância na predição e avaliação dos riscos ao meio ambiente e às comunidades, levando em conta os aspectos fisiológicos e, sobretudo as relações tróficas dos organismos-teste. O termo "toxicologia ambiental" dá lugar ao termo ecotoxicologia, que compreende a integração entre os domínios da toxicologia e da ecologia, e tem por objetivo entender e predizer os efeitos

das substâncias tóxicas nas comunidades naturais sob condições realísticas de exposição (CHAPMAN, 2002).

O surgimento da ecotoxicologia em contraposição à toxicologia ambiental sugere um novo olhar sobre os testes clássicos de toxicidade realizados com espécies isoladas, os quais não visam relacionar os efeitos das substâncias tóxicas sobre as comunidades ou sobre a combinação de espécies pertencentes a níveis tróficos diferentes. Segundo Duarte (2000), algumas espécies testadas de forma combinada, podem inclusive resultar em uma reduzida toxicidade quando comparadas com espécies isoladas, e membros de uma comunidade podem magnificar sua performance funcional além do que seria esperado de uma simples contribuição aditiva de cada membro da comunidade.

Existe uma preocupação que parece emblemática na toxicologia ambiental, que são os custos com os testes e a concentração da substância tóxica. Para a toxicologia ambiental, o foco, em primeira instância, não é a solução dos problemas relacionados à ecotoxicologia, mas sim a solução dos problemas relacionados ao teste. Em contrapartida, a preocupação da ecotoxicologia é, sobretudo, com os custos de uma decisão incorreta, os quais serão tão maiores quanto forem os níveis de destruição causados pelas substâncias ou mesmo por desequilíbrios entre os membros da comunidade, uma vez que a substância tóxica é, em última análise, apenas um dos aspectos avaliados pela ecotoxicologia.

Há dois temas-chave nos estudos de ecotoxicidade: as respostas crônicas e agudas e os critérios para seleção das espécies. Testes ecotoxicológicos com respostas agudas e crônicas envolvem muitas espécies e diferentes "*endpoints*".

A suposição geral é que a rota primária de exposição é aquosa. Assim, um teste de ecotoxicidade padrão é baseado na concentração do meio externo. Torna-se aparente que a dose, isto é, o material associado ao tecido biológico, é o melhor preditor dos efeitos.

Uma ênfase primária é dada à relação filogenética. Em primeiro lugar, o *taxa*-teste deve ser similar ao *taxa*-residente, e deve ter relevância e importância ecológica; segundo - as rotas de exposição devem ser diretas e relevantes; terceiro - o *taxa* a ser testado, precisa ser confirmado como apropriadamente sensível aos estressores em questão. Testar a espécie mais sensível não significa necessariamente proteger a maioria das espécies. De fato, espécies efetivamente sensíveis parecem não existir na prática, conforme constatado por Calow (1996).

Os primeiros estudos no campo da ecotoxicologia surgiram junto com a necessidade de se estabelecer critérios para estudar os efeitos tóxicos de determinadas substâncias poluentes sobre a biota, a fim de se ter um controle da emissão de poluentes no ambiente, ou de se estabelecer parâmetros para saber quais os níveis toleráveis de poluição (ABEL, 1991; CHAPMAN, 1995; CHAPMAN, 2002). Freqüentemente, as maiores dificuldades encontradas têm sido as de se determinar a abrangência de tais efeitos nos organismos e a representatividade que esses efeitos observados para um grupo de organismos possam ter para uma comunidade. Os efeitos tóxicos das substâncias nos organismos vivos podem se manifestar em diferentes níveis: sub-celular ou celular, nos tecidos, nos órgãos ou no organismo inteiro. Embora o conhecimento do mecanismo de ação seja muito importante para fins de estudos meramente toxicológicos, por si só, não é o bastante para predizer danos à biota susceptível à exposição ao poluente (ABEL,1991).

A ecotoxicologia estuda a existência dessas formas de toxicidade nos organismos e a relação de tais organismos no ambiente, através de testes específicos com organismos padrão, selecionados de acordo com determinados critérios. Microrganismos são utilizados com freqüência em testes de ecotoxicidade por serem de fácil manipulação, por terem versatilidade bioquímica e pela rapidez com que se obtêm os resultados (TORSLOV, 1992). Ambientes poluídos por substâncias recalcitrantes e

submetidos a algum tipo de tratamento remediante devem ser avaliados quanto à ecotoxicidade.

Para escolher o organismo padrão, são necessários alguns critérios. Um dos critérios mais comuns é a disponibilidade do organismo no ambiente. Este critério leva em conta a existência em grande quantidade do organismo e a sua relação direta com o equilíbrio do ambiente, porém pode apresentar falhas com relação à exatidão dos resultados e a aproximação das condições realísticas (CHAPMAN, 1995; 2002).

A substância tóxica pode atuar direta ou indiretamente no organismo teste. De forma direta, causa mortalidade em curto prazo e, indiretamente, causa toxicidade aguda em produtores ou consumidores primários, ou toxicidade crônica em níveis tróficos subseqüentes. Para uma resposta mais abrangente, é importante o estudo da toxicidade da substância nos quatro níveis tróficos: produtor, consumidor primário, consumidor secundário e decompositor (CALOW, 1996).

Embora os estudos de ecotoxicologia apontem para uma avaliação global e mais realística dos efeitos das substâncias tóxicas sobre os organismos, é observável a existência de uma lacuna entre as respostas fisiológicas dos organismos e as concentrações das substâncias tóxicas obtidas através do emprego de metodologias de extração e quantificação. Se, por um lado, os testes ecotoxicológicos indicam as concentrações letais ou tóxicas efetivas de determinadas substâncias para os organismos, por outro lado, fenômenos químicos relacionados às interações ocorridas entre as substâncias químicas e a matriz à qual elas estão ligadas, podem tornar tais substâncias menos biodisponíveis embora as metodologias analíticas de extração e quantificação culminem numa resposta indicativa de altos valores de concentração. Assim, muitas vezes os valores das concentrações das substâncias encontrados mediante emprego de análises químicas não estão relacionados diretamente a uma

resposta tóxica, mas sim a uma magnificação da extração. Outrossim, as determinações analíticas não são capazes de prever os efeitos sinergísticos entre diferentes substâncias (ARAÚJO & NASCIMENTO, 1999). Diante destas constatações, novos esforços estão sendo empreendidos na perspectiva de convergir respostas fisiológicas e químicas, para que se estabeleçam novos parâmetros avaliativos de ecotoxicidade; parâmetros estes que sejam integradores e abrangentes, sem perder, contudo o caráter prático.

3.6 Considerações Acerca da Introdução e da Revisão da Literatura

A apresentação do tema tal qual está disposto nos capítulos de Introdução e de Revisão da Literatura (capítulos 2 e 3, respectivamente), presta-se não apenas a uma finalidade didática, mas principalmente à finalidade de revelar algumas lacunas cujo preenchimento (se não de todas, mas pelo menos de boa parte delas), faz parte do intento desta Tese. Deste modo, enumeramos a seguir esquematicamente três lacunas tangíveis:

1. Como descrito no capítulo de introdução, sobretudo baseando-se nos trabalhos de Cassidy *et al*. (2000), o modo de operação de biorreatores por batelada seqüencial parece ser o mais adequado à realidade operacional dos terminais de armazenamento. Contudo, as características do resíduo oleoso estudado na presente Tese não encontram paralelo na literatura, onde, ora são reportados estudos realizados com sedimentos impregnados com óleo Diesel, ora são reportados estudos realizados com o óleo Diesel em processos conduzidos por batelada simples. Portanto, nossa proposição neste ponto, é acrescentar informações novas a partir dos experimentos com o resíduo de fundo de tanque estudado, que sejam úteis à elaboração de trabalhos futuros e à implementação de um sistema de tratamento

agregado à unidade de distribuição e armazenamento de combustíveis;

2. Os estudos das mudanças na dinâmica das populações microbianas em comunidades mistas por técnicas moleculares, como mostrado na literatura (ROSADO, *et al*., 1997, WATANABE, 2001; WATANABE, 2002;), ganha espaço também na investigação da biodegradação de compostos de petróleo. Porém, poucas são as referências no campo dos trabalhos de biotramentos *ex situ* como aqui proposto. Em geral (como exploraremos mais tarde no capítulo de resultados e discussão), estes trabalhos reportam estudos de avaliação de impactos causados à microbiota quando da contaminação de solos por poluentes orgânicos, ou quando da adição de microrganismos alóctones ao ambiente contaminado. Esperamos aqui, contribuir com um tipo de associação pouco reportada, mas de substancial importância: a associação dos estudos de diversidade molecular microbiana aos processos conduzidos por batelada seqüencial;

3. Por fim, ao observarmos as diretrizes apontadas pelos trabalhos no campo da ecotoxicidade, sobretudo os trabalhos de Araújo e Nascimento (1999), vislumbramos a possibilidade de inserção de ensaios de ecotoxicidade com organismos autóctones para a predição dos danos causados pelo resíduo em estudo e para a avaliação da efetividade do tratamento.

CAPÍTULO 4

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Diante das crescentes exigências da sociedade na esfera ambiental, a aplicação exclusiva dos processos clássicos de tratamento de resíduos oleosos, reconhecidamente rápidos e eficientes, necessita ser revista. Para suprir essas novas exigências, além de altas taxas de remoção dos contaminantes, e além da economicidade, busca-se por um conceito mais globalizante que é o conceito de custo-efetividade. É visando a essa perspectiva que as tecnologias de remediação de natureza biológica, também chamadas de tecnologias emergentes**,** ganham força, e é nesse contexto que a aplicação de tais tecnologias é estudada. Embora os descartes de resíduos oleosos sejam realizados de acordo com a legislação ambiental vigente e a incineração dos resíduos obedeça criteriosamente às normas ambientais, não se avaliam comumente os efeitos cumulativos da emissão de várias fontes de incineração numa determinada área, ou de uma única fonte durante um longo período de tempo.

O intuito do presente trabalho é apresentar um tratamento que gere menos impactos potenciais ao meio ambiente, oferecendo alternativa aos processos dos quais lançam mão atualmente a unidade de armazenamento da TRANSPETRO, em SUAPE, Pernambuco.

O resíduo oleoso aqui utilizado provém de tanque de armazenamento e descarte (TAD) localizado no pátio de armazenamento do terminal da TRANSPETRO em Suape – PE. Muito embora apresente características semelhantes às do óleo diesel comercial, o citado resíduo encontra-se fora das especificações em uma série de outros itens de controle, como cor e aspecto visual, o que o estabelece como um material descartável. Quanto à sua composição química, apresenta substancialmente hidrocarbonetos saturados de cadeia linear, caracterizando-o como um resíduo parafínico. Do ponto de vista da biodegradabilidade, apresenta compostos ramificados como o pristano e o fitano, o que confere maior recalcitrância aos resíduos oleosos de um modo geral, muito embora, a presença majoritária de alcanos (ramificados ou não) aponte, de forma mais abrangente, para uma alta tratabilidade por processos microbianos.

A idealização de um processo preconizando a utilização de população endógena mista, assim como realizado em trabalhos de referência na temática (URURAHY, 1998) é-nos razoável, uma vez que a aclimatação desta microbiota durante o processo por batelada seqüencial em meio quimicamente definido pode aumentar sobremaneira as taxas de biodegradação. Por sua vez, para que se constituam condições de crescimento microbiano e de degradação satisfatórios, os parâmetros nutricionais e físico-químicos do processo devem ser estabelecidos preliminarmente.

As bateladas realizadas subseqüentemente podem trazer clareza às indagações iniciais acerca do caráter realístico do processo, apresentando evidências de que este modo de condução possa se adequar

à rotina operacional do Terminal de Distribuição restando, portanto, redimensioná-lo em escala piloto em estudo posterior.

Com vistas à avaliação da ecotoxicidade, pode-se esperar que o processo permita um controle da qualidade ambiental do resíduo a cada etapa. Deste desiderato, advêm os propósitos de se determinar os efeitos ambientais mais significativos do processo no tocante aos impactos causados aos ecossistemas adjacentes.

Finalmente, constata-se que o emprego de biorreatores no tratamento de resíduos líquidos armazenados em tanques intermediários requer modos de operação que prevejam o descarte intermitente de material. O sistema suscitado aqui traz a possibilidade operacional que preconiza a realimentação do biorreator, sendo este o modo mais interessante, sobretudo quando se deseja avaliar a ecotoxicidade do resíduo a cada período de reação ou ciclo, antes de realizar o descarte e quando se almeja a investigação da microbiota atuante no processo, podendo-se interferir ao longo do mesmo, de modo que as condições sejam otimizadas não só nos aspectos físico-químicos, mas também nos aspectos microbiológicos.

Tendo em vista as limitações impostas, ora pelos passivos ambientais gerados por tratamentos físico-químicos, ora pelas condições pouco realísticas apresentadas por alguns biotratamentos, a presente Tese teve por objetivo maior, a investigação da viabilidade do tratamento de resíduo oleoso de fundo de tanque, por batelada seqüencial em biorreator, lançando mão de metodologias de avaliação das mudanças na comunidade microbiana e de metodologias de avaliação realística da ecotoxicidade do material tratado.

4.1 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos da Tese estão distribuídos ao longo das etapas experimentais, as quais se prestaram a esclarecimentos importantes na composição final do trabalho.

As etapas, e seus respectivos objetivos específicos são:

I. Caracterização do Resíduo Oleoso

- Investigar a composição química do resíduo;
- Investigar as propriedades físico-químicas;
- Avaliar as Características Ecotoxicológicas do Resíduo

II. Ensaios em Frascos Agitados

- Investigar a influência de parâmetros físicos e químicos na biodegradação;
- Avaliar a degradação dos hidrocarbonetos totais cromatograficamente disponíveis;
- Estimar as perdas abióticas em frascos

III. Experimentos em Biorreator

- Realizar bateladas simples de ajuste a fim de ajustar as melhores condições obtidas nos experimentos em frascos e estimar as perdas abióticas em biorreator;
- Avaliar as condições de biodegradação em biorreator;

- Realizar bateladas seqüenciais em biorreator avaliando diferentes números e tempos de duração de ciclos;

- Investigar dinâmica das populações microbianas durante o processo correlacionando-as com ensaios respirométricos;

- Avaliar a extensão da biodegradação variando-se a extensão e quantidade dos ciclos das bateladas seqüenciais;

- Avaliar a redução da tensão superficial da fase aquosa ao longo do processo;

IV. Ensaios de Ecotoxicidade

- Investigar a efetividade do processo mediante as respostas ecotoxicológicas;

- Realizar ensaios de ecotoxicidade com estágios embriolarvais da espécie de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* e de ostra *Crassostrea rhizophorae*;

- Realizar ensaios de ecotoxicidade com a espécie de microalga dulciaqüícola *Pseudokirchneriella subcaptata*

CAPÍTULO 5

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, estão descritos os materiais, as estratégias e as técnicas utilizadas na etapa experimental da Tese. Com a finalidade de investigar as propriedades do resíduo interferentes na sua biodegradabilidade, utilizaram-se técnicas cromatográficas e de espectrometria de massas, análises físico-químicas comumente empregadas na especificação de combustíveis de petróleo, e análises de ressonância magnética nuclear. Com relação à qualidade ambiental do resíduo, buscou-se por ensaios de ecotoxicidade com organismos representativos da biota local, para avaliar a eficiência do processo neste âmbito. Averiguou-se a diversidade microbiana presente no resíduo, através de técnicas moleculares empregando DGGE, e através de técnicas clássicas de isolamento e identificação de microrganismos.

Lançamos mão de planejamentos experimentais estatísticos, para verificar as variáveis importantes e influenciadoras no processo de degradação dos hidrocarbonetos presentes no resíduo oleoso, avaliando os efeitos isolados de cada variável, e os efeitos combinados das mesmas. Foram montados dois planejamentos estatísticos fatoriais fracionados. Estes experimentos foram efetuados em frascos de Erlenmeyer agitados em agitador rotativo, com volumes conhecidos de resíduo, variando-se simultaneamente: pH, relação carbono-nitrogênio, carga orgânica inicial, aeração (no primeiro planejamento apenas) e a velocidade de agitação (no segundo planejamento apenas). Adotamos aí, a primeira das convenções úteis para a avaliação da biodegradação: a determinação dos hidrocarbonetos totais cromatograficamente disponíveis (HTCD), cuja redução percentual foi utilizada nesses experimentos e nos experimentos posteriores em biorreator, como indicativo de biodegradação. Importante também, a este turno, foi a verificação das perdas abióticas, estimadas por testes com resíduo filtrado em membranas de 0,45μm.

Diante dos resultados quali-quantitativos produzidos pelos experimentos em frascos agitados, pôde-se estimar valores ótimos de algumas variáveis, alguns dos quais foram empregados nos experimentos em biorreator. Num primeiro momento, foram realizadas bateladas de ajuste em biorreator para que fossem testados os valores que, segundo o modelo estatístico gerado, produziriam respostas pouco satisfatórias. Esta estratégia foi empregada para que se pudesse verificar a previsibilidade do modelo quando transpostas as condições dos frascos para biorreator, e para que se pudessem estimar as perdas abióticas em tais experimentos. Subseqüentemente, outras bateladas simples foram conduzidas no intuito de estabelecer as condições de biodegradabilidade efetiva, seguindo valores ótimos apontados pelo modelo estatístico.

Uma vez estabelecidas as condições ótimas em biorreator, foram programadas bateladas simples e seqüenciais. Estas últimas consistiram em duas bateladas conduzidas com três e quatro ciclos, respectivamente,

avaliando-se a eficiência dos intervalos entre os ciclos e do número de ciclos na biodegradação do resíduo em estudo.

A partir dos estudos de biodegradação do resíduo oleoso por bateladas seqüenciais, utilizamos duas outras convenções bastante úteis na compreensão do fenômeno da biodegradação: a determinação da eficiência de biodegradação (E_B) e a determinação da eficiência específica de biodegradação (E_{EB}). A primeira, estima a redução percentual dos HTCD ao final de um determinado ciclo, em função dos HTCD presentes no início deste mesmo ciclo; a segunda, estima a biomassa efetivamente comprometida com a biodegradação através da relação entre a eficiência de biodegradação percentual (E_B) de um dado ciclo e a biomassa acumulada ao final deste ciclo. As taxas de biodegradação, por sua vez, foram determinadas pelo quociente entre a eficiência de biodegradação e o tempo de duração do ciclo.

Ao término das bateladas seqüenciais, selecionou-se aquela que mostrou maiores valores de eficiência específica de biodegradação e maiores taxas de biodegradação. Investigou-se também a redução da tensão superficial da fase aquosa. Avaliaram-se então o consumo de oxigênio por respirometria, as características ecotoxicológicas do material tratado, bem como as mudanças na comunidade microbiana mista ao longo desta batelada. Os resultados destes estudos foram comparados com os resultados obtidos na investigação da ecotoxicidade do resíduo oleoso não-tratado. Posteriormente, foram confrontados os resultados: dos ensaios respirométricos; dos estudos de diversidade microbiana; dos ensaios de ecotoxicidade e do abaixamento da tensão superficial da fase aquosa com os resultados de eficiência de biodegradação (E_B), de eficiência específica de biodegradação (E_{EB}), e com as taxas de biodegradação, a fim de se investigar possíveis relações entre as variações na comunidade ao longo do processo, e as mudanças nas características do meio reacional.

Assim, o presente capítulo está estruturado em seis tópicos principais, os quais descrevem pormenorizadamente as técnicas utilizadas, os métodos, os materiais, bem como as convenções adotadas, na mesma ordem em que foram apresentadas aqui. É importante também observarmos, que, na medida em que alguns experimentos são dependentes dos resultados de experimentos anteriores, as discussões do "porquê" da adoção de determinadas estratégias, e a utilização de determinados valores, são melhores discutidos no capítulo posterior (capítulo 6) de resultados e discussões.

5.1 Amostragem

Amostras de 20 litros do resíduo foram recolhidas de Tanques Auxiliares de Descarte (TAD) que são interligados aos tanques de armazenamento de derivados líquidos claros de petróleo, do terminal de armazenamento e distribuição da Petrobras Transportes (TRANSPETRO) em Suape, Pernambuco, Brasil (8º3,98'1,46"S; 34º9,65'0,19"W). A Figura 5.1 mostra esquematicamente o sistema de drenagem de resíduo.

5.2 Caracterização do Resíduo Oleoso

Com o objetivo de caracterizar o resíduo quanto à sua composição e propriedades, foram realizadas as análises químicas e físico-químicas: de cromatografia de fase gasosa com detecção por ionização de chamas (GC-FID), cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), análises de composição elementar (carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre - CHNS), análises de ressonância magnética nuclear por prótons ($RMNH^+$) e análises de massa específica, viscosidade cinemática e ponto de fulgor.

Para a caracterização ecotoxicológica do resíduo, foram realizados testes com microalgas de água doce, com estágios embriolarvais de ouriço-do-mar e ostras.

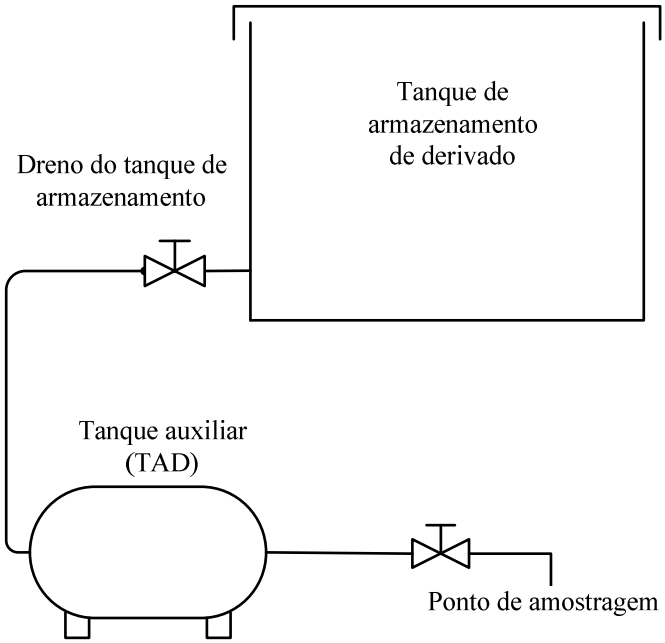


Figura 5.1: Esquema genérico do sistema de amostragem do resíduo oleoso

5.2.1 Caracterização Composicional e Físico-Química

Para investigação dos hidrocarbonetos presentes no resíduo, foram empregados métodos cromatográficos e espectrométricos de análises, utilizando a cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Para tal, foi utilizado o equipamento marca SHIMADZU modelo QP5050/GC17A, com sistema acoplado de cromatografia e espectrometria de massa, injeção automática de amostras, direcionamento de íons por sistema quadrupolo, tensão de 70.000 elétron-volts para fragmentação dos íons. A Tabela 5.1 mostra os parâmetros e condições analíticas do equipamento, bem como as especificações de seus componentes.

Tabela 5.1: Especificações do equipamento e condições das análises por GC-MS

Especificações do equipamento	
Marca	SHIMADZU®
Série	GCMS QP-5050 GC17-A
Biblioteca de massas	Willey Library®
Tensão de Fragmentação	70.000eV
Detector	Condutividade térmica – TCD
Parâmetros Operacionais do GC	**Descrição/valores**
Temperatura da interface GC-MS	280,0ºC
Modo de controle	Split
Pressão de entrada	56,7 Kpa
Fluxo da coluna	1,0mL. min^{-1}
Velocidade linear	36,5cm.seg^{-1}
Taxa de fracionamento (split)	1/50
Fluxo total	52,5mL. min^{-1}
Especificações da Coluna	**Descrição**
Nome / tipo	DB-5 ms
Composição	5% fenil metilpolissiloxano
Espessura	0,25µm
Comprimento	30,0m
Diâmetro interno	0,25mm

As amostras foram diluídas 10 vezes (concentração 10^{-1}) em cloreto de metileno (diclorometano - Merck®), e em seguida retiradas alíquotas e introduzidas no auto-injetor do cromatógrafo, sendo fracionada de 1/50 (split 1/50). Injeções de 1µL de amostra foram feitas automaticamente em triplicata. Manteve-se a temperatura inicial do forno a 40ºC por 4 minutos, sendo em seguida gradativamente aumentada a uma taxa de 5ºC por minuto até atingir 250ºC, e mantida a essa temperatura por 2 minutos. Subseqüentemente, foi aumentada novamente para 280ºC numa taxa de 10ºC por minuto, permanecendo nesta última temperatura por 4 minutos. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste. Para corroborar com as identificações dos hidrocarbonetos feitas pela biblioteca de massas, utilizou-se o padrão analítico interno DRH 0085s fornecido pela Accustandard® contendo alcanos de cadeia linear de C_8 a C_{40} e os alcanos ramificados pristano e fitano. As condições da rampa de aquecimento programada para eluição da amostra ao longo da coluna estão mostradas na Tabela 5.2.

Adicionalmente, utilizou-se o método de cromatografia por fase gasosa, com as condições otimizadas para o equipamento marca HP Agilent® modelo 6890N com detector por ionização de chama (GC-FID) o qual também foi utilizado posteriormente na avaliação da biodegradação dos hidrocarbonetos. A coluna utilizada foi a HP-5, a qual tem a mesma composição da coluna DB-5, utilizada nas análises por GC-MS. A rampa de aquecimento no método GC-FID está descrita na Tabela 5.3, abaixo.

Tabela 5.2: Parâmetros da rampa de aquecimento para análises por GCMS

Temperatura (ºC)	Aquecimento (ºC.min^{-1})	Permanência (minutos)
40	-	4
40 a 250	5	-
250	-	2
250 a 280	10	-
280	-	4

Tabela 5.3: Parâmetros da rampa de aquecimento utilizada nas análises por GC-FID

Temperatura (ºC)	Aquecimento (ºC.min^{-1})	Permanência (minutos)
50	-	1
50 a 300	10	-
300	-	4

Para investigar os grupos de compostos químicos predominantes, análises de ressonância magnética nuclear por prótons (RMN-H^{+}) foram realizadas. Tais análises foram conduzidas em equipamento marca Varian, modelo Unity Plus 300, cujos parâmetros e condições analíticas estão descritos na Tabela 5.4.

Para estudos posteriores da relação carbono: nitrogênio (C: N) foi realizada análise elementar, na determinação do percentual de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre (CHNS) presentes na amostra. Para tal, utilizou-se o equipamento marca Carlo Ebra, modelo CE - EA 1.110, dotado de coluna Porapac, atuando com temperatura de combustão de 1000ºC. Os parâmetros estão descritos na tabela 5.5.

Tabela 5.4: Condições das análises de $RMNH^+$

Marca	Varian
Modelo	Unity plus 300
Seqüência de pulso	S2pul
Solvente	$CDC\ell_3$
Tempo de espera	1,5s
Pulso	45,0º
Tempo de aquisição	2,5 segundos
Repetição	240 vezes
Observado	C13
Desacoplamento	H1
Potência	35 dB

Tabela 5.5: Condições analíticas para análise elementar

Marca	Carlo Ebra
Modelo	EA 1110
Temperatrura do forno	1000ºC
Coluna	PORAPAC

Na caracterização físico-química do resíduo oleoso, foram empregadas análises de ponto de fulgor (ASTM D 93), massa específica a 20/4ºC (ASTM D 1298), viscosidade cinemática (ASTM D 445) no laboratório de análises de combustíveis da Universidade Federal de Pernambuco (LAC- UFPE) e cor ASTM (ASTM D - 1500) nos laboratórios da Petrobrás Transportes S.A. (Transpetro) em Suape – Pernambuco.

5.2.2 Diversidade Microbiana no Resíduo não tratado e no Resíduo Tratado

A investigação da microbiota presente no resíduo se deu por técnicas clássicas de isolamento de microrganismos hidrocarbonoclásticos e tolerantes, e pela técnica molecular de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE - *Denaturing Gradient Gel Eletroforesis*) dos produtos de reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*) a partir do DNA total extraído.

- Técnicas Clássicas: Microrganismos Hidrocarbonoclásticos e Tolerantes

Os isolados microbianos foram obtidos a partir de pequenas modificações em metodologias consagradas (SEEGER *et al*, 1997;

HANSON *et al.* 1993; BRADDOCK & CATTERALL, 1999; BROWN & BRADDOCK, 1990). Para o isolamento por técnicas clássicas, foram adotadas estratégias de isolamento de microrganismos tolerantes e de microrganismos hidrocarbonoclásticos, as quais estão descritas a seguir.

Isolamento de microrganismos hidrocarbonoclásticos:

Foram amostrados 0,1mL do resíduo oleoso (conservado a 4ºC) e transferidos para placas de Petri em condições assépticas. Em seguida, foram adicionados sobre as placas 9,9mL de meio mineral de Bushnnell-Haas acrescido de agar, após o que, todo o conteúdo das placas foi homogeneizado (técnica *Pour plate*). As placas foram então incubadas a 30±2ºC, sendo feitas observações diárias.

Isolamento de bactérias e fungos tolerantes:

Foram utilizados os antibióticos nistatina e cloranfenicol, respectivamente, em meios de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*, Oxoid™) e TSA (*Tryptic Soy Agar*, Oxoid™). Em placas de Petri esterilizadas, foram introduzidos 0,1mL de resíduo oleoso, e em seguida acrescentados 9,9mL de meio de cultura e 100µL de antibiótico (10µg.mL^{-1} de nistatina para isolamento de bactérias e 40µg.mL^{-1} de cloranfenicol para isolamento de fungos), após o que, o conteúdo das placas foi homogeneizado e as mesmas foram incubadas a 30±2ºC.

Após 24 horas de incubação, as placas provenientes de ambos os procedimentos de isolamento foram retiradas para observação, e os diferentes morfotipos de colônias encontrados foram repicados em tubos de ensaio contendo meio de cultura fresco (PDA e TSA para tolerantes, e Büsnnell-Haas para hidrocarbonoclásticos). Posteriormente, as culturas foram caracterizadas morfologicamente através da microscopia óptica. Com relação ao tipo de parede celular dos isolados bacterianos, foi realizada a coloração diferencial pelo método de Gram, separando-os em dois grandes grupos com base na estrutura da parede celular. Estas

metodologias de observação foram baseadas em Cappuccino & Sherman (1996).

Para o resíduo tratado procedeu-se de forma semelhante à descrita acima, tendo-se utilizado sub-amostras de 0,1mL das amostras de resíduo tratado do final de cada ciclo dos experimentos em biorreator por batelada seqüencial.

- Ecologia Molecular Microbiana: DNA total / PCR / DGGE

A técnica de DGGE foi aplicada na determinação direta da diversidade genética de populações microbianas complexas tendo como base a eletroforese dos produtos de PCR em géis de poliacrilamida contendo gradiente crescente de agentes desnaturantes (uréia e formamida). Como determina a técnica, os fragmentos de mesmo tamanho e seqüências nucleotídicas diferentes foram separados pela diferença na mobilidade das moléculas após desnaturação química de seus domínios (ROSADO, 1997). As soluções, os reagentes e os meios utilizados na técnica de DGGE, estão descritos a seguir (Tabela 5.6).

Extração de DNA total das Amostras:

A extração de DNA do resíduo e dos tratamentos, foi realizada através do uso de Kit de extração (FastDNA® SPIN Kit for Soil) da BIO-101 (Califórnia, EUA) baseando-se na extração direta. Amostras de 0,5mL de resíduo não tratado previamente homogeneizadas foram utilizadas para a extração de DNA nesse kit. As amostras foram filtradas e em seguida as membranas foram recortadas e recolhidas em tubos de Eppendorf para aplicação das seqüencias de reagentes do *Kit* de extração FastDNA®.

A qualidade e pureza do DNA obtido foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). Amostras de DNA (5 µL) foram misturadas com 5µL de corante para eletroforese e aplicadas nos géis. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 90 V em tampão TBE

0,5x pelo período de 1hora e meia e, em seguida, foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz U.V. em um sistema de captura de imagem (IMAGO, B & L Systems).

Tabela 5.6: Reagentes, soluções, meios requeridos para DGGE.

Tampão TBE 1X	
Tris	89 mM
EDTA	2,5 mM
H_3BO_3	89 mM
Corante para Eletroforese de DNA	
Glicerol	50%
EDTA, pH 7,5	20 mM
Azul de bromofenol	0,05%
Xilenocianol	0,05%
Soluções do DGGE:	
Acrilamida/Bisacrilamida	40%
Acrilamida	38,93 g
Bisacrilamida	1,07 g
Tampão TAE 50x	
Trisma Base (Sigma)	2 M
Ácido acético glacial	1 M
EDTA	50 mM
Tampão TAE 0,5X	
Tris-acetato, pH 7,4.	20 mM
Acetato de sódio	10 mM
EDTA	0,5 mM
Solução desnaturante a 0% para gel a 6% de acrilamida	
Acrilamida/Bisacrilamida 40%	15 ml
Tampão TAE 50x	2 ml
Água bidestilada	83 ml
Solução desnaturante a 100% para gel a 6% de acrilamida	
Acrilamida/Bisacrilamida 40%	15 ml
Tampão TAE 50x	2 ml
Formamida deionizada	40 ml
Uréia	42 g
Água bi-destilada q.s.p	100 ml
Persulfato de amônio (APS) 10%	
Persulfato de amônio	0.1 g
Água destilada	1 ml

Reação em Cadeia da Polimerase – PCR:

Após a constatação da pureza das amostras por eletroforese, estas amostras foram submetidas a uma reação de amplificação do fragmento do gene *rrs* que codifica para o rRNA 16S. Para a amplificação do fragmento do gene que codifica para o rRNA 16S foram utilizados os iniciadores: U968f-GC ("grampo" + 5' AAC GCG AAG AAC CTT AC 3') e L1401r (5' GCG TGT GTA CAA GAC CC 3') (NUBEL, 1999). O iniciador U968f é homólogo à região 968-984 do gene rDNA de *Escherichia coli*, enquanto que o iniciador L1401 é homólogo a região 1385-1401 deste mesmo gene. Estes iniciadores amplificam a região da alça V6-V8 do RNA ribossomal, que é mais variada do que as outras regiões descritas na literatura (WATANABE, 2001). As misturas foram feitas para um volume final de amostra de 50μL (concentrações de cada reagente apresentadas na Tabela 5.7).

Tabela 5.7: Concentrações dos reagentes do PCR – 16S (U968-L1401)

Reagente	Concentração	Volume
Tampão	10x	5,0μL
$MgCl_2$	25 mM	5,0μL
DNTPs	10 mM	1,0μL
Primer Forward	10μM	1μL (ρmol/50μL)
Primer Reverse	10μM	1μL (ρmol/50μL)
BSA	10mg/mL	0,5μL
Formamida	100%	0,5μL
Taq	5 U/μL	0,5μL

O programa de PCR utilizado foi iniciado com um ciclo de desnaturação das fitas de DNA a 94ºC por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94ºC por 1 minuto, 55ºC por 1minuto e 72ºC por 2 minutos. O ciclo de extensão final foi de 10 minutos a 72ºC (PEIXOTO, 2002).

Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes – DGGE

Os géis de DGGE foram preparados com solução de poliacrilamida (6%) em tampão Tris-Acetato (pH 8,3). Foi estabelecido um gradiente de 40 a 70% de desnaturantes químicos (formamida e uréia). As amostras foram aplicadas em "Dcode TM Universal Mutation Detection System" e,

em seguida, este gel foi submetido a uma corrida a 220V por 6 horas. Posteriormente estes géis foram corados com SYBR GREEN (*Molecular Probes*) diluído na razão de 1/10.000 em tampão TAE 1x, segundo especificação do fabricante, por aproximadamente 40 minutos. Em seguida, os géis foram observados sob luz U.V. e fotografados em um sistema de captura de imagem STORM (Pharmacia, Amersham™) para a construção dos dendrogramas.

Com a imagem digitalizada dos géis, foi feita uma análise para gerar o perfil densitométrico das bandas, utilizando o *software Image Quant*™ (v 5.2). As bandas foram consideradas para a construção da matriz, quando a altura do pico, referente a uma intensidade, não excedia 1% do somatório de todas as alturas identificadas, de acordo com o protocolo descrito por Iwamoto (IWAMOTO, 2000). Com a matriz de presença e ausência de bandas obtida, foi feita a análise de grupo. Os cálculos de similaridade foram baseados no coeficiente de Pearson, que corresponde à medida de distância. O coeficiente de correlação de Pearson é altamente recomendado para a análise dos perfis gerados pela técnica de DGGE (Nübel, 1996). Foi utilizado o método de UPGA para o cálculo de agrupamento no dendrograma gerado para o gel, utilizando o Software Statistica™ for Windows v. 5.1 (Statsoft, USA).

OBSERVAÇÃO: Para a investigação da diversidade das populações microbianas complexas presentes no resíduo tratado após os ciclos da batelada seqüencial Sq_{02}, foram empregados os mesmos procedimentos experimentais aplicados na investigação do resíduo não tratado acima descrito. Diferindo-se apenas na amostragem, onde foram utilizadas amostras provenientes dos quatro ciclos da batelada seqüencial S_{q02}, a qual foi escolhida por apresentar maior eficiência específica de biodegradação (E_{EB}), e maior taxa de biodegradação (discussão no capítulo 6). Estes ensaios foram realizados com o intuito de investigar os filotipos presentes no resíduo importantes no processo de biodegradação e avaliar sua dinâmica ao longo dos ciclos na batelada seqüencial.

As amostras foram retiradas do biorreator pelo sistema coletor, em volume aproximado de 5mL. Para a extração do DNA total, 0,5mL destas amostras foram filtrados em membranas poliméricas as quais foram recortadas e em seguida os fragmentos recolhidos em tubos de Eppendorf, para proceder-se à extração com o *kit* Fast-DNA®.

Após a extração e posterior corrida em gel de poliacrilamida, as bandas mais significativas foram cortadas e em seguida foi realizado um seqüenciamento dos segmentos mais representativos (tanto para o resíduo não tratado como para o resíduo tratado). Após o seqüenciamento, as seqüências de DNA reveladas foram insvestigadas através do sistema de busca *BLAST-N*, e mostradas as identificações e seus respectivos índices de similaridade, comparando-se com o banco de dados *GenBank*.

5.3 Ensaios em Frascos Agitados

Seleção da Fonte de Nitrogênio

Foi realizada uma avaliação da fonte de nitrogênio mais eficiente no processo de biodegradação. Para tal, foram planejados experimentos univariados, com as fontes de nitrogênio: nitrato de amônio (NH_4NO_3), uréia ($[NH_2]_2CO$) e nitrato de sódio ($NaNO_3$). Estes experimentos foram montados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 45 mL de meio mineral de Büshnnel-Haas, 5mL de resíduo oleoso, e relação C:N de 50:1. A velocidade de agitação utilizada foi de 150rpm. Foram feitas cinco réplicas e os frascos foram mantidos nessas condições descritas por 15 dias. A fim de se estimar as perdas abióticas, foram realizados três controles abióticos (um para cada fonte de nitrogênio) a partir de amostras de resíduo oleoso filtrado em membrana de acetato-celulose de 0,45μm. A variável resposta utilizada foi o percentual de redução das áreas totais sob os picos cromatográficos de cada corrida, utilizando como referência a área total dos picos cromatográficos do resíduo dos controles.

Por convenção, esta variável foi designada como percentual de redução de HTCD (Hidrocarbonetos Totais Cromatograficamente Disponíveis).

De acordo com a massa específica e o percentual em massa do resíduo oleoso (854,2 $Kg.m^{-3}$ e 78,87%, respectivamente) encontrou-se o valor de 0,6737g de carbono por cm^3 de resíduo, de acordo com a Equação 5.1.

$$[\rho_C] = \frac{\rho.[\%C]}{100} \qquad \text{Equação 5.1}$$

Onde $[\rho_C]$ = densidade relativa de carbono em gramas por cm^3; ρ = densidade da amostra em gramas por cm^3 e $[\%C]$ = percentual em massa de carbono na amostra.

Os cálculos para as massas de nitrato de amônio (NH_4NO_3), uréia ($[NH_2]_2CO$) e nitrato de sódio ($NaNO_3$) utilizadas em cada condição, são dados pelas Equações 5.2, 5.3 e 5.4 e as massas das fontes de nitrogênio utilizadas de acordo com os cálculos descritos estão mostradas na Tabela 5.8.

$$mNH_4NO_3 = \left(\frac{[C].V_r.80}{C/N}\right) \Big/ 28 \qquad \text{Equação 5.2}$$

$$mNaNO_3 = \left(\frac{[C].V_r.85}{C/N}\right) \Big/ 14 \qquad \text{Equação 5.3}$$

$$m(NH_2)_2CO = \left(\frac{[C].V_r.60}{C/N}\right) \Big/ 28 \qquad \text{Equação 5.4}$$

Onde: mNH_4NO_3 = massa de nitrato de amônio requerida; $mNaNO_3$ = massa de nitrato de sódio requerida; $m(NH_2)_2CO$ = massa de uréia requerida; $[C]$ = concentração de carbono no resíduo em gramas por cm^3; V_r = volume de resíduo em mililitros; C/N = proporção de C na relação carbono-nitrogênio.

Tabela 5.8: Massas dos sais nas condições: C/N 50/1; volume de resíduo 5mL; volume útil 50mL; velocidade de agitação 250rpm e temperatura 30ºC

Fonte de Nitrogênio	Massa (g)
$NaNO_3$	0,209
NH_4NO_3	0,192
$(NH_2)_2CO$	0,144

Planejamentos Estatísticos Fatoriais Fracionados

Para investigação dos parâmetros importantes no processo de biodegradação do resíduo oleoso, foram realizados dois planejamentos estatísticos fatoriais fracionados (FFD - *Factorial Fractional Design*) com o auxílio do *software Statistica*™ versão 6.0.

Primeiramente, montou-se um planejamento fatorial fracionado com dois níveis e quatro fatores (2^{4-1}): pH inicial, relação carbono-nitrogênio (C:N), relação volume de trabalho/capacidade do frasco (Aeração) e concentração inicial de resíduo (Carga Orgânica). Os experimentos foram conduzidos em duplicata e com um ponto central, totalizando dezoito corridas, realizadas em frascos de Erlenmeyer de 500mL em agitador rotativo com ajuste de temperatura a 28±1ºC sob agitação de 150rpm por 14 dias. A variável resposta utilizada foi também o percentual de redução dos HTCD.

Para ajuste dos valores da variável Aeração, utilizou-se como referência a relação entre o volume útil e a capacidade dos frascos (*head space*). Assim, codificou-se o valor mínimo 1, como sendo aquele que fornece menor condição de aeração, representando a relação de volume útil/capacidade do frasco de 100/500; e ao nível superior o valor 2, representando a relação de volume útil / capacidade do frasco de 50/500, e o nível intermediário o valor 1,5 representando a relação 75/500. A tabela 5.9 a seguir mostra os valores máximos, centrais e mínimos de cada uma das variáveis de interesse, indicando sua representação no planejamento.

De acordo com as combinações produzidas aleatoriamente, volumes variáveis de meio mineral de Büshnnell-Haas modificado e de resíduo oleoso, foram adicionados a cada frasco a fim de satisfazer às diferentes condições de aeração, concentração inicial de resíduo e relação

C:N. Por conseqüência variou-se a concentração de nitrato de amônio (NH_4NO_3) no meio mineral, bem como o volume total em cada frasco. Essas variações estão mostradas na tabela 5.10.

Tabela 5.9: Planejamento experimental FFD 2^{4-1}: valores mínimos, centrais e máximos

VARIÁVEL	Representação	Valor Mínimo	Ponto Central	Valor Máximo
Aeração*	Aeração	1 (100mL)*	1,5 (75mL)*	2 (50mL)*
pH	pH	5,50	6,75	8,00
Concentração inicial de resíduo (%v)	Carga Orgânica	10,00	25,00	40,00
Relação carbono:nitrogênio	C:N	50,00	275,00	500,00

*Observação: à variável aeração, foram atribuídos os valores relativos, 1, 2 e 3, que representam os níveis inferior, intermediário e superior respectivamente, contendo as quantidades de meio nos frascos de 100, 75 e 50mL. Assim, o nível 1 apresenta menor aeração, haja vista que, do três níveis, é o que apresenta o maior volume de meio para o mesmo frasco de 500mL; o nível 2 é intermediário, por apresentar 75 mL de meio no frasco de 500mL, e o nível 3 fornece a melhor condição de aeração por apresentar 50mL de meio distribuídos no mesmo frasco de 500mL, sendo este o nível superior de aeração.

Tabela 5.10 – Quantidades de meio, resíduo e NH_4NO_3 para as condições exigidas no planejamento FFD 2^{4-1}

Corrida	Ajustes				Condição			
	Volume de trabalho (mL)	Volume de meio (mL)	Volume de resíduo (mL)	Massa de NH_4NO_3 (g)	Carga Orgânica	Aeração	C:N	pH
1	100	90,0	10,0	0,382	10	1	50	5,50
2	50	45,0	5,0	0,019	10	3	500	5,50
3	100	90,0	10,0	0,038	10	1	500	8,00
4	50	45,0	5,0	0,192	10	3	50	8,00
5	100	60,0	40,0	0,153	40	1	500	5,50
6	50	30,0	20,0	0,768	40	3	50	5,50
7	100	60,0	40,0	1,539	40	1	50	8,00
8	50	30,0	20,0	0,076	40	3	500	8,00
9	75	56,25	18,75	0,481	25	2	275	6,75

Assim como detalhado para a composição das relações C:N nos experimentos univariados, o valor percentual de carbono aplicado para a amostra de resíduo foi de 78,87%, e a densidade da amostra é de 854,2 $Kg.m^{-3}$, encontrando-se o valor de 0,6737g de carbono por cm^3 de resíduo,

de acordo com a equação 5.1, mostrada anteriormente. O cálculo para a massa de nitrato de amônio utilizada em cada condição é dado pela equação 5.2, também já mencionada. Cabe lembrar que os valores de densidade do resíduo bem como de percentual de carbono, são discutidos no capítulo de resultados e discussão.

A Tabela 5.11 abaixo mostra a composição original do meio de Büshnnell-Haas segundo Atlas (1995a), o qual foi adaptado para utilização nos experimentos em frascos agitados.

Tabela 5.11: Meio mineral de Büshnnell-Haas (ATLAS 1995b)

Componente	
KH_2PO_4	1,00g
K_2HPO_4	1,00g
NH_4NO_3	1,00g
$MgSO_4.7H_2O$	0,20g
$FeCl_3$	0,05g
$CaCl_2.2H_2O$	0,02g
Água destilada	1000,00 mL
pH 7,0±0,2	

O segundo planejamento foi realizado após análise e avaliação da influência da variável concentração inicial de resíduo no planejamento anterior (discussão no capítulo seguinte). Utilizou-se o planejamento fatorial fracionado com três níveis e quatro fatores (FFD 3^{4-1}), em duplicata, totalizando 54 corridas. As variáveis independentes estudadas foram: Carga Orgânica, Agitação, Relação carbono-nitrogênio (C:N) e pH, as quais estão mostradas, com seus respectivos níveis, na tabela 5.12. Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 500mL submetidos à temperatura de 28±1ºC, volume de trabalho de 100mL, durante 14 dias (Figura 5.2).

Os ajustes de quantidade de meio de cultura, massa de nitrato de amônio para ajuste da relação C:N, e volume de resíduo, foram feitos de acordo com o descrito anteriormente para o planejamento FFD 2^{4-1}.

Figura 5.2: Agitador rotativo para os ensaios com frascos agitados

Tabela 5.12: Variáveis e níveis estudados: Planejamento fatorial fracionado 3^{4-1}

Variáveis	Níveis		
	Inferior	Intermediário	Superior
pH inicial	5,50	6,75	8,00
Relação C:N	50:1	425:1	800:1
Carga Orgânica	10	40	70
Agitação	50	150	250

Na Tabela 5.13, estão mostradas as condições e as quantidades ajustadas de nitrato de amônio (NH_4NO_3), meio mineral e resíduo, a fim de satisfazer as condições requeridas no planejamento fatorial fracionado com três níveis e quatro fatores (FFD 3^{4-1}).

A fim de se determinar as perdas abióticas para cada condição estabelecida na Tabela 5.13 a seguir, bem como para se determinar a perda abiótica média, foram realizadas 27 corridas em paralelo nas mesmas condições de temperatura, agitação e tempo total de processo para cada frasco, com o resíduo filtrado em membrana biológica de acetato-celulose com porosidade de 0,45μm. Procedimento semelhante foi adotado na estimativa das perdas abióticas no FFD 2^{4-1}, sendo realizadas neste caso 9 corridas adicionais.

Tabela 5.13: Quantidades de meio, resíduo e NH_4NO_3 para as condições exigidas no planejamento FFD 3^{4-1}

Corrida	Ajustes			Condição			
	Volume de meio (mL)	Volume de resíduo (mL)	Massa de NH_4NO_3 (g)	pH	C:N	Carga Orgânica	Velocidade de Agitação
1	135,0	15,0	0,57	5,5	50	10	50
2	90,0	60,0	2,30	5,5	50	40	250
3	45,0	105,0	4,04	5,5	50	70	50
4	135,0	15,0	0,06	5,5	425	10	250
5	90,0	60,0	0,27	5,5	425	40	50
6	45,0	105,0	0,47	5,5	425	70	50
7	135,0	15,0	0,03	5,5	800	10	150
8	90,0	60,0	0,14	5,5	800	40	50
9	45,0	105,0	0,25	5,5	800	70	250
10	135,0	15,0	0,57	6,7	50	10	250
11	90,0	60,0	2,31	6,75	50	40	150
12	45,0	105,0	4,04	6,75	50	70	50
13	135,0	15,0	0,07	6,75	425	10	150
14	90,0	60,0	0,27	6,75	425	40	50
15	45,0	105,0	0,47	6,75	425	70	250
16	135,0	15,0	0,04	6,75	800	10	50
17	90,0	60,0	0,14	6,75	800	40	250
18	45,0	105,0	0,25	6,75	800	70	150
19	135,0	15,0	0,57	8,0	50	10	150
20	90,0	60,0	2,31	8,0	50	40	50
21	45,0	105,0	4,04	8,0	50	70	250
22	135,0	15,0	0,06	8,0	425	10	50
23	90,0	60,0	0,27	8,0	425	40	250
24	45,0	105,0	0,47	8,0	425	70	150
25	135,0	15,0	0,04	8,0	800	10	250
26	90,0	60,0	0,14	8,0	800	40	150
27	45,0	105,0	0,25	8,0	800	70	50

5.4 Experimentos em Biorreator

Os experimentos em biorreator foram conduzidos em duas etapas: a primeira etapa, consistiu na realização de bateladas de ajuste em condições extremas (condições em que o percentual de redução dos HTCD seria mínimo) previstas pelo modelo estatístico gerado,

objetivando-se a verificação da transposição de escala para experimentos em biorreator, a determinação das perdas de água e de resíduo oleoso por volatilização, a padronização e validação do sistema de amostragem e, por conseguinte, a verificação da relação agitação/aeração que melhor favorecesse a biodegradação. A segunda etapa consistiu na condução de bateladas simples e seqüenciais com parâmetros definidos e ajustados de acordo com os resultados das bateladas iniciais.

As bateladas foram conduzidas em biorreator modelo Biostat B® Bioreactor (*B. Braun Biotechnology International*). O biorreator consistiu em recipiente de vidro de 5 litros, coberto, com fundo redondo, volume útil de 3 litros. A porta central foi ocupada por um agitador mecânico com um par de impelidores do tipo turbinas de Houston. Numa segunda porta, localizou-se o tubo de suprimento de ar, com anel para difusão, através do qual o ar foi passado para prover o oxigênio. O ar foi primeiro passado por um sistema umidificador cuja finalidade foi a de minimizar a evaporação. Uma terceira porta foi utilizada para transferir o resíduo oleoso, a qual permaneceu vedada quando não estava em uso. A quarta e a quinta portas foram utilizadas para medir o pH e oxigênio dissolvido, respectivamente. Para a conexão com o sistema de exaustão de gases / vapores do reator, foi utilizada uma sexta porta, a qual continha um filtro SepPAK™ C_{18} acoplado para coleta dos compostos voláteis. Duas outras portas foram utilizadas para dar suporte ao controle de pH por intermédio da adição automática de hidróxido de sódio 2N (NaOH) e ácido clorídrico 2N (HCℓ). Todas as conexões foram devidamente vedadas para minimizar a emissão de compostos voláteis e de líquidos.

5.4.1 Ajustes das Condições Operacionais

Três bateladas de ajuste, designadas, respectivamente, SA_{01}, SA_{02} e SA_{03}, foram conduzidas. Na primeira delas, utilizou-se uma carga orgânica inicial de 30% v/v, e relação C:N de 5:1. Estes valores de carga orgânica e relação C:N, segundo o modelo estatístico gerado, não

produziriam efeito significativo na degradação do resíduo (discussão do modelo no capítulo 6). A velocidade inicial de agitação foi ajustada para 500rpm, o percentual de oxigênio dissolvido, para 74%, e a taxa de aeração 1,5vvm, na primeira batelada. Estas condições foram modificadas nas outras duas bateladas subseqüentes, de acordo com os resultados obtidos de perdas por volatilização. O tempo total de processo foi de 200 horas. Os parâmetros das bateladas de ajuste estão descritos na Tabela 5.14.

Tabela 5.14: Condições operacionais do biorreator nas bateladas de ajuste

Parâmetro	Batelada		
	SA_{01}	SA_{02}	SA_{03}
Velocidade inicial de agitação (RPM)	500	300	300
Taxa de aeração (vvm)	1,5	0,5	0,5
Percentual de oxigênio dissolvido (%)	74	35	35
Temperatura (ºC)	30±1	30±1	30±1
pH	7,0±0,2	7,0±0,2	7,0±0,2
Volume útil (L)	3,0	3,0	3,0
Carga orgânica (%v/v)	30	30	10
Relação C:N	5:1	5:1	5:1

A figura 5.3 abaixo mostra a montagem do biorreator.

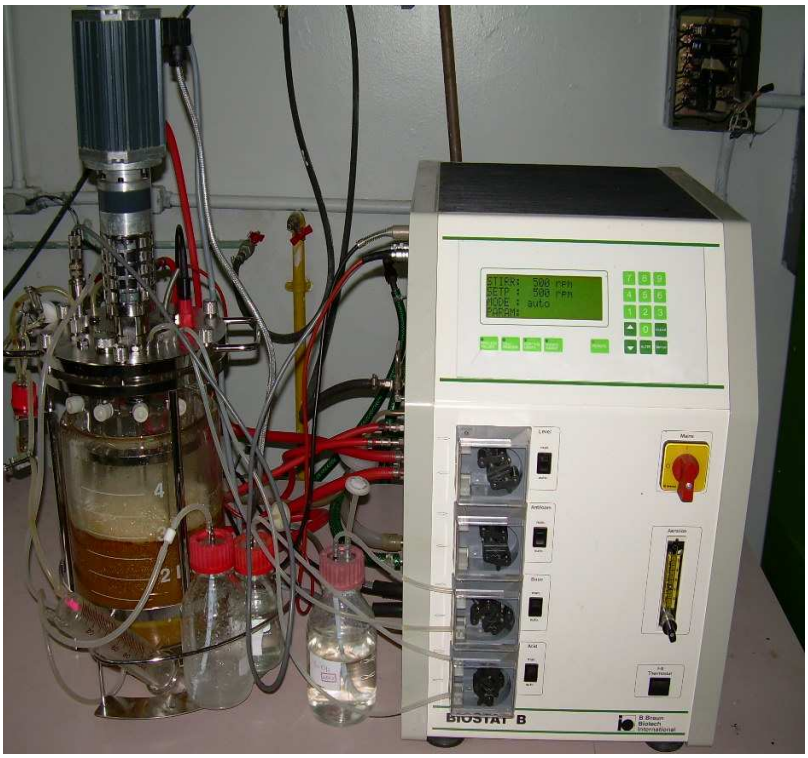


Figura 5.3: Montagem do biorreator

5.4.2 Bateladas Simples e Seqüenciais

Foi realizada uma batelada simples designada S_{01} e duas bateladas seqüenciais com três e quatro ciclos, designadas S_{q01} e S_{q02}, respectivamente. Após cada ciclo das bateladas seqüenciais, foi avaliada a eficiência de biodegradação (E_B), a eficiência específica de biodegradação (E_{EB}), a taxa de biodegradação a cada ciclo das bateladas seqüenciais, e a tensão superficial da fase aquosa. A ecotoxicidade da fração solúvel em água (FSA) foi investigada apenas no resíduo não-tratado e nos ciclos 2 e 4 da batelada seqüencial Sq_{02}. A avaliação da tensão superficial na batelada simples foi realizada no iníco e no final de cada batelada. As condições da batelada simples e das bateladas seqüenciais estão descritas na Tabela 5.15.

Tabela 5.15: Parâmetros das bateladas simples e seqüenciais

Parâmetro	Batelada		
	S_{01}	S_{q01}	S_{q02}
Velocidade inicial de agitação (RPM)	300	300	300
Taxa de aeração (vvm)	0,5	0,5	0,5
Percentual de oxigênio dissolvido (%)	35	35	35
Temperatura (ºC)	30±1	30±1	30±1
pH	7,0±0,2	7,0±0,2	7,0±0,2
Volume útil (L)	3,0	3,0	3,0
Carga orgânica (% v/v)	10	10	10
Relação C:N	300:1	300:1	300:1
Número de ciclos	-	3	4

5.4.3 Ensaios de Respirometria

Para avaliar a extensão do consumo de oxigênio associado ao crescimento e à biodegradação do resíduo oleoso pela microbiota, lançou-se mão de métodos respirométricos. Os experimentos envolvendo respirometria foram conduzidos em respirômetro, modelo BI 2000, *Bioscience Company™, Pensylvania* EUA, equipado com frascos com capacidade máxima de 1000 mL. Adotou-se a estratégia de avaliação do perfil de consumo de oxigênio pela microbiota não aclimatada presente no resíduo (não-tratado) comparando-se com o perfil de consumo de

oxigênio da microbiota aclimatada proveniente do material tratado do final dos ciclos 1, 2, 3 e 4 da batelada Sq_{02}.

Ao final de cada ciclo citado, foram retiradas alíquotas de 50mL da fase aquosa, constituindo assim o inóculo, e adicionados aos frascos de respirômetro, juntamente com 50mL do resíduo, e 400mL de meio mineral de Bushnnell-Haas. Para o experimento com resíduo não tratado utilizou-se apenas 50mL de resíduo e 450mL de meio mineral. As condições experimentais do respirômetro estão descritas na Tabela 5.16.

Tabela 5.16: condições operacionais do respirômetro

Parâmetros	Valores
Intervalo de aquisição de dados	0,05 h
Volume útil	500mL
Temperatura	30±1ºC
pH	7,0±0,2
Relação C:N	300:1
Inóculo (%v/v)	10%
Carga orgânica (%v/v)	10%

5.4.4 Determinações Analíticas

▪ Amostragem e Preparação das amostras do Biorreator

As amostras foram retiradas do biorreator através de um sistema de amostragem próprio, utilizando-se uma seringa de 20mL, acoplada ao tubo coletor de amostras, o qual alimentava uma linha de amostragem por diferença de pressão entre o interior do biorreator e o meio externo (Figura 5.4). As amostras foram coletadas a cada 10 horas para as bateladas SA_{01}, SA_{02}, SA_{03}, S_{01} e S_{q01}, e a cada 12 horas para a batelada S_{q02}, em volume aproximado de 5mL, e adicionados volumes de 4mL a 6mL de diclorometano nas amostras que eram retiradas ao final de cada ciclo para as bateladas seqüenciais, e nas amostras iniciais e finais das bateladas simples e simples de ajuste. Eram registrados os volumes de diclorometano, de amostra coletada, bem como o volume da fase orgânica obtida.

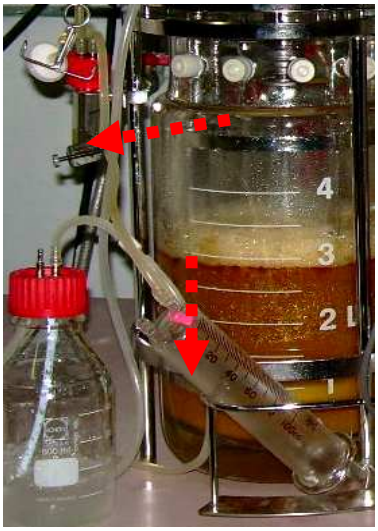


Figura 5.4: Sistema de amostragem do biorreator

A partir da adição do diclorometano, as amostras eram subdivididas em duas: 1) uma contendo a fase aquosa, na qual foi realizada a quantificação de biomassa; 2) outra contendo a fase orgânica, da qual era retirada uma alíquota para avaliação da biodegradação.

- Quantificação de Biomassa

Da fase aquosa eram retirados 3mL e em seguida centrifugados a 10.000 rpm, a 10ºC por 20 minutos. O material centrifugado era filtrado em membrana de 0,45μm (devidamente tarada) e seca a 80ºC, por, no mínino 24h, até massa constante.

- Avaliação da Eficiência de Biodegradação (E_B), Eficiência Específica de Biodegradação (E_{EB}) e taxa de Biodegradação

Da fase orgânica, era retirado 1μL, e injetado no CG-FID. Tal qual na caracterização dos hidrocarbonetos presentes no resíduo não tratado, utilizou-se também o método de cromatografia por fase gasosa, com as mesmas condições descritas, e a mesma rampa de aquecimento. Para avaliar a redução dos HTCD, calculou-se a eficiência de biodegradação (E_B). A E_B é representada pelo quociente entre a área total dos picos dos HTCD de um dado ponto amostral, e a área total dos HTCD de um ponto

inicial de amostragem (no caso das bateladas seqüenciais, os pontos iniciais são aqueles imediatamente após a carga do biorreator) como descrito na Equação 5.5 a seguir:

$$E_B = 100 - \left(\frac{A_{tc}}{A_{tc0}} .100 \right) \qquad \text{Equação 5.5}$$

Onde: A_{tc} = área total corrigida dos HTCD de um ponto amostral; A_{tc0}= área total corrigida dos HTCD do ponto inicial do processo.

Para a avaliação da biomassa média efetivamente comprometida com o processo de biodegradação dos HTCD a cada ciclo nas bateladas S_{q01} e S_{q02}, determinou-se a eficiência específica de biodegradação (E_{EB}) que, por convenção, assumimos como sendo o quociente entre a E_B ao final de cada ciclo e a biomassa acumulada ao final de cada ciclo (Equação 5.6).

$$E_{EB} = \frac{E_B}{m_B} \qquad \text{Equação 5.6}$$

Onde: E_{EB}= eficiência específica de biodegradaçãon (em %.g^{-1}); mB = biomassa ao final do ciclo; E_B= eficiência de biodegradação (percentual)

- Validação da amostragem em biorreator

Devido à heterogeneidade do sistema, a técnica de amostragem realizada diretamente no biorreator foi avaliada quanto à sua reprodutibilidade. Foram recolhidas cinco amostras em intervalos de tempo próximos, cujos volumes foram medidos e em seguida foi adicionado volume conhecido de diclorometano. Os volumes das fases orgânicas totais foram registrados. As áreas totais dos picos cromatográficos gerados por cada amostra injetada foram registradas e corrigidas pelo fator de correção determinado pela Equação 5.7.

A Tabela 5.17 mostra os valores obtidos na validação da amostragem, indicando média, desvio padrão e desvio percentual.

$$A_{tc} = {V_{FO}}/{V_{am}}.A_t \qquad \text{Equação 5.7}$$

Onde A_{tc}= área total corrigida; V_{FO} = volume da fase orgânica depois de adicionado diclorometano à amostra; V_{am} é o volume de amostra coletado e A_t é a área total dos picos cromatográficos após a injeção.

Tabela 5.17: Validação da amostragem em biorreator

Repetição	Volume amostra	Volume solvente	Volume fase orgânica	Área picos (sinal *p*A)	Área corrigida
1	5,5	4,7	8,5	1,72±0,3	2,66
2	3,6	3,5	7,8	1,64±0,08	2,64
3	6,0	3,0	7,0	2,06±0,06	2,40
4	3,9	6,0	8,5	1,31±0,02	2,86
5	5,4	3,6	7,5	2,14±0,04	2,97
Média = 2,71; Desvio padrão = 0,22; Desvio percentual = 8,08%					

▪ Determinação da Tensão Superficial da Fase Aquosa

Para se determinar a tensão superficial da fase aquosa do material tratado, foram retiradas amostras de cinqüenta mililitros deste material e procedeu-se às análises pelo método DüNoy (ASTM, 1999), em equipamento marca Krüss modelo K-11 (Figura 5.5). O equipamento foi programado para realizar cinco leituras por amostra, admitindo desvio padrão menor ou igual a 0,2.

Figura 5.5: Tensiômetro Krüss – método do anel (ASTM D - 971)

5.5 Ensaios de Ecotoxicidade

O resíduo oleoso foi investigado quanto à sua toxicidade para organismos representativos da biota local. Foram amostrados cerca de 150mL de material proveniente do biorreator ao final dos ciclos 2 e 4 da batelada Sq_{02} e em seguida, a fase orgânica destas amostras foi extraída com 150mL de hexano. A extração foi realizada em três vezes, utilizando-se 50mL de hexano em cada vez, em funil de decantação.

Em função da extração do material biodegradado ter sido feita com hexano, os ensaios também foram realizados com este solvente, a fim de se estudar sua influência na toxicidade do material extraído.

Os ensaios foram realizados em duas etapas:

Primeira etapa - consistiu na extração da fração solúvel do resíduo na fase aquosa ou fração solúvel em água (FSA); Segunda etapa - consistiu nos ensaios ecotoxiclógicos propriamente ditos, os quais foram realizados com os organismos-teste *Crassostrea rhizohophorae*, *Echinometra lucunter* e *Pseudokirchneriella subcaptata*.

1ª Etapa: Obtenção da FSA

Foram utilizados frascos tipo Mariott com capacidade para 500mL e 1000mL. Para os ensaios com ouriço-do-mar (*E. lucunter*) e com ostras (*C. rhizophorae*), utilizou-se água do mar filtrada e esterilizada com salinidade ajustada para 28‰. Para os ensaios com microalgas (*P. subcaptata*), utilizou-se água destilada esterilizada. Nos respectivos frascos adicionou-se 10% v/v do resíduo a ser testado. Deixou-se agitar o volume de cada frasco por 24 horas com o auxílio de barras magnéticas, criando-se um vórtex de aproximadamente ⅓ da altura da coluna de líquido, como indicado pela seta na Figura 5.6. Após esse período, foram retirados volumes da fração solúvel em água (FSA) para proceder às diluições.

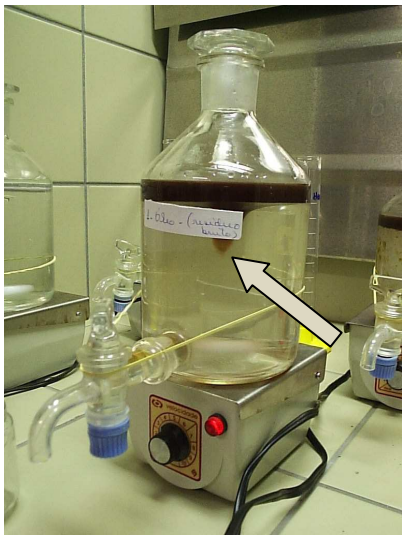


Figura 5.6: Obtenção FSA: Agitação em Frascos Mariott

2ª Etapa: Ensaios Ecotoxicológicos a partir da FSA

Após a extração da fração solúvel em água, procedeu-se aos testes específicos de ecotoxicidade, descritos a seguir:

5.5.1 Testes com Embriões de Ouriço-do-Mar *Echinometra lucunter* (LINNAEUS, 1758)

Cerca de vinte e cinco indivíduos adultos da espécie de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* foram coletados por mergulho na região da Praia da Barra em Salvador, Bahia – Brasil (12º 97'33"S e 38º 51'33"W) (figura 5.7).

Figura 5.7: Espécimes de *E. lucunter* em habitat natural, Praia da Barra (Salvador, Bahia, Brasil: 12º 97'33"S e 38º 51'33"W)

Escopo do teste:

O teste consistiu na exposição de ovos de ouriço em divisão a várias concentrações de amostras líquidas contendo fração solúvel dos agentes estressores, por um período de 36 horas. Após esse período, foram contabilizados os embriões com anormalidades no seu desenvolvimento, e reportados em termos de percentual de anormalidade. A Figura 5.8 mostra embriões de *E. lucunter* com desenvolvimento normal e anormal. Para o cálculo da concentração efetiva do poluente que causa anormalidades em 50% da população de embriões testada (CE_{50}), utilizaram-se os métodos estatísticos *Probit* e *Trimmed Spearman Karber* (HAMILTON *et al.*, 1977).

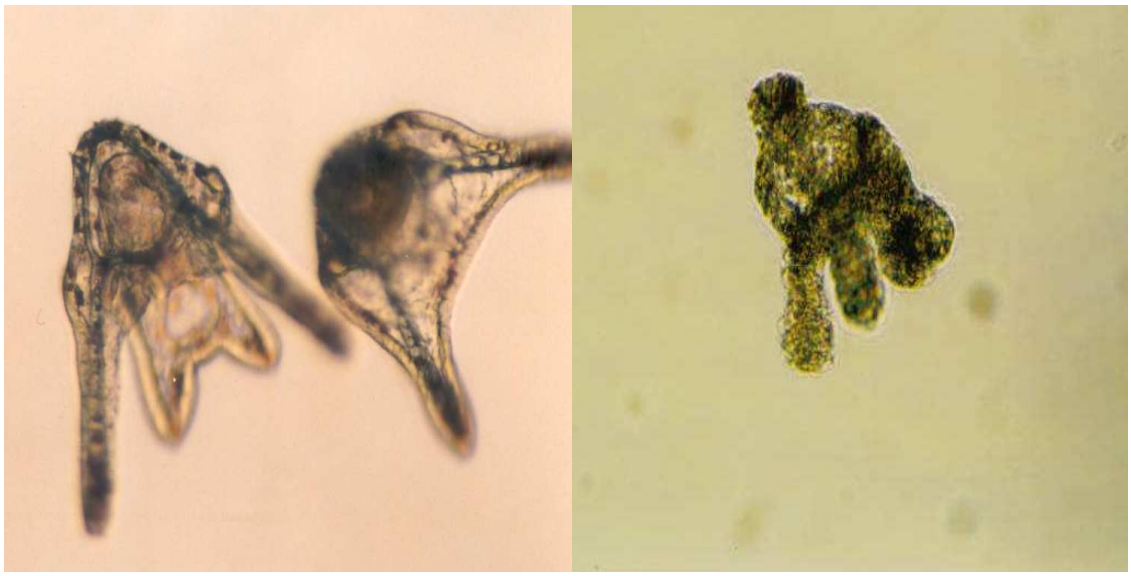


Figura 5.8: Embrião de *E. lucunter* (desenvolvimento normal: esquerda; desenvolvimento anormal: direita)

Obtenção dos Gametas:

Após a coleta, os indivíduos foram previamente lavados com água de diluição (água do mar esterilizada). Em seguida injetou-se aproximadamente 2,5mL de uma solução de cloreto de potássio (KCℓ) 0,5M em pontos diametralmente opostos na região perioral. Após a injeção de KCℓ os indivíduos foram colocados em bandejas plásticas e separados os machos das fêmeas. Os óvulos, diferenciados dos

espermatozóides pela coloração amarelo-alaranjada, foram coletados diretamente do meio e foram retiradas sub-amostras com pipeta Pasteur. O esperma, de coloração branca, foi coletado diretamente com pipeta Pasteur e colocado em béquer de 30mL, proporcionando uma solução de esperma com 0,5mL de esperma para 25mL de água do mar.

Fecundação dos Gametas:

Da solução de esperma foram retirados de 1 a 2mL e adicionados ao béquer contendo os óvulos, sendo aguardado um período de 5 minutos. Em seguida, a solução contendo os ovos fecundados foi diluída para 1%. Três sub-amostras de 1mL foram retiradas para contagem dos ovos. Ajustaram-se os experimentos para que cada frasco teste contivesse uma densidade de 30 ovos por mL.

Montagem do teste:

Os ensaios foram realizados em frascos de boca larga com capacidade para 100 mL (figura 5.9). Foi utilizada como água de diluição, água do mar com salinidade ajustada a 28‰, filtrada e autoclavada 48 horas antes do teste, para estabilização do pH. As soluções foram preparadas no dia do teste. Foram estabelecidas concentrações percentuais da FSA de cada tratamento, em progressão geométrica, utilizando-se valores tabulados: 2,2%; 4,6%; 10,0%; 22,0%; 46,0% e 100,0% para cada tratamento. Tais concentrações foram utilizadas com base em testes preliminares realizados com derivados de petróleo (PAIXÃO *et al.,* 2007).

Figura 5.9: Frascos utilizados com *E. lucunter* e *C. rhizophorae.*

Foi estabelecido o intervalo de concentrações delimitado pela menor concentração que ocasionasse anomalias no desenvolvimento de 100% dos organismos e pela maior concentração que não ocasionasse tais efeitos. Para cada concentração, foram utilizadas seis réplicas. Para cada tratamento foi utilizado um controle branco com água de diluição em oito réplicas, com a finalidade de reproduzir as variações do organismo nas condições mais próximas das condições ambientais. A sensibilidade do lote de organismos utilizados foi avaliada mediante teste paralelo de toxicidade realizado com a substância padrão de referência dodecil Sulfato de Sódio (DSS), nas concentrações de 0,32; 0,56; 1,0; 1,8 e 3,2 ppm (PEREIRA *et al*., 2001).

5.5.2 Testes com Embriões de Ostra de Mangue *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828)

Escopo do teste:

O teste realizado consistiu na exposição de embriões da espécie de ostra *Crassostrea rhizophorae* a várias concentrações do agente estressor por um período de 24 horas em condições prescritas

(NASCIMENTO *et al* 1989). Determinou-se então, a concentração efetiva média da amostra que causa desenvolvimento anormal em 50% de uma população de embriões por um período de exposição de 24 horas (CE_{50}-24h). A figura 5.10 mostra exemplos de desenvolvimento normal e anormal de embriões de *C. rhizophorae*.

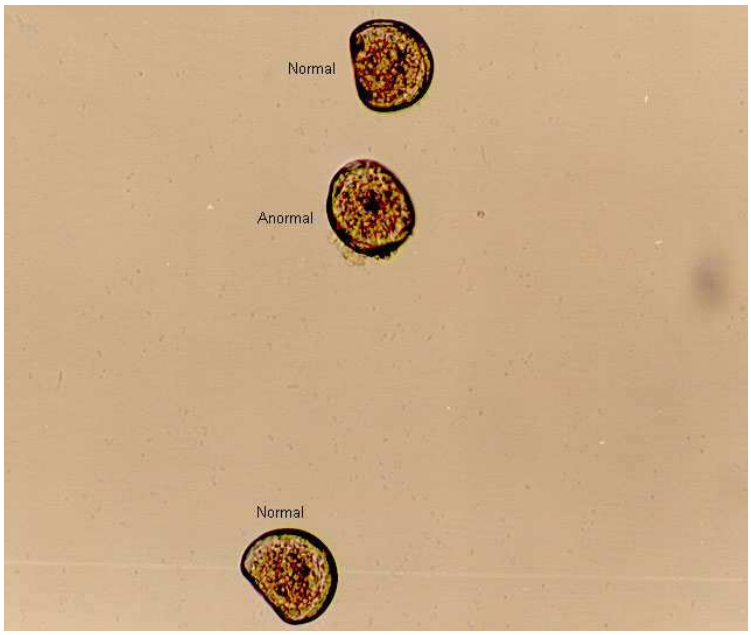


Figura 5.10: Desenvolvimento normal e anormal de embriões de *C. rhizophorae*

Obtenção dos Embriões:

Para obtenção de embriões, recorreu-se à utilização de ostras provenientes de áreas não poluídas. As ostras foram então abertas, e os espermatozóides e ovócitos imediatamente retirados com pipeta Pasteur, e colocados separadamente em recipientes com água do mar filtrada (salinidade ajustada 28‰), semelhantes aos recipientes utilizados nos testes com ouriço-do-mar. A suspensão de ovócitos foi agitada e em seguida foi tomada uma alíquota de 1mL contando-se em câmara de Sedgwick-Rafter e ajustando-se a 10^6 ovócitos por litro. A suspensão foi então filtrada em malha de 150µm, desprezando-se o material retido no filtro. Acrescentou-se 2,0mL da suspensão de espermatozóides em 1 litro da suspensão de ovócitos. Foram retiradas então três sub-amostras de

0,1mL diluindo-se para 1mL, contando-se os embriões e ajustando-se para 1000 embriões por 100mL nos recipientes de teste, com água do mar filtrada e esterilizada.

Execução do teste:

Os recipientes de teste foram numerados aleatoriamente, fazendo-se registro das concentrações correspondentes. As concentrações da FSA de cada tratamento, bem como as concentrações utilizadas no ensaio paralelo com DSS, as quantidades de réplicas e o controle branco foram os mesmos utilizados nos testes com ouriço-do-mar.

5.5.3 Testes com Microalga Dulciaqüícola *Pseudokirchneriella subcaptata*

Estes ensaios consistiram na exposição do organismo-teste a várias diluições da amostra, por um período de 96 horas. O efeito tóxico foi determinado pela inibição do crescimento da biomassa algácea nos recipientes-teste comparado com o controle, sob as mesmas condições de ensaio (CI_{50}-96).

Organismos-teste:

Os testes foram realizados com microrganismos provenientes de culturas de microalgas dulciaqüícolas da espécie *Pseudokirchneriella subcaptata*, cultivadas no Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento da Universidade Federal da Bahia (LABIOMAR - UFBA), mantidas em condições controladas de temperatura e luminosidade, de acordo com a técnica descrita por Aidar *et al.* (2002). Na Figura 5.10, estão representadas células da espécie de microalga *P. subcaptata*.

Execução do teste:

Os microrganismos foram submetidos a diferentes concentrações da fração solúvel em água de cada tratamento. Para os tratamentos, foram utilizadas as mesmas concentrações dos testes com ouriço e ostras, sendo os ensaios em triplicata, expondo organismos do mesmo *pool*

gênico, reduzindo a variabilidade dos resultados. Nestes ensaios também se utilizou a comparação com amostras-controle e com a substância padrão de referência DSS. As concentrações de DSS utilizadas foram: 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 ppm. O controle consistiu apenas em água destilada, esterilizada, enriquecida com meio de cultivo L.C. Oligo (AIDAR *et al*., 2002). O volume da cultura de *P. subcapitata* acrescentado aos recipientes de teste foi ajustado a uma densidade inicial de 1.000 cel.ml^{-1}. Os recipientes de teste foram mantidos sob condições controladas de temperatura, iluminação constante e agitados manualmente duas vezes ao dia. O efeito tóxico foi determinado através da densidade celular das culturas de algas observada em câmara de Neubauer (base de cálculo para os valores de CI_{50}-96h – concentração que causa inibição de crescimento em 50% da população de microalgas em relação ao controle no período de 96 horas). A determinação dos valores de CI_{50}-96h foi feita através do Método *Trimmed Spearman Karber* (HAMILTON *et al*., 1977).

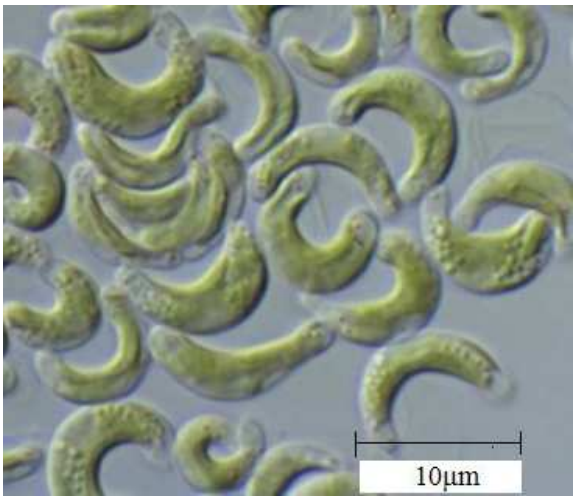


Figura 5.11: Fotomicrografia de células da espécie *P. subcaptata*.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente capítulo destina-se à exposição e discussão dos resultados obtidos a partir da realização dos experimentos planejados na etapa experimental da Tese. Esquematicamente, para sistematizar as discussões, agrupamo-las em quatro partes:

1ª parte – Com o objetivo de conhecer as propriedades do resíduo que pudessem influenciar na configuração do biorreator, na otimização das condições de biodegradação e na toxicidade frente a organismos-testes representativos da biota local, a primeira parte ocupa-se da caracterização do resíduo. Nela, estão descritas as metodologias empregadas para caracterização química, físico-química, microbiológica e ecotoxicológica, e a exposição dos resultados obtidos. Esta parte abrange o tópico 6.1. Para melhor descrever e visualizar as mudanças na comunidade microbiana mista do resíduo a partir do emprego da batelada seqüencial, a caracterização microbiológica do resíduo não-tratado será mostrada na terceira parte deste capítulo, onde

a dinâmica microbiana e suas possíveis relações com a eficiência do processo serão vistas de uma forma mais ampla;

2ª parte – Nesta parte, foram realizados ensaios de biodegradabilidade em frascos agitados, cuja finalidade foi estudar os parâmetros influenciadores da biodegradação do resíduo, bem como de otimizar as condições de biodegradabilidade do mesmo. Estão discutidos os procedimentos experimentais, desde a seleção da fonte de nitrogênio, a discussão dos resultados obtidos com a execução dos Planejamentos Estatísticos Fatoriais Fracionados, até a indicação das melhores condições de condução do processo. Alguns resultados nortearam experimentos subseqüentes, cujo delineamento foi previamente descrito no capítulo anterior (Capítulo 5). É o que ocorre com o Planejamento Estatístico Fatorial Fracionado com três níveis e quatro fatores, o qual foi concebido a partir da análise dos resultados obtidos com o Planejamento Estatístico Fatorial Fracionado anterior, com dois níveis. As razões pelas quais foi feito esse novo delineamento serão discutidas em maiores detalhes. Semelhantemente, o cálculo da massa da fonte de nitrogênio descrito no capítulo anterior, é dependente dos resultados da análise elementar (CHNS) e das análises físico-químicas do resíduo oleoso, que também aqui no presente capítulo detalharemos. Esta parte inclui o tópico 6.2;

3ª parte – Deteve-se ao tratamento do resíduo em biorreator aerado e agitado. Bateladas de ajuste foram realizadas para investigar parâmetros importantes como as perdas por volatilização, e as taxas de aeração adequadas. Foram também realizadas bateladas simples e seqüenciais, sendo conduzido um estudo comparativo entre os modos de operação, analisando-se as vantagens e desvantagens associadas, como será detalhadamente mostrado e discutido ao longo desta parte do capítulo. Oportunamente, avaliar-se-ão os resultados das investigações acerca da diversidade molecular microbiana da comunidade mista, buscando-se possíveis relações entre variações em tal dinâmica, com as variações nas taxas de biodegradação, na eficiência de biodegradação e

na eficiência específica de biodegradação. Serão mostrados aí, os principais grupos microbianos envolvidos no processo de biodegradação do resíduo oleoso e a fase do processo em que ocorrerão mudanças significativas na população. Nesta parte, estão contemplados os tópicos de 6.3 a 6.5;

4ª parte – Por fim, a quarta e última parte, que abriga o tópico 6.6, deter-se-á à discussão da efetividade do processo quanto à redução da ecotoxicidade do resíduo. Para verificar o nível de influência do tratamento na qualidade ambiental do resíduo tratado, foram avaliadas e discutidas as reduções na ecotoxicidade do material bioprocessado na batelada seqüencial conduzida por quatro ciclos, comparando-se esses efeitos com aqueles verificados para o resíduo não-tratado.

Adicionalmente no tópico 6.7 são mostradas algumas relações estabelecidas a partir de observações individuais de cada tópico aqui relacionado, que servirão de subsídio para a elaboração das conclusões, as quais serão expostas no capítulo seguinte (Capítulo 7).

6.1 Características do Resíduo Oleoso

O resíduo estudado apresenta algumas características físico-químicas semelhantes às do óleo Diesel comercial. Trata-se de um resíduo caracteristicamente parafínico, com reconhecida toxicidade para os organismos testados (IRWIN, 2001). Dentre os hidrocarbonetos encontrados, verificou-se a presença majoritária de alcanos de cadeia normal e alguns alcanos de cadeia ramificada como o pristano e o fitano, que são, em geral, utilizados como compostos indicadores de recalcitrância em estudos de biodegradabilidade.

6.1.1 Características Composicionais e Físico-Químicas

Análises físico-químicas

As análises físico-químicas de ponto de fulgor, densidade, viscosidade cinemática e cor ASTM foram realizadas atendendo aos critérios exigidos pela Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2000), os quais são concordantes com as normas da *American Society for Testing and Materials* (ASTM). Tais análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Combustíveis da Universidade Federal de Pernambuco (LAC – UFPE). A análise de cor ASTM (ASTM D - 1500) foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade de Combustíveis da Petrobras Transportes S.A. (TRANSPETRO) em Suape, Pernambuco – Brasil.

A Tabela 6.1, mostra os resultados das análises físico-químicas e as respectivas normas da ASTM que regem o método de análise.

Tabela 6.1: Propriedades físico-químicas do resíduo oleoso

Item	Propriedade	Unidades	Valores	Método
01	Densidade	Kg/m^3	854,20	ASTM D - 1298
02	Ponto de fulgor	ºC	90,00	ASTM D - 93
03	Viscosidade cinemática a 40ºC	cSt	4,33	ASTM D - 445
04	Cor ASTM	Adimensional	4,00	ASTM D - 1500
05	Aspecto visual	Não possui	Material sólido em suspensão	-

De acordo com estes valores obtidos, o resíduo oleoso (Figura 6.1) encontra-se dentro das especificações da ANP para óleo Diesel nos itens 01, 02 e 03 (ANP, 2000). Para os itens 04 e 05 (cor ASTM e aspecto visual respectivamente), o resíduo não atende às especificações da ANP, cujo limite especificado para a propriedade cor ASTM é 3,0 (máximo) e para a propriedade Aspecto Visual a designação qualitativa é "*Claro, Límpido e Isento de Material Sólido em Suspensão à Temperatura Ambiente Normal*".

Ensaios como estes expostos acima (os quais fazem parte de um escopo de ensaios para controle de qualidade) são indicadores da qualidade comercial do óleo Diesel, e norteiam os gestores dos terminais

de armazenamento para realizar descartes ou, se for o caso, para reaproveitar resíduos oleosos como produto comercial.

No caso do presente estudo utilizou-se amostras de material categorizado como resíduo de fundo de tanque, sendo descartável e cujo destino comum é o tratamento térmico (incineração), realizado de acordo com as normas ambientais vigentes, seguidas rigorosamente pelo Terminal de Armazenamento de SUAPE – PE .

Figura 6.1: Aspecto visual do resíduo oleoso não tratado

Dadas as semelhanças em algumas propriedades físico-químicas, como densidade e viscosidade, evidenciadas nos resultados dos ensaios físico-químicos, pudemos inferir que as características composicionais do resíduo são semelhantes às de amostras de óleo Diesel comercial, o que pôde ser comprovado a *posteriori*.

Análises de RMN-H^+

As análises de ressonância magnética nuclear por próton (RMN-H^+) tiveram como finalidade a identificação dos principais grupos de compostos presentes no resíduo, baseando-se nos tipos de ligações químicas entre os átomos de carbono.

Embora estas análises sejam empregadas, em geral, para a identificação de moléculas isoladamente, nos utilizamos do princípio de que as ligações químicas entre os átomos de carbono, fundamentalmente são simples (C-C), duplas (C=C) ou triplas (C≡C) e, em qualquer dos casos, a predominância de um ou outro tipo de ligação será facilmente detectada pela faixa de freqüência vibracional do átomo de hidrogênio.

Aqui, a presença majoritária de ligações simples C-C, é evidenciada pela faixa de freqüência vibracional em ppm (Hz/MHz) predominante entre 30,119 e 30,156 (Figura 6.2).

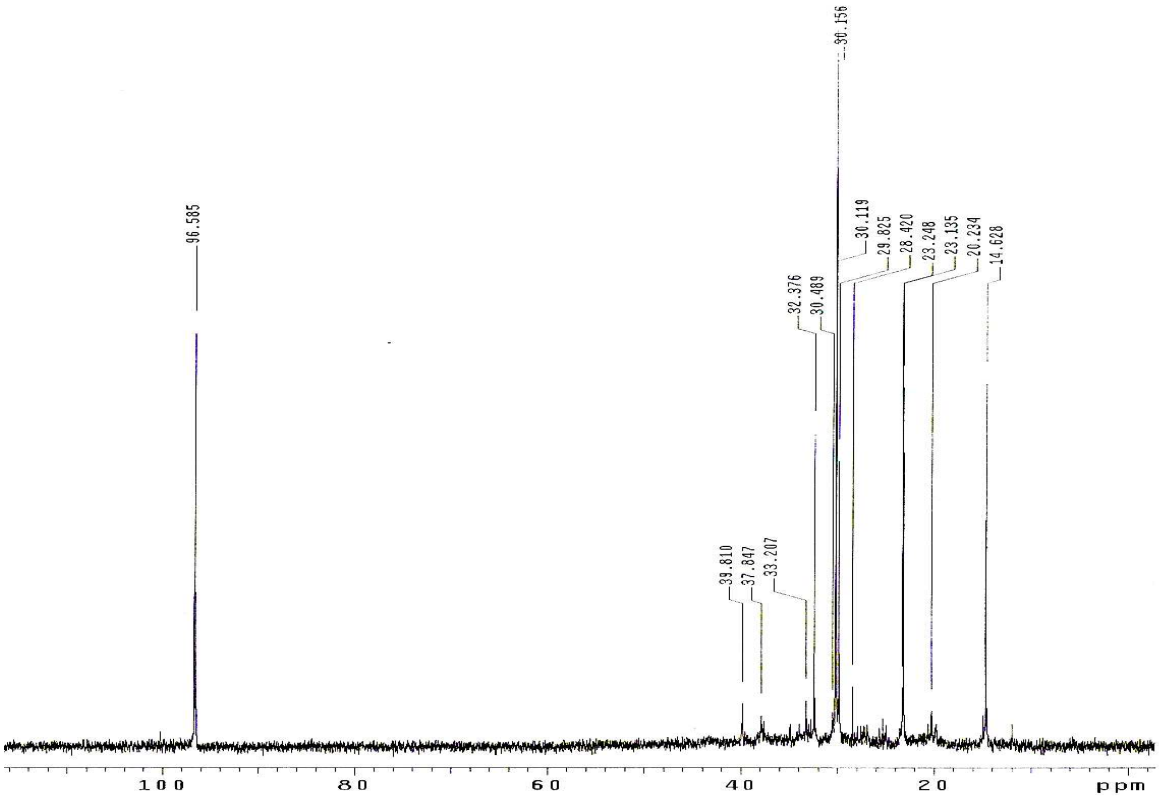


Figura 6.2 - Espectro de RMN-H^+ do resíduo oleoso

Análises Cromatográficas

A partir de informações obtidas com as análises de GC-MS e GC-FID e com o auxílio do cálculo do índice de KOVATS (SKOOG *et al.*, 1992),

foi possível identificar uma série homóloga de *n*-alcanos bem como os alcanos ramificados pristano e fitano presentes na amostra.

Como mostrado na figura 6.3 a seguir, a faixa de hidrocarbonetos de cadeia linear identificados varia de C_{10} a C_{28}, sendo estes compostos os mais representativos e os mais precisamente identificados de acordo com a metodologia adotada.

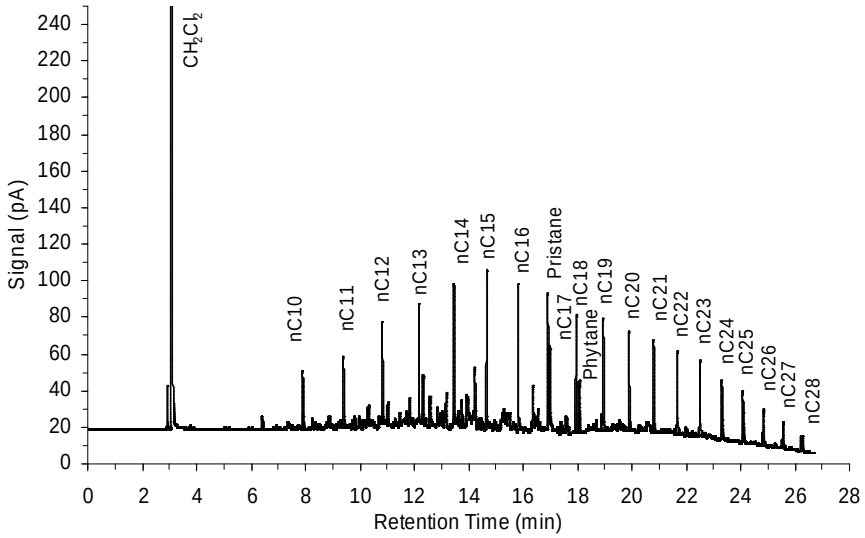


Figura 6.3: Cromatograma da amostra de resíduo oleoso não tratado (GC-FID)

Na Tabela 6.2, estão mostrados os hidrocarbonetos de cadeia linear e de cadeia ramificada identificados, bem como seu percentual relativo no cromatograma e os respectivos tempos de retenção. Dentre os alcanos ramificados, predominam o 2,6,10,14 tetrametil-pentadecano (pristano) e o 2,6,10,14 tetrametil-hexadecano (fitano).

Lee *et al*. (2005), estudando o efeito de ácido micólico sintético na degradação de óleo Diesel, identificaram previamente por GC-MS *n*-alcanos e alcanos ramificados, representando 42,7% do total de hidrocarbonetos.

Tendo como base comparativa as observações de Reddy & Quinn (1999), e de Marshall *et al.* (2003) que, utilizando condições analíticas

mais complexas revelaram cerca de 2.000 a 3.000 compostos presentes em amostras de óleo Diesel (dentre os quais, predominaram *n*-alcanos e alcanos ramificados), é-nos possível inferir que o resíduo oleoso em questão apresenta perfil composicional típico ou muito próximo do perfil de óleo Diesel.

Tabela 6.2: Identificação dos compostos por GC-MS

Pico	Hidrocarboneto	Tempo de Retenção (minutos)	% do pico
1	nC_{10}	11,817	1,47
2	nC_{11}	16,973	2,74
3	nC_{12}	20,662	3,39
4	nC_{13}	23,759	4,97
5	nC_{14}	26,549	5,87
6	-	28,152	3,60
7	nC_{15}	29,108	6,69
8	nC_{16}	31,475	7,11
9	nC_{17}	32,604	3,02
10	Pristano	33,733	6,54
11	nC_{18}	33,891	5,94
12	Fitano	35,875	5,89
13	nC_{19}	36,087	4,15
14	nC_{20}	37,927	5,69
15	nC_{21}	39,850	5,58
16	nC_{22}	41,700	5,25
17	nC_{23}	43,483	5,22
18	nC_{24}	45,183	4,88
19	nC_{25}	46,856	4,09
20	nC_{26}	48,751	3,58
21	nC_{27}	50,289	2,52
22	nC_{28}	51,583	1,83

Não obstante esta constatação verificou-se ainda na amostra estudada a presença de uma mistura complexa entre hidrocarbonetos com outros prováveis compostos orgânicos, evidenciada pela elevação na linha de base do cromatograma, designada pela sigla em inglês UCM (*Unresolved Complex Misture*). A presença dessa mistura é peculiar às amostras ambientais de petróleo e derivados, onde muitas substâncias orgânicas, em estados diferentes de oxidação, unidas aos hidrocarbonetos típicos apresentam tempos de retenção muito próximos uns dos outros, ocasionando como resposta uma elevação na linha de base do cromatograma (ATLAS, 1981b; ATLAS, 1990).

Observa-se assim que os hidrocarbonetos encontrados na amostra confirmam a analogia composicional da mesma com o óleo Diesel comercial, já anteriormente trazida à tona com os resultados dos ensaios físico-químicos. Embora não tenham sido detectadas outras classes de compostos por GC-MS, as análises de RMN-H^+ corroboram com as análises cromatográficas, indicando a presença predominante de parafínicos.

Na figura 6.4 estão mostradas as quantidades, em termos relativos, de cada hidrocarboneto detectado por análises cromatográficas.

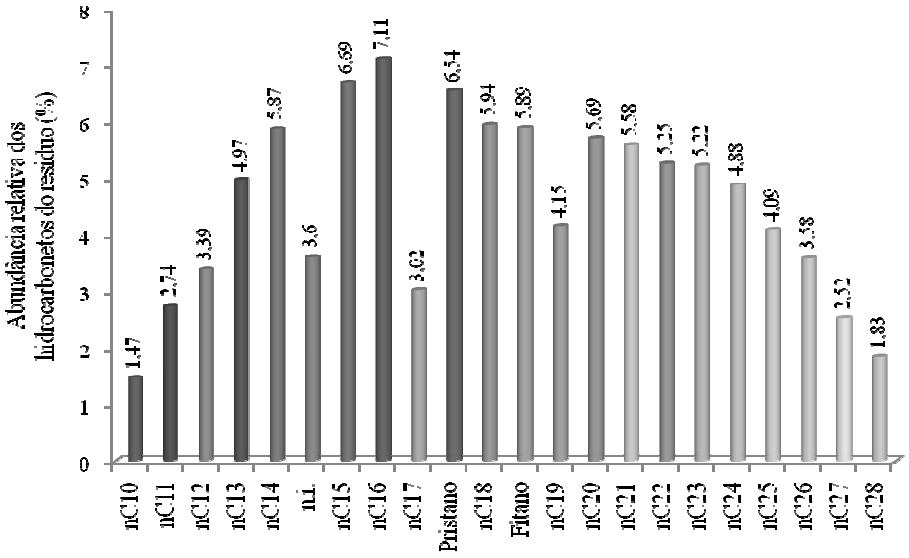


Figura 6.4 : Percentual de hidrocarbonetos presentes no resíduo oleoso

Como se pode observar, o hidrocarboneto de maior abundância na amostra é o *n*-hexadecano (*n*-C_{16}), seguido imediatamente do *n*-pentadecano (*n*-C_{15}). Entre os dois alcanos de cadeia ramificada identificados no resíduo, o 2,6,10,14-tetrametil-pentadecano, conhecido como pristano, é o mais representativo, chegando a ser o terceiro composto mais abundante na mistura.

Como tem sido evidenciado, os hidrocarbonetos de cadeia aberta são mais susceptíveis à degradação do que os de cadeia fechada, e a

maioria dos alcanos lineares são, via de regra, mais biodegradáveis que os ramificados (DE JONG *et al.*, 1997), embora em alguns casos se possa observar a biodegradação preferencial de alcanos ramificados, mesmo quando alcanos de cadeia aberta estão presentes (GEERDINK *et al*, 1996).

Composição Elementar

A análise de composição elementar foi realizada com o intuito de estimar as proporções de carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxôfre na amostra. Esta análise serviu ao propósito principal de auxiliar nos experimentos em que se fez necessário estabelecer a relação carbono-nitrogênio (C:N). Os resultados são mostrados em termos de percentual em massa, indicando 78,87% de carbono e 10,95% de hidrogênio no resíduo.

Embora o resíduo oleoso seja proveniente de um tanque de descarte que recebe descargas de resíduo de óleo Diesel tipo B, cuja concentração de enxôfre máxima especificada é de 50 ppm (ANP, 2000), a metodologia analítica para a análise elementar aqui utilizada tem limites de detecção da ordem de 10^{-2} e, por isso, o percentual de enxofre aqui mostrado é 0,0 (zero) (tabela 6.3).

Tabela 6.3: Análise elementar do resíduo oleoso não tratado

Elemento	Percentual m/m
Carbono	78,87
Nitrogênio	0,00
Hidrogênio	10,95
Enxôfre	0,00

A composição elementar do resíduo é típica de hidrocarbonetos, tendo um percentual médio de carbono e hidrogênio típico de alcanos cuja relação é próxima de C_nH_{2n+2}.

6.2 Experimentos em Frascos Agitados

Os experimentos em frascos agitados constituíram em uma etapa de capital importância para a condução da etapa posterior de experimentos em biorreator por bateladas simples e seqüenciais. A partir dos resultados obtidos com os experimentos em frascos agitados, puderam-se estudar as variáveis mais influentes no processo de biodegradação do resíduo oleoso. Primeiramente, discutiremos os resultados do experimento univariado, para a seleção da fonte de nitrogênio; em seguida, serão discutidos os resultados obtidos com a execução dos planejamentos estatísticos fatoriais fracionados.

Seleção da Fonte de Nitrogênio

Os resultados dos experimentos univariados mostraram que há uma maior eficiência na redução dos hidrocarbonetos quando o nitrato de amônio é utilizado como fonte de nitrogênio, conforme apontado na tabela 6.4 abaixo.

Tabela 6.4: Valores obtidos, Médias das reduções de HTCD e das Perdas abióticas nos experimentos univariados

Fonte de Nitrogênio	% Red. HTCD (1)	% Red. HTCD (2)	% Red. HTCD (3)	% Red. HTCD (4)	% Red. HTCD (5)	% Red. HTCD (média)	% Perda Abiótica
NH_4NO_3	**52,3**	**51,2**	**55,2**	**53,2**	**49,5**	**52,3**	**5,0**
$NaNO_3$	25,0	23,0	22,0	24,0	20,0	22,8	5,2
$(NH_2)_2CO$	43,2	44,0	45,0	43,0	44,0	43,8	3,5

De acordo com o teste t, verificam-se, a um nível de confiabilidade de 95%, diferenças estatisticamente significativas (*p*-valor <0,05) entre as médias dos valores de percentuais de redução de hidrocarbonetos totais cromatograficamente disponíveis (doravante designado pela abreviação HTCD), quando comparadas duas a duas, conforme descrito na tabela 6.5.

Na figura 6.5, podemos visualizar a contribuição abiótica para a redução dos hidrocarbonetos no experimento univariado com as fontes de nitrogênio utilizadas.

Tabela 6.5: Teste t de *student* para as diferenças entre médias das reduções de HTCD de acordo com a fonte de nitrogênio empregada, com 8 graus de liberdade; t_8 =2,306

Fontes de Nitrogênio	Diferença observada	Diferença calculada	*p*-valor
NH_4NO_3 e $NaNO_3$	29,5	9,4	<0,001
NH_4NO_3 e $(NH_2)_2CO$	8,4	7,4	<0,001
$(NH_2)_2CO$ e $NaNO_3$	21,0	6,8	<0,001

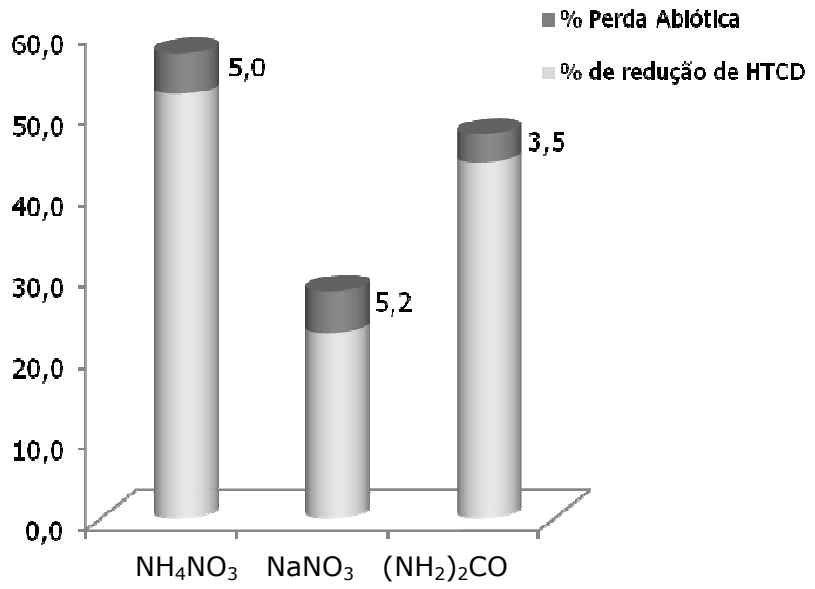


Figura 6.5: Contribuições bióticas e abióticas para a redução percentual de HTCD no experimento univariado

Com base nestes valores observados, procedeu-se à utilização do nitrato de amônio na composição do meio mineral. Cabe ressaltar que, muito embora do ponto de vista da economicidade se pudesse optar pela utilização da uréia, haja vista que os resultados não estão muito distantes daqueles obtidos com o nitrato de amônio, optou-se por este último

devido à busca pela magnificação da degradação, pura e simplesmente. A partir daí, foram montados os planejamentos multivariados (fatoriais fracionados) descritos a seguir.

Planejamento Fatorial Fracionado FFD 3^{4-1}

O primeiro planejamento estatístico fatorial fracionado com 2 níveis e 4 variáveis (FFD 2^{4-1}) produziu 9 experimentos individuais, com 1 ponto central, em duplicatas, totalizando 18 corridas (Tabela 6.6).

Tabela 6.6: Matriz experimental do planejamento FFD2^{4-1}

Corrida	Condição			
	Carga orgânica	Aeração	C:N	pH
1	10	1	50	5,50
2	10	2	500	5,50
3	10	1	500	8,00
4	10	2	50	8,00
5	40	1	500	5,50
6	40	2	50	5,50
7	40	1	50	8,00
8	40	2	500	8,00
9C	25	1,5	275	6,75

Com o auxílio do *software Statistica*™ (versão 6.0), procederam-se às análises de variância e aos estudos do modelo estatístico previsor do comportamento da variável resposta frente às combinações das variáveis independentes. Determinou-se como variável de resposta o percentual relativo de redução dos HTCD, cujo cálculo é dado pelo quociente entre a área total dos picos cromatográficos dos hidrocarbonetos presentes no resíduo após o tratamento e a área total dos picos cromatográficos dos hidrocarbonetos presentes no resíduo antes do tratamento.

A análise de variância (ANOVA) dos experimentos decorrentes do primeiro planejamento estatístico fatorial fracionado envolvendo dois níveis e quatro fatores (FFD 2^{4-1}) mostrou valores preditos com baixos resíduos para o modelo gerado. Os parâmetros da ANOVA importantes para a avaliação do ajuste dos dados ao modelo experimental

(R^2= 99,40%; erro puro = 0,95) mostraram-se satisfatórios, indicando baixos resíduos. De um modo geral, todos os efeitos provenientes de interações entre fatores foram estatisticamente significativos, evidenciados pelo *p*-valor<0,05 e pelos valores da distribuição **F** calculados, maiores que os valores tabelados ($\mathbf{F}_{1;\ 10;\ 0,05}$ = 4,96) como descrito na tabela 6.7.

Tabela 6.7: Análise de variância para o FFD 2^{4-1} com R^2 = 99,40% e erro puro = 0,95

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
Aeração	213,89	1	213,89	223,19	<0,0001
pH	97,51	1	97,51	101,75	<0,0001
Carga Orgânica	**968,76**	**1**	**968,76**	**1010,88**	**<0,0001**
C:N	6,89	1	6,89	7,19	0,02514
Aeração x pH	11,39	1	11,39	11,88	0,00730
Aeração x C. org.	40,64	1	40,64	42,40	0,00011
Aeração x C:N	97,51	1	97,51	101,75	<0,0001
Resíduos	8,63	10	0,86		
Total	1445,23	17			

Os valores experimentais observados estão alinhados com os valores preditos pelo modelo experimental, conforme exibido na figura 6.6 e na tabela 6.8.

Analisando o diagrama de Pareto gerado a partir do cálculo dos efeitos estimados, verificamos o efeito predominante da variável "Carga Orgânica" na redução dos HTCD (Tabela 6.7 e Figura 6.7). Este efeito é o mais influente, figurando como o de maior valor em módulo. Sendo negativo, indica a relação de proporcionalidade inversa do aumento da Carga Orgânica com a redução dos HTCD. Este fenômeno remete-nos à constatação, à qual também chegaram outros autores, de que o aumento da concentração inicial de resíduo ou material hidrocarbônico pode contribuir até certo valor para o aumento da biodegradação, mas a partir de determinados limiares estas concentrações iniciais aumentam sobremaneira a recalcitrância do resíduo e a toxicidade no meio reacional

(LEE *et al.*, 2005; NANO *et al.*, 2003). No processo aqui estudado, os microrganismos envolvidos são exclusivamente endógenos, o que, de certa forma, condiciona o tamanho do inóculo à concentração da carga orgânica inicial. Assim, se ocorre um decréscimo na biodegradação na medida em que se aumenta a carga orgânica inicial, a diminuição da atividade microbiana, a princípio, parece estar atrelada às características tóxicas do resíduo.

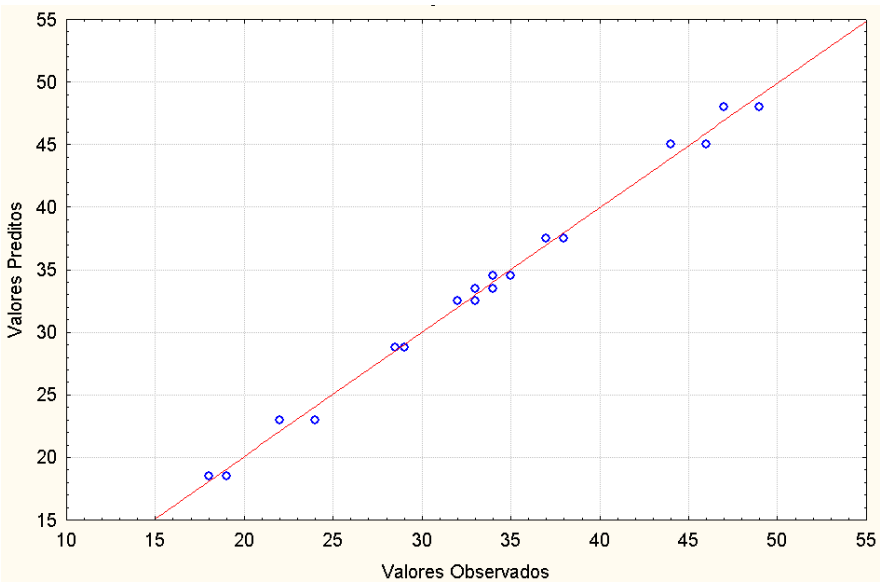


Figura 6.6: Valores observados para o FFD 2^{4-1} *versus* valores preditos pelo modelo

Ainda observando o diagrama de Pareto, imediatamente após o efeito da variável Carga Orgânica, verifica-se a contribuição do efeito (em módulo) da variável Aeração. Para definirmos essa variável, lançamos mão do artifício de atribuir ao nível inferior o número 1, representando a relação de volume útil por capacidade do frasco de 100/500; e ao nível superior o número 2, representando a relação de volume útil por capacidade do frasco de 50/500. Desta forma, nesta representação, a condição 1 apresenta um menor espaço entre a superfície do líquido e o topo do frasco (*head space*), o que proporciona uma menor eficiência de aeração, e a condição 2, ao contrário, representa um maior *head space* e, conseqüentemente, maior eficiência de aeração.

Tabela 6.8: Valores médios observados e valores preditos pelo modelo estatístico

Experimento	Observado	Predito
1	34,5	34,50
2	47,5	48,00
3	37,5	37,50
4	45,0	45,00
5	19,5	18,50
6	23,0	23,00
7	28,75	28,75
8	32,5	32,50
9 (C)	33,5	33,47

Os valores da variável Aeração aqui representam as condições de aeração do meio mais qualitativamente do que quantitativamente. O estudo da aeração no contexto dos experimentos multivariados em frascos é importante por indicar a influência deste parâmetro, tanto isoladamente quanto em conjunto com outros. Em estudos de biodegradabilidade, diversas estratégias são montadas na tentativa de quantificar esta influência. No entanto, devido à dificuldade de transpor esses resultados de frascos agitados para biorreator, por causa das diferenças entre as formas de transferência de oxigênio, a maioria dos estudos serve como um parâmetro indicador de tendências, podendo mostrar, por exemplo, até que ponto este fator pode interferir nas outras variáveis, mediante a observação dos efeitos combinados. Aqui, os efeitos combinados da variável Aeração foram mais significativos quando provenientes da interação com a variável Relação C:N e com a variável Carga Orgânica, sendo negativo com esta última e positivo com a anterior. O efeito combinado da variável Aeração com a variável Relação C:N teve maior influência na degradação dos hidrocarbonetos de que os demais efeitos combinados (Figura 6.7).

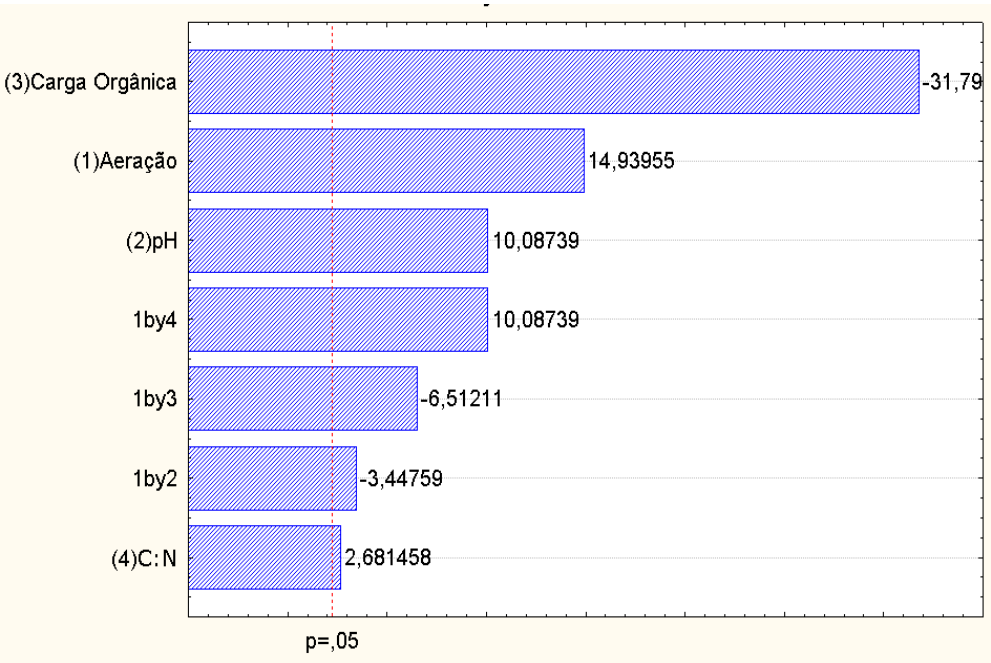


Figura 6.7: Diagrama de Pareto para o FFD 2^{4-1}

Embora os resultados da análise deste planejamento tenham indicado a aeração como fator de maior influência positiva na biodegradação do resíduo, as condições nesses experimentos não se mostram favoráveis à degradação de altas concentrações iniciais de resíduo oleoso.

Foi concebido, então, outro planejamento estatístico fatorial fracionado considerando agora três níveis e quatro variáveis, sendo substituída a variável Aeração pela variável Agitação. Devido à necessidade de exploração dos limites máximos das respostas (o que não pôde ser verificado no planejamento acima exposto devido à linearidade dessas respostas e à limitação de pontos centrais) optou-se por um novo planejamento envolvendo 3 níveis, e estendendo-se os valores das variáveis, no intento de observar a existência de resposta quadrática e, conseqüentemente, os pontos máximos das respostas.

Planejamento Fatorial Fracionado FFD 3^{4-1}

Lançou-se mão de um planejamento fatorial fracionado com três níveis e quatro variáveis (FFD 3^{4-1}), em duplicata, totalizando 54 corridas.

As variáveis independentes estudadas foram: pH inicial, Agitação, Carga Orgânica e Relação Carbono-Nitrogênio. As variáveis independentes e os respectivos níveis estão mostrados na tabela 6.9. Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 500mL submetidos à temperatura de 28±1ºC, volume de trabalho de 100mL, durante 14 dias.

Tabela 6.9: Matriz experimental FFD 3^{4-1}

Variáveis	**Níveis**		
	Inferior	Intermediário	Superior
pH inicial	5,50	6,75	8,00
Relação C:N	50:1	425:1	800:1
Carga Orgânica	10	40	70
Agitação	50	150	250

A tabela ANOVA para os resultados dos experimentos decorrentes deste planejamento estatístico fatorial fracionado mostrou valores satisfatórios dos parâmetros importantes para a avaliação do ajuste dos dados ao modelo experimental (R^2= 90,00%; erro puro = 2,9). À exceção do valor do efeito de interação entre a variável C:N e a variável Carga Orgânica, todos os outros efeitos provenientes de interações entre fatores foram estatisticamente significativos, evidenciados pelo *p*-valor < 0,05, como descrito na tabela 6.10. O valor da estatística do teste (F), calculado para os efeitos de cada variável isoladamente (sem interações), foi significativamente maior que o valor de F tabelado ($F_{1;\ 39;\ 0,05}$ = 4,1) à exceção da variável pH, cujo valor calculado (4,41) foi muito próximo do valor tabelado. O efeito desta variável apresentou menor significância estatística (quando comparado às outras variáveis), evidenciada também pelo *p*-valor 0,022 o qual é muito próximo do valor do nível de significância (0,05 ou 5%), o que mostra que a faixa de pH testada (de 5,5 a 8,0) teve pouca influência na redução dos hidrocarbonetos, sobretudo quando se compara o efeito da variação do pH com os efeitos das outras variáveis sobre a variável-resposta (Tabela 6.10).

Tabela 6.10: Análise de variância para o FFD 3^{4-1} com R^2 = 90,00% e erro puro = 2,9

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	*p*-valor
(1) pH	**21,19**	**2**	**10,59**	**4,41**	**0,022**
(2) C: N	3979,78	2	1989,89	829,64	<0,001
(3) Carga Org.	21761,49	2	10880,75	4536,49	<0,001
(4) Agitação	11413,81	2	5706,91	2379,37	<0,001
1x2	764,25	1	764,25	318,64	<0,001
1x3	10,52	1	10,52	4,38	0,045
1x4	52,41	1	52,41	21,85	<0,001
2x3	**5,15**	**1**	**5,15**	**2,14**	**0,154**
2x4	168,32	1	168,32	70,17	<0,001
3x4	235,35	1	235,35	98,13	<0,001
Resíduos	5396,78	39	138,37		
Total	44103,98	53			

Conforme mostrado no gráfico da figura 6.8 verifica-se o ajuste entre o modelo e os valores obtidos, com algumas dispersões entre os valores preditos *versus* os valores observados.

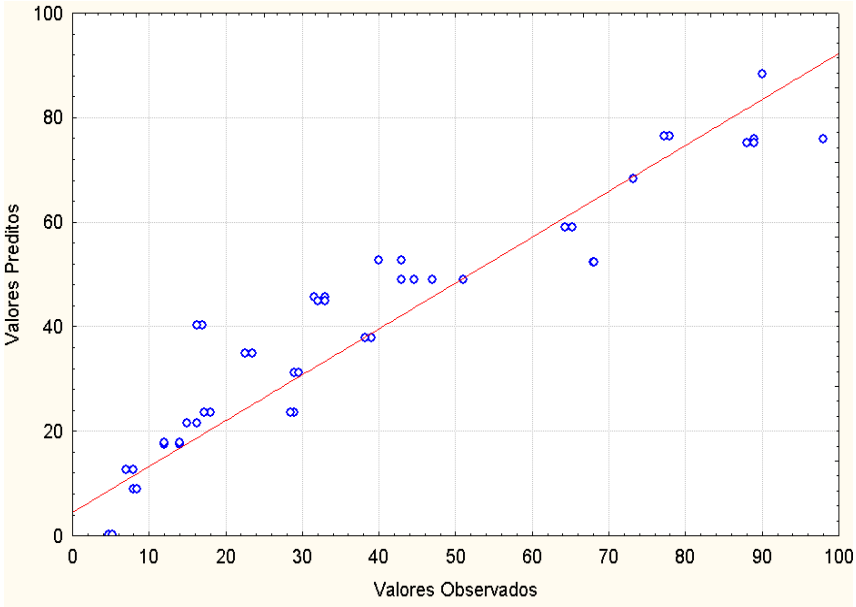


Figura 6.8: Valores observados para o FFD 3^{4-1} *versus* valores preditos pelo modelo

Analisando-se os efeitos estimados das variáveis através do diagrama de Pareto na figura 6.9, observa-se que o efeito linear negativo da variável Carga Orgânica se sobressai aos demais, semelhantemente ao

que ocorre na análise do planejamento anterior (FFD 2^{4-1}). Em contrapartida, a variável Agitação, apresenta a maior contribuição quadrática positiva na redução dos HTCD, sendo, em módulo, o segundo efeito mais importante. Estes resultados sugerem que a transferência de oxigênio nestes experimentos, variando-se a velocidade de agitação, ao invés de se variar o *head space*, parece ter sido mais eficiente. Mostra também que, ao contrário do que se estava perfilando como resposta linear ao se adotar a variável Aeração no planejamento anterior, que a resposta obtida ao se utilizar a variável Agitação tem uma contribuição bastante significativa em termos quadráticos.

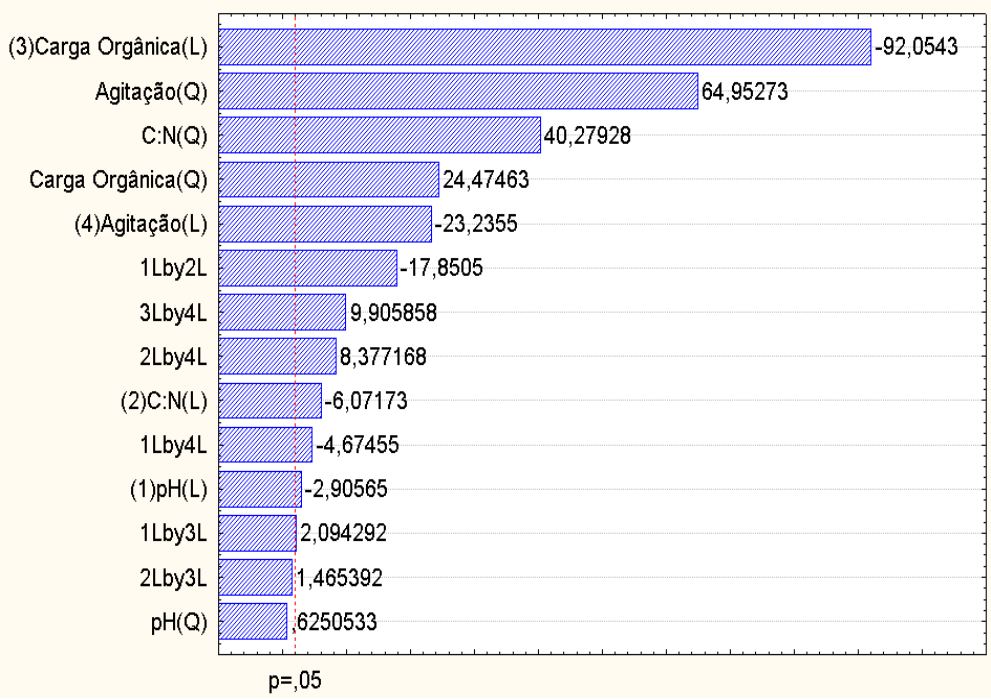


Figura 6.9: Diagrama de Pareto, da análise do planejamento 3^{4-1} evidenciando a contribuição do termo quadrático da agitação no processo

A *priori*, velocidades de agitação mais altas promovem maior pressão no meio reacional e ocasionam a expulsão dos compostos voláteis, ocasionando maior perda abiótica e menor taxa de biodegradação. Baixas velocidades de agitação, por outro lado, dificultam a transferência de oxigênio para os microrganismos degradadores, diminuindo as taxas de degradação aeróbica. Por conta disso, tais

resíduos necessitam de que a turbulência no sistema seja suficiente para garantir uma boa transferência de oxigênio, a fim de atender a demanda do cultivo e resultar em elevadas eficiências de biodegradação e ao mesmo tempo minimizar as perdas abióticas, decorrentes de expulsão de componentes de menores massas molares. Farhadian *et al.* (2008) ressaltam que as perdas por volatilização são de fato um dos maiores problemas para biotratamentos *ex situ* em biorreatores, e que essas perdas nem sempre são levadas em conta quando da avaliação da biodegradação. Cabe salientar que pudemos estimar as perdas abióticas mediante a comparação com controles abióticos realizados com resíduo não tratado filtrados em membrana 0,45μm para cada condição testada, sendo realizadas 27 corridas paralelas nas mesmas condições de agitação, temperatura e tempo total de processo (Figura 6.10).

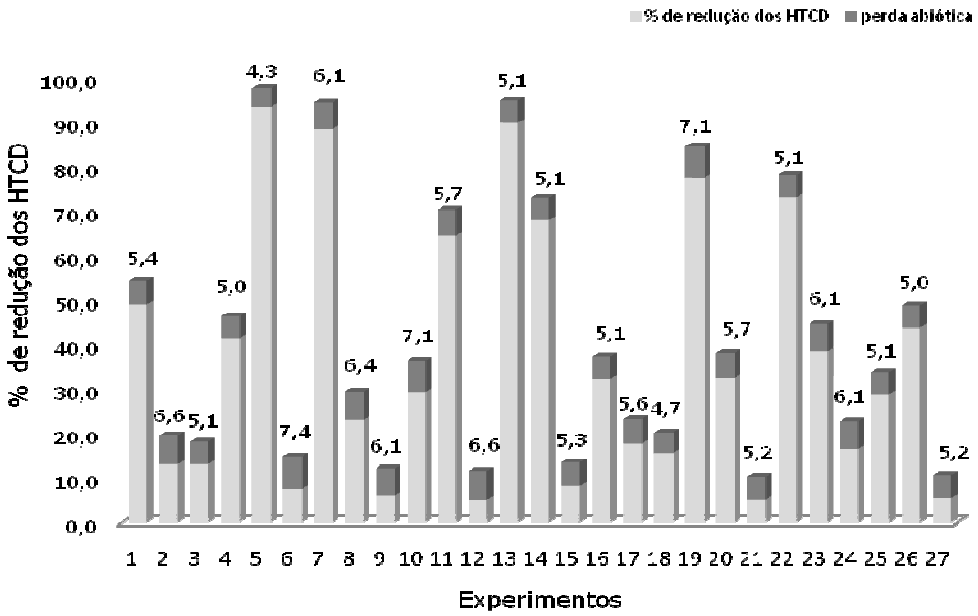


Figura 6.10: Percentual de redução de HTCD, e respectivas perdas abióticas para cada condição

Desta forma, para cada experimento, foi possível estimar a perda abiótica em cada frasco. Como verificado na tabela 6.11, houve uma perda abiótica média em torno de 5,6%.

Tabela 6.11: Percentuais de redução de HTCD e as respectivas perdas abióticas por experimento e perda global ($FFD3^{4-1}$)

Experimento	% Redução HTCD rep1	% Redução HTCD rep2	Média	Perda abiótica
1	51,00	47,00	49,00	5,40
2	14,00	12,00	13,00	6,60
3	14,06	12,00	13,03	5,10
4	43,00	40,00	41,50	4,98
5	89,00	98,00	93,50	4,30
6	7,00	8,00	7,50	7,35
7	88,00	89,00	88,50	6,05
8	22,50	23,50	23,00	6,35
9	5,92	6,10	6,01	6,10
10	29,00	29,60	29,30	7,10
11	64,26	65,20	64,73	5,65
12	4,80	5,20	5,00	6,55
13	90,00	90,00	90,00	5,05
14	68,00	68,10	68,05	5,05
15	8,00	8,45	8,23	5,25
16	33,00	31,60	32,30	5,10
17	18,00	17,20	17,60	5,60
18	15,00	16,20	15,60	4,65
19	78,00	77,20	77,60	7,05
20	33,00	32,00	32,50	5,70
21	5,00	5,10	5,05	5,15
22	73,20	73,20	73,20	5,05
23	39,00	38,20	38,60	6,05
24	17,00	16,20	16,60	6,05
25	29,00	28,50	28,75	5,05
26	43,00	44,60	43,80	5,00
27	4,98	5,90	5,44	5,15

Perda global: 5,6 ± 0,79 %

Com a finalidade de minimizar tais perdas por volatilização e avaliar a biotransformação desses compostos, reatores que utilizam uma interface de particionamento entre a fase polar e os compostos voláteis têm sido cada vez mais utilizados. Este sistema geralmente emprega uma fase apolar como dodecano ou oleil-álcool, que são biocompatíveis, como interface para particionar os compostos apolares (DORDICK *et al*., 1998; PARALES, *et al*., 2002).

Na Figura 6.11, está mostrado o gráfico de superfície de resposta gerado a partir dos efeitos das variáveis Agitação e Carga orgânica, previstos pelo modelo estatístico. Observa-se a faixa de valores ótimos de velocidade de agitação em RPM, em torno de 120-160. A faixa ótima de concentração inicial de resíduo, representada pela variável Carga Orgânica, transita em torno dos 5 a 15% v/v, nas condições estudadas.

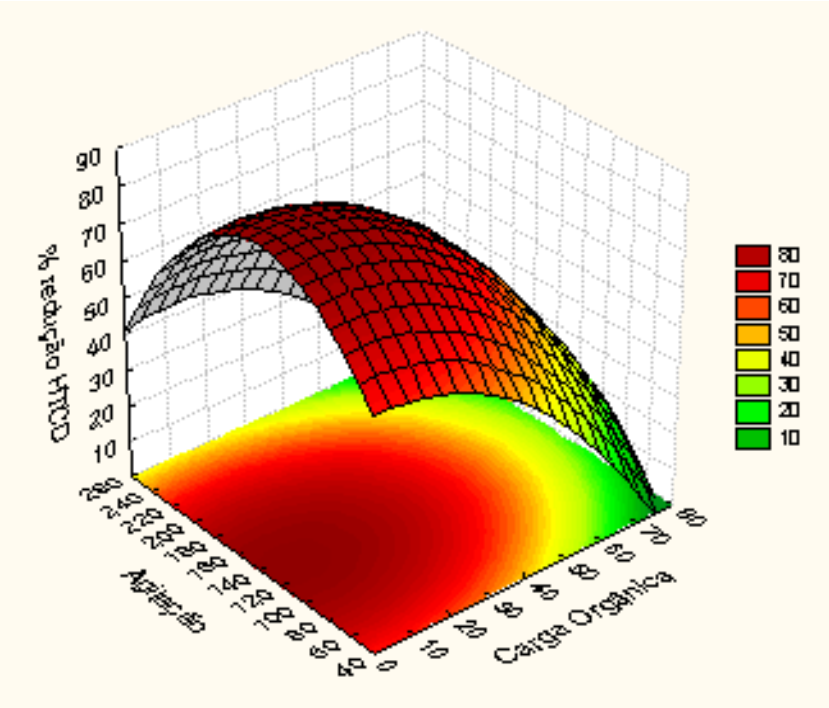


Figura 6.11: Superfície Resposta dos HTCD para Agitação e Carga Orgânica. As variáveis pH e C:N foram fixadas em valores ótimos, 6,75 e 400:1, respectivamente

Para os efeitos da variável C:N previstos pelo modelo estatístico, o gráfico gerado (figura 6.12) representa bem a faixa de valores ótimos de relação carbono:nitrogênio entre 350:1 e 450:1. Destacamos aqui também, o comportamento dessa variável em relação à sua resposta quadrática, indicando comportamento semelhante ao da variável agitação. Embora muitos trabalhos tenham sido realizados e os mais diferentes valores ótimos tenham sido evidenciados, a melhor faixa de relação carbono:nitrogênio é específica para cada material estudado. Alexander (1994), em sua obra "*Biodegradation and Biodeterioration*", relata diversos estudos de caso, mostrando ótimos diferentes de C:N,

relacionados a diferentes condições de tratamento e diferentes tipos de resíduos, variando de 50:1 até 800:1. Embora a relação C:N possa ser fixada em termos absolutos, considerando-se o carbono total presente no resíduo, a natureza química, bem como a estrutura dos compostos de carbono podem determinar a biodisponibilidade da fonte de carbono (MAIER, 1999), constituindo-se em mais uma variável na predição da biodegradação.

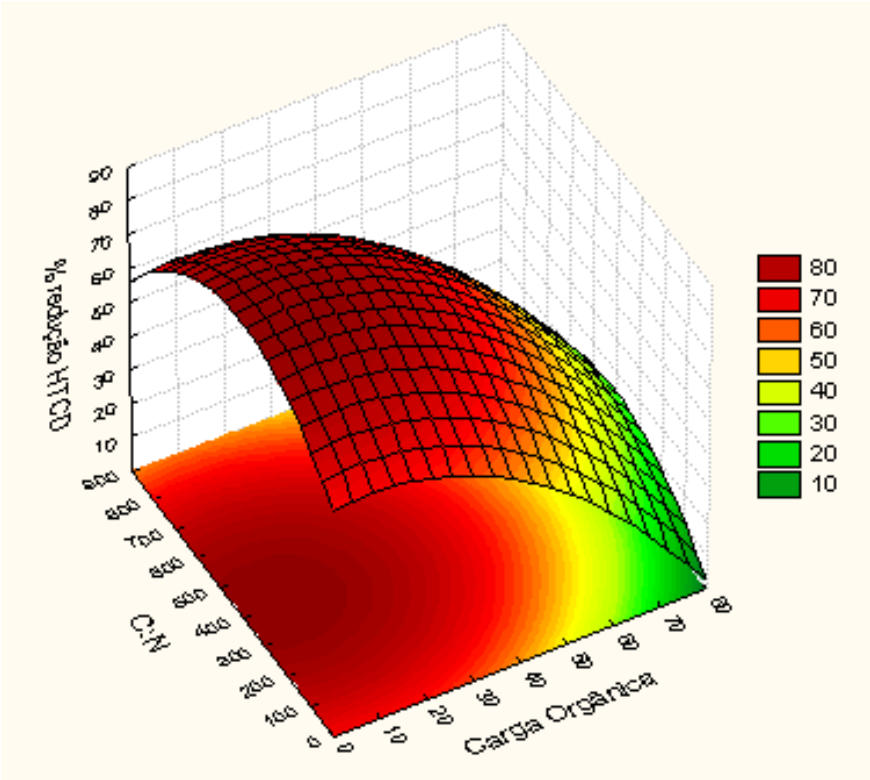


Figura 6.12: Superfície resposta dos HTCD para C:N e Carga Orgânica. As variáveis pH e Agitação foram fixadas em valores ótimos, 6,75 e 140rpm, respectivamente.

6.3 Experimentos em Biorreator

Os experimentos em biorreator foram divididos em duas fases: a primeira, compreendendo as bateladas realizadas para os ajustes das condições experimentais; a segunda consistiu na condução de bateladas simples e seqüenciais, baseadas nas condições preconizadas pelos experimentos em frascos agitados e pelos resultados obtidos com a condução de bateladas de ajuste.

6.3.1 Bateladas de Ajuste

Com base nos valores ótimos obtidos mediante análise dos resultados dos experimentos em frascos agitados, realizou-se uma série de três bateladas simples de ajuste das condições operacionais. Foram adotados valores de taxa específica de aeração, velocidade inicial de agitação, percentual de oxigênio dissolvido, respectivamente, de 1,5vvm, 500rpm, 74% para a primeira batelada (SA_{01}), e 0,5 vvm, 300rpm, 35% para a segunda e terceira bateladas (SA_{02} e SA_{03}). Os valores de carga orgânica foram de 30% v/v para as bateladas SA_{01} e SA_{02} e 10% v/v para a batelada SA_{03}. Os valores de pH e relação C:N foram fixados em 7,0 e 5:1, respectivamente, em todas as bateladas.

O valor de C:N, fixado em 5:1, encontra-se bastante distante da faixa de ótimo indicada pelos experimentos com frascos agitados. O objetivo desta modificação foi o de utilizar este valor, juntamente com o valor de carga orgânica inicial de 30% v/v, como um contraponto para verificar se realmente estes valores produziriam respostas muito baixas, de acordo com o previsto pelo modelo estatístico, para, a partir daí, utilizá-los como base para determinar as perdas abióticas em biorreator.

De fato, como mostrado na tabela 6.12, a seguir, observamos que estes valores de carga orgânica inicial e relação C:N apresentaram uma baixa redução percentual nos HTCD. Para a batelada SA_{01} esta redução foi de 18,7% ao final das 100 primeiras horas de processo e 20,0% ao final de 200 horas, e redução global de 34,96%. Para a batelada SA_{02}, foi de 5,5% para as 100 primeiras horas e 3,2% ao final das 200 horas, e redução global de 8,53%. Para a batelada SA_{03} foi de 8,6% ao final das 100 primeiras horas e 5,2% ao final das 200 horas, e redução global de 13,6%.

Tabela 6.12: Perdas abióticas observadas mediante amostragem direta no biorreator

Batelada	**Redução % dos HTCD**		
	SA_{01}	SA_{02}	SA_{03}
Após 100 primeiras horas	18,7	5,5	8,6
Após 200 horas	20,0	3,2	5,2
Global	34,96	8,53	13,6

Ao se analisar os hidrocarbonetos retidos pelos filtros SepPak® C_{18}, constataram-se incrementos de 33,4% na área dos HTCD entre o ponto inicial (filtro analisado após 100 horas) e o ponto final (novo filtro colocado após 100 horas e analisado após 200 horas) para a batelada SA_{01}; para a batelada SA_{02}, esse incremento foi de 7,72% e para a batelada SA_{03}, foi de 11,8% (Tabela 6.13). Tais valores, assim como os valores de redução de HTCD mostrados na tabela 6.12, são fortes indicativos de perdas por volatilização, uma vez que a biomassa medida a intervalos de 10 horas para cada uma das bateladas foi desprezível (variação na quarta casa decimal na pesagem das membranas biológicas, Tabela 6.14) indicando pouca ou nenhuma contribuição biótica para estas reduções.

Tabela 6.13: Perdas abióticas observadas mediante uso de filtro

Batelada	Incremento % dos HTCD		
	SA_{01}	SA_{02}	SA_{03}
Entre 100 e 200 horas	33,4	7,72	11,8

Comparando-se as perdas observadas com o emprego dos filtros C_{18} às perdas observadas a partir das amostragens diretas em biorreator, obtivemos valores percentuais próximos de perda abiótica (Figura 6.13).

Ainda de acordo com estes resultados, observou-se que ao se reduzir a taxa de aeração (de 1,5 para 0,5vvm), a velocidade inicial de agitação (de 500 para 300 rpm), e o percentual inicial de oxigênio dissolvido (de 74 para 35%) a partir da batelada SA_{02}, houve uma diminuição significativa nas perdas.

Tabela 6.14: Biomassa nas bateladas de ajuste

Tempo (h)	Biomassa (g) por Batelada		
	SA_{01}	SA_{02}	SA_{03}
0	0,0002	0,002	0,001
10	0,0001	0,002	0,008
20	0,0002	0,003	0,001
30	0,0003	0,002	0,003
40	0,0009	0,002	0,002
50	0,0003	0,007	0,002
60	0,0003	0,002	0,001
70	0,0003	0,003	0,002
80	0,0007	0,009	0,008
90	0,0003	0,008	0,008
100	0,0007	0,008	0,008
110	0,0006	0,008	0,001
120	0,0006	0,005	0,003
130	0,0003	0,004	0,003
140	0,0003	0,004	0,008
150	0,0008	0,009	0,008
160	0,0008	0,002	0,005
170	0,0009	0,005	0,006
180	0,0001	0,005	0,006
190	0,0001	0,004	0,005
200	0,0003	0,008	0,004

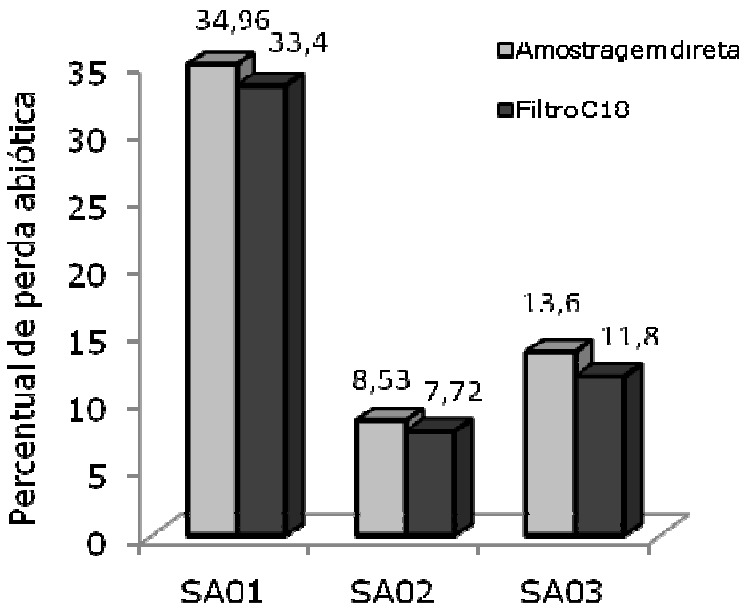


Figura 6.13: Percentuais de perda abiótica nas bateladas de ajuste

Embora nas bateladas SA_{02} e SA_{03} tenham-se utilizado os mesmos valores de percentual inicial de oxigênio dissolvido (35%), de taxa de aeração (0,5vvm) e de velocidade de agitação (300 rpm), as perdas foram ligeiramente maiores na batelada SA_{03}, cuja única diferença está no percentual de carga orgânica (30% v/v para a batelada SA_{02} e 10%v/v para a batelada SA_{03}). É possível que as diferenças em tais valores estejam relacionadas à saturação dos filtros na batelada SA_{02}, onde é utilizada maior concentração de resíduo; e à perda real de compostos por volatilização na batelada SA_{03}, uma vez que seria de se esperar que nesta batelada a diferença entre as concentrações de material retido no início e no final do processo fossem menores devido à menor quantidade de resíduo.

Para a condução das bateladas simples e seqüenciais, atribuiu-se o valor de perda abiótica média de 12,7% para os experimentos em biorreator, baseadas nas perdas ocorridas na batelada de ajuste SA_{03}, e passou-se a trabalhar com o valor de carga orgânica adotado de 10% v/v.

6.3.2 Batelada simples

A batelada simples designada S_{01}, foi conduzida por 200 horas. Os valores de eficiência de biodegradação (E_B), eficiência específica de biodegradação (E_{EB}) e biomassa estão mostradas na Tabela 6.15.

De acordo com estes valores e com os indicadores da eficiência do processo aqui adotados, as condições utilizadas nesta batelada propiciaram uma eficiência de biodegradação da ordem de 75,5%.

Observando na literatura, nos baseamos nos trabalhos de Cassidy *et al.* (2000), que investigaram a biodegradação de óleo diesel presente em substrato semi-sólido (lodo), empregando os modos de operação contínuo e por batelada seqüencial. Estes autores observaram percentuais de biodegradação da ordem de 75% conduzindo os experimentos por processo contínuo, e 96% por batelada seqüencial.

Cabe salientar que embora os grupos de compostos identificados pelos autores neste trabalho e as suas respectivas abundâncias no óleo diesel sejam semelhantes às aqui encontradas, a agregação do material ao sedimento, bem como as peculiaridades operacionais, dificultam uma comparação direta. Porém, podemos estimar essa eficiência global de biodegradação também em função do tempo total do processo, que no caso dos autores citados, durou 80 dias.

Tabela 6.15: Valores de E_B, E_{EB} e biomassa na batelada S_{01}

Tempo (h)	Área HTCD	Biomassa (g)	E_B % - perda 12,7%	E_{EB} %.g^{-1}
0	$4,2x10^4$	0,00	0,00	0,00
10	-	0,60	0,00	0,00
20	-	7,00	-	-
30	-	10,60	-	-
40	-	11,20	-	-
50	-	13,20	-	-
60	-	15,00	-	-
70	-	18,88	-	-
80	-	19,20	-	-
90	-	22,40	-	-
100	$1,1x10^4$	23,80	61,10	2,57
110	-	24,40	-	-
120	-	25,40	-	-
130	-	26,20	-	-
140	-	25,90	-	-
150	-	27,60	-	-
160	-	33,20	-	-
170	-	33,50	-	-
180	-	35,40	-	-
190	-	35,50	-	-
200	$1,3x10^3$	36,00	75,49	2,09

Considerando que nos processos conduzidos por batelada simples não ocorra nova adição de carga orgânica e, por conseqüência, não ocorra aclimatação, é de se esperar uma fase mais lenta no crescimento microbiano no inicio do processo, o que, mesmo assim, não foi muito evidenciado na batelada S_{01} (Figura 6.14). Desta forma, visualizamos os resultados obtidos nesta primeira batelada, como forte indicativo da alta tratabilidade do resíduo oleoso.

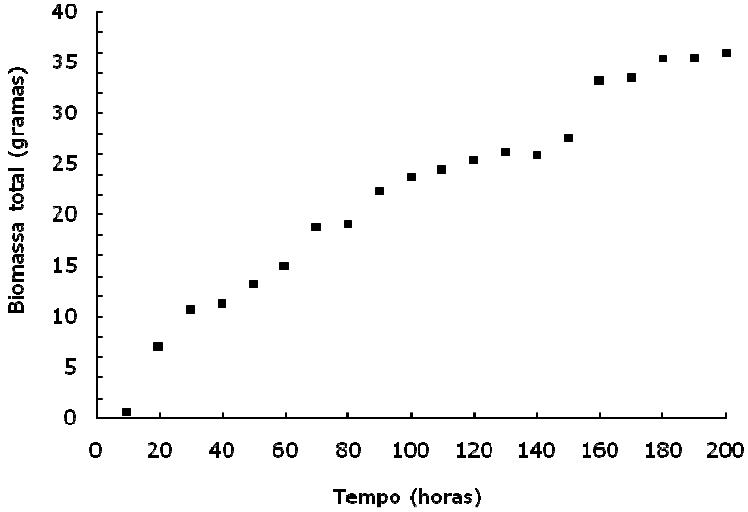


Figura 6.14: Crescimento microbiano durante a batelada simples S_{01}

A competência da comunidade microbiana mista no que concerne à degradação dos hidrocarbonetos pode ser evidenciada pelos valores de eficiência específica de biodegradação (E_{EB}) mostrando pequena variação, de 2,57%.g^{-1} às 100 horas, para 2,09%.g^{-1} às 200 horas.

Este decréscimo na eficiência específica de biodegradação pode indicar uma estabilização no crescimento microbiano, ou ainda, que o crescimento microbiano a este ponto pode não estar mais diretamente associado à biodegradação, e que a extensão desse fenômeno poderia se prolongar por um período maior de tempo.

Na Figura 6.15 está mostrado o aspecto da biomassa obtida por filtração em membrana de 0,45μm, no processo conduzido de acordo com os parâmetros da batelada simples S_{01}, ao final do processo, com 200 horas de operação. Percebe-se a alta concentração de biomassa, indicando valores ótimos das condições preconizadas nesta batelada.

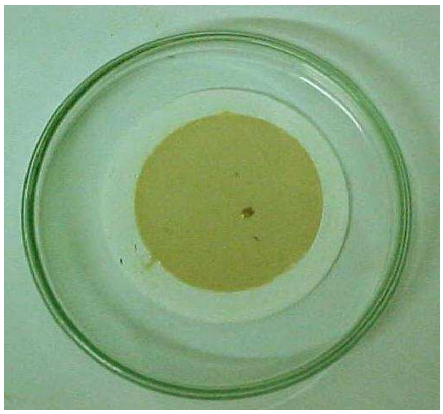


Figura 6.15: Aspecto da biomassa microbiana na batelada S_{01}

Com base no perfil de crescimento, estimamos os intervalos de tempo a serem utilizados nos ciclos das bateladas seqüenciais, sobretudo, para entender qual a relação entre os valores de biomassa nos primeiros ciclos e o incremento das taxas de crescimento nos ciclos subseqüentes, e qual a relação dessas taxas com a eficiência de biodegradação.

6.3.3 Bateladas Seqüenciais

A primeira batelada seqüencial (S_{q01}) foi conduzida por um tempo total de 330 horas com três ciclos de 110 horas. No primeiro ciclo desta batelada, observa-se uma reduzida eficiência de biodegradação E_B, que pode ser entendida melhor quando comparada com as primeiras 100 horas de processo da batelada simples S_{01}, a qual apresenta eficiência de 61,1%. A eficiência de biodegradação (E_B) atingiu valores médios de 69,7% ao final do primeiro ciclo da batelada Sq_{01}, 96,7 ao final do segundo ciclo e 98,6 ao final do terceiro ciclo. Estes valores também podem ser comparados, agora com mais propriedade devido à semelhança operacional, àqueles obtidos por Cassidy *et al*. (2000), mostrando-se bastante superiores.

Dinâmica de Crescimento Microbiano

O perfil de crescimento microbiano sugere crescimento mais lento no primeiro ciclo que é devido possivelmente ao período de

aclimatação, sendo este diminuído nos últimos ciclos. A dinâmica de crescimento microbiano no terceiro ciclo mostra um crescimento mais acelerado, apontado pela maior taxa de crescimento e pela concentração de biomassa (Figura 6.16), sugerindo a presença da microbiota aclimatada. Observando-se a estabilização da biomassa em torno de 175,0g (ca. 58 g/L) entre as 270 e as 330 horas no final do processo, pode-se sugerir que, a partir deste último ciclo, exista uma tendência à manutenção do crescimento, o que vem a suscitar realização de novas bateladas seqüenciais com maior número de ciclos, para investigar a extensão desse crescimento.

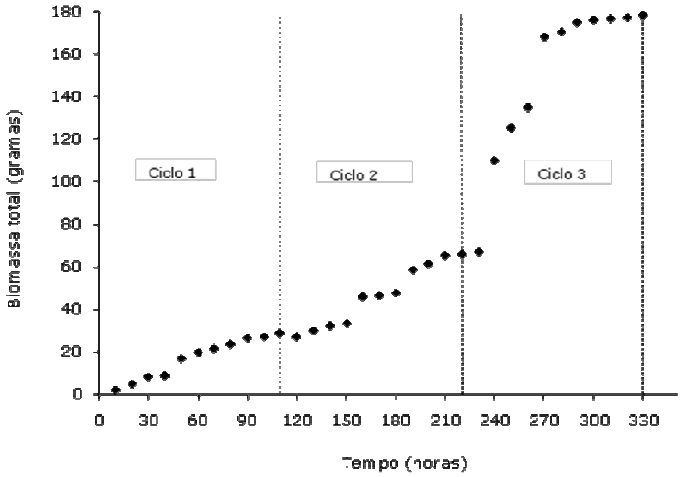


Figura 6.16: Perfil de crescimento microbiano na batelada seqüencial Sq_{01}

Foi proposta, então, uma segunda batelada seqüencial, sendo esta conduzida por quatro ciclos de 72 horas cada, cujo perfil de crescimento microbiano está mostrado na Figura 6.17.

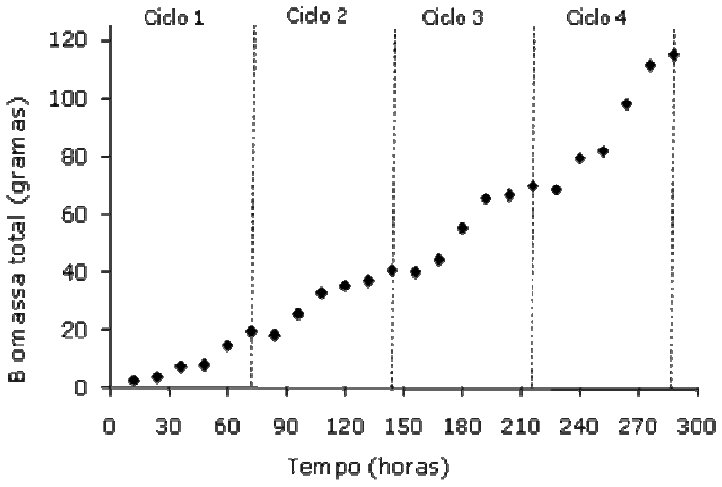


Figura 6.17: Perfil de crescimento microbiano na batelada seqüencial Sq_{02}

Conforme observamos no perfil de crescimento microbiano acima, os baixos valores de biomassa encontrados em um intervalo que vai do início do processo até aproximadamente as 40 primeiras horas, sugere fase ou período *lag*. Observamos estes valores proporcionalmente muito próximos daqueles verificados para a batelada Sq_{01}, para um intervalo de tempo também semelhante, indicando a reprodutibilidade do processo.

Se compararmos as taxas de crescimento microbiano a cada ciclo em cada batelada seqüencial, e entre as duas bateladas (Sq_{01} e Sq_{02}), podemos observar que os maiores valores são verificados na batelada Sq_{01}, e a partir do ciclo 2, de ambas as bateladas, ocorre um aumento significativo nesta taxa (aproximadamente 1,5 vezes). No ciclo 3, observamos a principal diferenciação entre as duas bateladas: enquanto a batelada conduzida com três ciclos mostra altas taxas de crescimento ($0,97h^{-1}$) a batelada com quatro ciclos apresenta quase metade deste valor ($0,54h^{-1}$) (Figura 6.18). Este fenômeno evidencia a influência do tempo de duração dos ciclos. Os ciclos mais longos, de 110 horas, propiciaram um maior crescimento microbiano, demonstrado pelos

valores de biomassa total obtidos. Outra inferência decorrente destas observações é que os "cortes" ou ciclos nas bateladas influenciaram a retomada do crescimento microbiano, acarretando em uma maior aptidão da microbiota a cada renovação da fonte de carbono.

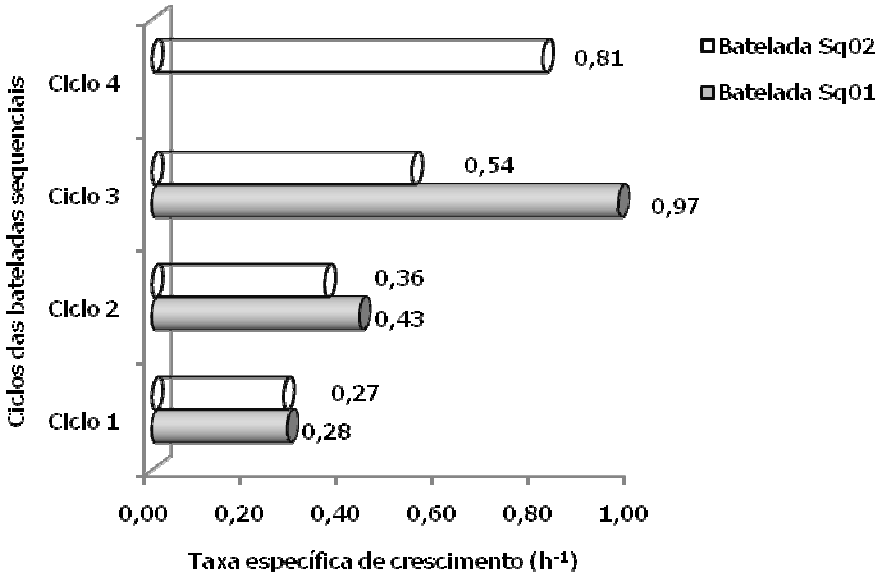


Figura 6.18: Taxas de crescimento nas bateladas sequenciais Sq_{01} e Sq_{02}

Concomitante com os maiores valores de biomassa que podem ser observados ao final da batelada Sq_{01} tem-se os maiores valores de taxas de crescimento também observados para esta batelada. Segundo estes perfis e taxas de crescimento, pudemos atestar que a condução do processo nas condições preconizadas pela batelada seqüencial Sq_{01} favorece mais o crescimento microbiano que nas condições preconizadas pela batelada seqüencial Sq_{02}.

Tais valores podem ser justificados pelo maior tempo total de processo, e principalmente pela maior extensão dos ciclos, que permite maior extensão do período inicial de contato da microbiota com o poluente, capacitando-a à indução enzimática para a utilização da fonte de carbono.

Por outro lado, uma vez que a concentração da carga orgânica aumenta a cada início de ciclo, uma crescente quantidade de substrato torna-se disponível para o crescimento da biomassa microbiana já aclimatada: a este ponto, temos uma condição de alta disponibilidade de fonte de carbono. Esta alteração nas condições de biodisponibilidade do substrato modifica o potencial metabólico dos microrganismos e, conseqüentemente, modifica o seu desempenho na remoção dos contaminantes. Assim, na medida em que se aumenta a concentração do substrato no início do ciclo, a biomassa também aumentará, bem como as taxas globais de remoção do contaminante também aumentarão.

Fato semelhante foi observado por Nano *et al*. (2003) que, trabalhando com tratamento de solo contaminado com óleo diesel em biorreator, constataram que, uma vez que as quantidades iniciais de contaminante eram as mesmas em diferentes bateladas, as taxas de remoção ou degradação do poluente estavam diretamente ligadas à quantidade de carga orgânica reposta a partir do segundo ciclo e à extensão dos ciclos nas bateladas. Quanto maior a quantidade de material introduzido ao final do primeiro ciclo, maiores seriam as concentrações iniciais de resíduo no segundo ciclo, e as taxas de crescimento microbiano, por sua vez, seriam também maiores, em proporcionalidade direta com a extensão dos períodos de reação (intervalo de duração do ciclo). Os autores verificaram incrementos de 20% na concentração celular total para maiores períodos de reação, e incrementos significativos na degradação final do óleo diesel, da ordem de 10%.

Alexander, em 1994, reuniu uma quantidade considerável de trabalhos que demonstram a importância do período inicial de contato da microbiota ou da cultura microbiana com o poluente orgânico. Nesta obra de revisão, muitos trabalhos envolvendo a degradação de naftaleno, *o*-cresol, compostos mono e poliaromáticos, bem como organoclorados, são mostrados chamando-se a atenção para a etapa inicial de degradação, que pode ser dependente, entre outras coisas, da extensão do tempo

inicial de contato do poluente com a microbiota, o que capacita o sistema a produzir melhores taxas de crescimento e degradação.

Pornsunthorntawee *et al.* (2008), em trabalho recente, investigando a produção de biossurfactante por uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* por batelada seqüencial, ao testarem diferentes tempos de extensão de ciclos (23, 47 e 71 horas), observaram que o sistema requereu maior tempo para atingir o que eles caracterizaram como "fase estacionária", (que seria o período em que ocorre uma estabilização na demanda química de oxigênio) na medida em que se aumentavam os tempos de duração dos ciclos. Assim, na batelada em que os ciclos duraram 23 horas, o sistema levou cerca de 1 dia para atingir a "fase estacionária", ao passo que, para as bateladas em que os ciclos duraram 47 e 71 horas, este estágio foi atingido aos 14 e 15 dias, respectivamente.

Convém salientar, entretanto, que nos resultados aqui obtidos, a percepção de que o sistema atingiria essa "fase estacionária", não se mostrou bem clara nos perfis de crescimento obtidos, uma vez que apenas no ciclo 3 da batelada Sq_{01} é que podemos observar a tendência à estabilização em torno de um mesmo valor de biomassa.

Eficiência de Biodegradação e Eficiência Específica de Biodegradação

Como já descrito anteriormente no capítulo de materiais e métodos, utilizamos o artifício do cálculo da eficiência de biodegradação e eficiência específica de biodegradação para estimar a remoção dos hidrocarbonetos presentes no resíduo, como também para estimar a biomassa efetivamente comprometida com este processo.

De acordo com os valores apresentados na Figura 6.19, de um modo mais abrangente, a eficiência global de biodegradação (E_B) na batelada Sq_{01} foi maior que na batelada seqüencial Sq_{02}.

Os valores de E_B no primeiro ciclo das bateladas Sq_{01} e Sq_{02} parecem obedecer a uma proporcionalidade direta com o tempo de duração de cada ciclo. Já no segundo ciclo, é nítido o aumento de tal eficiência de biodegradação para ambas as bateladas, mesmo sendo a biomassa total da batelada Sq_{02} menor que da batelada Sq_{01} (rever na secção anterior Figuras 6.16 e 6.17). Tal fenômeno nos leva a crer na existência de uma biomassa menos competente na batelada Sq_{01}, cujo incremento parece não estar intrinsecamente ligado à biodegradação do resíduo. Observamos, nos ciclos subseqüentes, um pequeno aumento da eficiência no ciclo três para a batelada Sq_{01} (98,6%), e um decréscimo da eficiência na batelada Sq_{02} também no ciclo três (76,2%). Este valor permanece estável no quarto e último ciclo desta batelada (em torno de 75%).

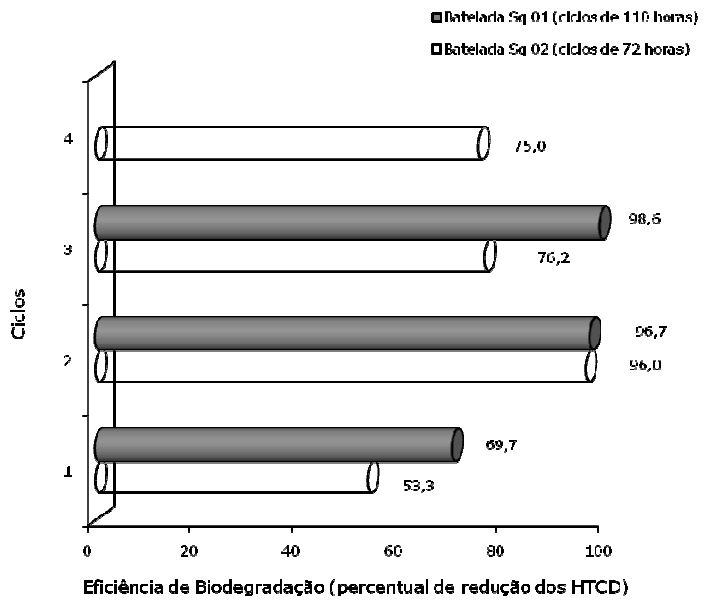


Figura 6.19: Eficiência de Biodegradação (E_B) percentual nas bateladas Sq_{01} e Sq_{02}

Se observarmos estes valores de eficiência de biodegradação isoladamente, podemos inferir que a condução do processo nas condições preconizadas pela batelada Sq_{01} é mais eficiente no que diz respeito à degradação do resíduo de óleo diesel em estudo. Porém, para investigar de forma mais detalhada a contribuição da microbiota presente, levamos

em conta dois fatores importantes na avaliação da efetividade do processo: primeiramente, procuramos visualizar os percentuais de redução dos HTCD relacionados à biomassa acumulada ao final de cada ciclo; segundo, buscamos estabelecer uma relação entre o crescimento microbiano não diretamente relacionado à degradação e a produção de compostos ativos de superfície. Seguindo esta estratégia, obtivemos os valores de eficiência específica de biodegradação (E_{EB}) conforme mostrado na figura 6.20. Através deste acompanhamento pudemos observar que as condições preconizadas na batelada Sq_{02} favorecem o surgimento de biomassa mais competente, efetivamente relacionada com o processo de biodegradação dos hidrocarbonetos presentes no resíduo, não obstante a biomassa total acumulada seja muito maior em todos os ciclos da batelada Sq_{01}. Outra observação importante é que, embora seja perceptível uma tendência ao aumento da eficiência de biodegradação a cada ciclo, a eficiência específica de biodegradação tende a diminuir em ambas as bateladas, a cada ciclo. Suscitamos aqui a suposição de que a impactação do biorreator com altas concentrações celulares, na tentativa de atingir altas taxas de degradação, obedece a fatores limitantes. Este comportamento deve-se possivelmente ao acúmulo de biomassa total (uma vez que a quantificação microbiana aqui realizada se deu por pesagem de biomassa total da fase aquosa ao longo de todo o processo e não por contagem de células viáveis) e ao crescimento microbiano relacionado à produção de compostos ativos da superfície na fase aquosa.

Por fim, quando normalizamos os valores de eficiência de biodegradação em termos de taxas de biodegradação, dividindo-se o valor de eficiência de biodegradação ao final de cada ciclo pela quantidade de horas dos ciclos, obtemos maiores valores de taxas de biodegradação para a batelada Sq_{02}, conforme observado na Figura 6.21. Esta batelada seqüencial conduzida em quatro ciclos de 72 horas apresentou comportamento bastante peculiar. Foi observado menor valor de eficiência global de biodegradação para os ciclos 3 e 4, mas os valores de eficiência

específica de biodegradação, bem como os valores das taxas de biodegradação, foram bastante superiores àqueles valores observados para a batelada seqüencial Sq_{01} .

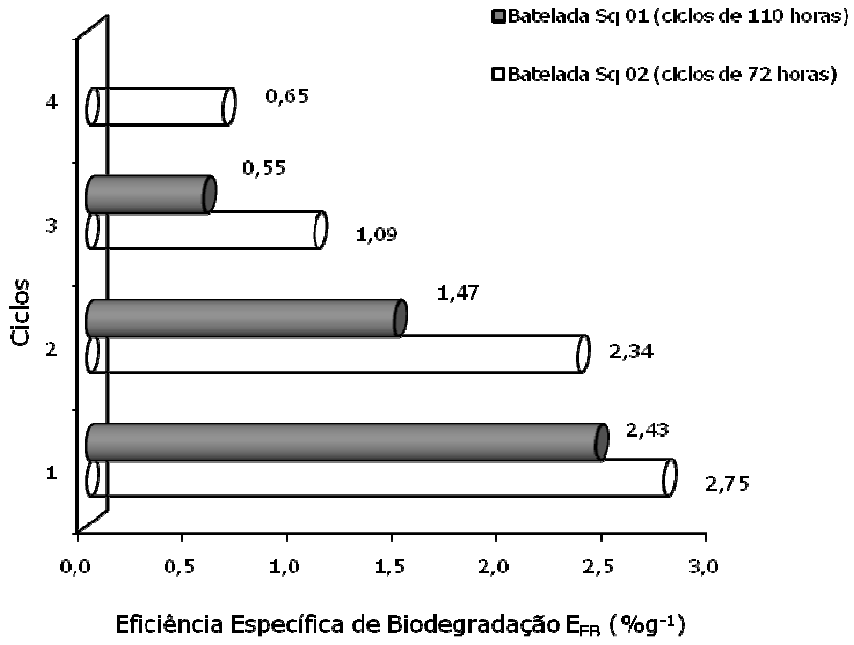


Figura 6.20: Eficiência Específica de Biodegradação (E_{EB}) nas bateladas Sq_{01} e Sq_{02}

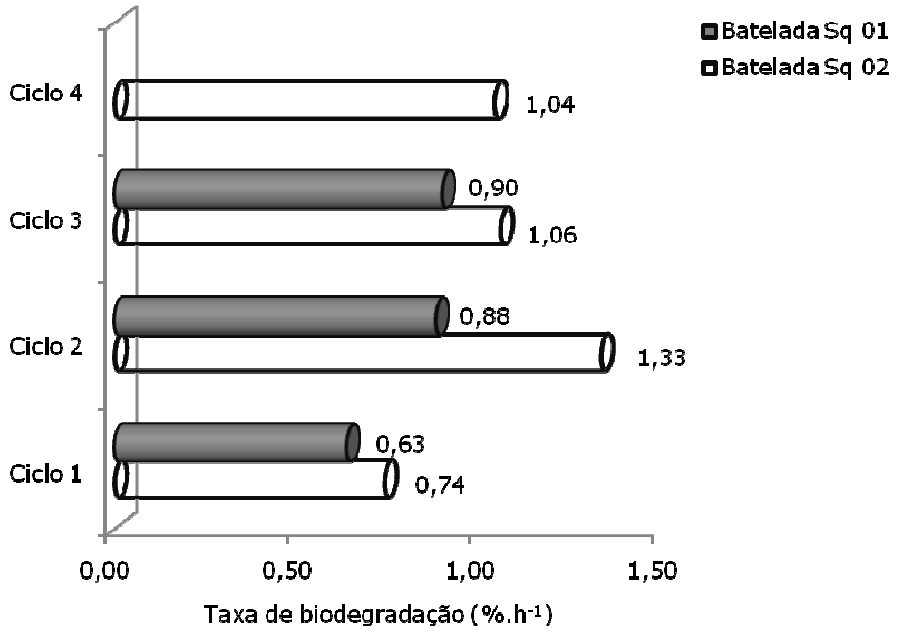


Figura 6.21: Taxas de biodegradação nas bateladas Sq_{01} e Sq_{02}

Tensão Superficial na Fase Aquosa

Evidenciamos a produção de compostos ativos de superfície pelo abaixamento da tensão superficial do meio aquoso ao final de cada ciclo. Como mostrado na Figura 6.22, há uma queda substancial na tensão superficial do meio aquoso ao final dos ciclos 2 e 3 na batelada seqüencial Sq_{01} (de 71,2mN.m^{-1} para 37,5mNm^{-1} no final do ciclo 2 e para 35,2mN.m^{-1} no final do ciclo 3). Já na batelada Sq_{02}, a queda é menos acentuada, embora chegue a atingir os 47,5mN.m^{-1} ao final do ciclo 4.

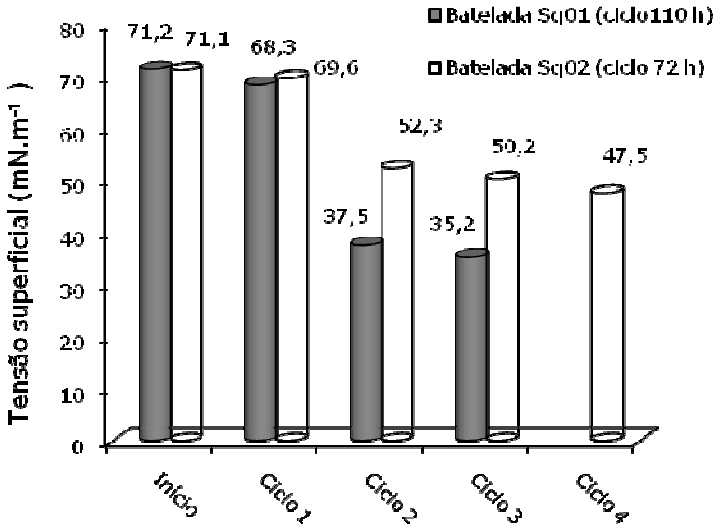


Figura 6.22: Tensão superficial da fase aquosa nas bateladas Sq_{01} e Sq_{02}

Muitos microrganismos capazes de produzir moléculas que reduzem a tensão superficial do meio aquoso (como os biossurfactantes), o fazem em condições adversas e por estímulos ainda não muito bem elucidados. Os autores têm apontado diversas hipóteses na tentativa de explicar o porquê da produção de tais compostos. As principais circunstâncias em que ocorre a produção de biossurfactantes apontadas pelos autores são: estratégia de deslocamento do ambiente – os biossurfactantes ajudariam no deslocamento dos microrganismos através da aderência das células à superfície dos materiais onde elas estão se desenvolvendo e, com isso, promoveria a retirada estratégica do meio

onde há a presença de uma substância não preferencial; assimilação da fonte de carbono – as células solubilizam ou pseudo-solubilizam a fonte de carbono não preferencial para melhor assimilarem, sobretudo quando essas fontes são apolares (LANG, 2002; RON, 2001).

Como tem sido discutido em muitos trabalhos, nos períodos que antecedem a eliminação dos hidrocarbonetos, verifica-se também a preparação do aparato enzimático para que ocorra a produção de biossurfactantes e para facilitar a assimilação dos hidrocarbonetos pelas células (LANG, 2002, RON & ROSEMBERG, 2002).

É largamente reportado na literatura o crescimento microbiano associado à produção de biossurfactantes e à degradação de hidrocarbonetos. Por outro lado, também não têm sido poucos os trabalhos que nos revelam o aumento de biomassa não relacionado aos aumentos nas taxas degradação de hidrocarbonetos, mas sim diretamente ligados à produção de biossurfactantes.

Maachi *et al*. (2001), acompanhando a cinética de degradação de duas frações de óleo (faixas de ebulição de 180-235ºC e de 235-350ºC) por uma linhagem da espécie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa*, constataram incrementos maiores que 30% no crescimento microbiano, diretamente proporcional à concentração inicial de resíduo adicionado sem, contudo terem verificado correlação direta entre tal crescimento e a biodegradação. Estes autores evidenciaram que ocorre uma degradação de frações específicas de hidrocarbonetos e, logo em seguida, uma degradação dos metabólitos produzidos. Neste ínterim, observaram uma redução significativa na tensão superficial da fase aquosa (55% em relação à tensão superficial inicial).

Collina *et al.* (2005) observaram que o intervalo de tempo no qual foram atingidas as maiores taxas de degradação do naftaleno não coincide com o intervalo de tempo em que ocorrem as maiores taxas de produção de CO_2. As maiores taxas de produção de CO_2 foram verificadas

em períodos que antecedem aqueles em que ocorreram as maiores taxas de degradação. Tais autores destacam ainda que esta desconexão se dá devido ao acúmulo de metabólitos intermediários antes da completa mineralização, o que indica uma grande atividade microbiana às expensas destes metabólitos.

Shipppers *et al.* (2000), estudando a influência da adição de soforolipídio na biodegradação de fenantreno por *Sphingomonas yanoikuyae*, verificaram uma redução na concentração deste hidrocarboneto de 127mg.L^{-1} para 80mg.L^{-1} (redução em torno de 37%) em dez horas de processo conduzido por batelada simples, após a adição do biossurfactante. Os autores observaram ainda que as taxas máximas de biodegradação dependeram linearmente da concentração de soforolipídio, e que, embora tenham observado crescimento microbiano expressivo em ambos os experimentos (com e sem adição de soforolipídios), houve variação significativa na população de *Sphingomonas yanoikuyae* concomitante com o aumento da concentração de biossurfactante adicionado. Estes resultados associam o crescimento microbiano neste ponto à presença de biossurfactantes, quer seja através do aumento de biomassa promovido pela biodisponibilização dos hidrocarbonetos, quer seja, sobretudo pela utilização dos biossurfactantes como substrato.

Obtivemos as melhores repostas globais com as condições preconizadas pela batelada seqüencial $Sq_{01.}$ Entretanto, do ponto de vista da biodegradação efetiva e eficiente, verificamos que as condições preconizadas pela batelada seqüencial Sq_{02} parecem ser mais adequadas no sentido de se desprender menor tempo total de processo, utilizando-se mais ciclos com menor duração, e atingindo-se uma maior eficiência sem, contudo impactar o biorreator com grandes quantidades de células.

Para efeito comparativo, na Figura 6.23 está mostrado o aspecto do meio reacional nas bateladas de ajuste SA_{01} e seqüencial Sq_{01}, após 120 horas de processo.

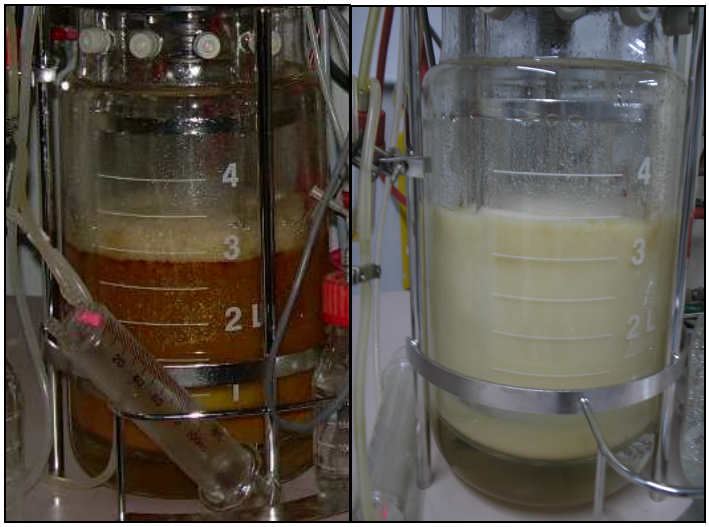


Figura 6.23: Meio reacional após 120 horas – SA_{01} (esquerda) e Sq_{01} (direita)

6.4 Ensaios Respirométricos

A partir dos resultados peculiares de taxas de biodegradação obtidos com a batelada seqüencial Sq_{02} (ciclos de 72h), foram realizados ensaios respirométricos com a microbiota aclimatada, com a finalidade de acompanhar o perfil de consumo de oxigênio em cada ciclo e verificar possíveis relações entre estes perfis e as taxas de biodegradação. Cabe rever que nesta batelada foi observado menor valor de eficiência global de biodegradação do que na batelada Sq_{01} (ciclos de 110h), mas os valores de eficiência específica de biodegradação, bem como os valores das taxas de biodegradação, foram bastante superiores àqueles valores observados para a batelada seqüencial Sq_{01}.

Os resultados obtidos utilizando-se técnicas respirométricas revelaram o elevado potencial da microbiota endógena quando estimulada e aclimatada. De acordo com o perfil mostrado na Figura 6.24, o consumo de oxigênio aumenta consideravelmente quando se inocula o material

proveniente da fase aquosa do final do ciclo 1 na batelada Sq_{02}. Observamos, ainda, a tendência ao restabelecimento da atividade microbiana após 40 horas de ensaio, sugerindo que um grupo de microrganismos da comunidade mista é capaz de utilizar metabólitos produzidos por outros grupos, como fonte de carbono e energia.

Este fenômeno, largamente estudado, é comumente chamado de cometabolismo (ATLAS, 1984; ALEXANDER, 1994; MAIER, 1999). Atentamos para esta conceituação, levando em consideração as discussões suscitadas por Alexander (1994), nas quais o autor chama a atenção para algumas discordâncias de ordem semântica. Classicamente, o termo cometabolismo tem sido utilizado para descrever o fenômeno em que microrganismos utilizam mais de um substrato. Nesta visão, cometabolismo se refere unicamente ao fenômeno em que os microrganismos assimilam um substrato que não é utilizado para o crescimento, mas que é metabolizado na presença de um segundo substrato que dá suporte ao crescimento. A idéia de cometabolismo aqui adotada, entretanto, é aquela utilizada na obra de Alexander (1994), "*Biodegradation and Biodeterioration*", cuja conceituação, por sua vez, está respaldada e fundamentada nos diversos trabalhos que nesta obra estão discutidos. Segundo este autor, cometabolismo é a "*transformação de um composto orgânico por um microrganismo inapto a utilizá-lo (ou inapto a utilizar algum de seus constituintes) como fonte de carbono e energia*". Desta forma, por exemplo, um determinado microrganismo pode oxidar compostos orgânicos sem crescer sua população às expensas desta oxidação e, por sua vez, os compostos oxidados estarão bioquimicamente disponíveis a outro grupo de microrganismos. Este segundo grupo de microrganismos cresce às expensas desses compostos oxidados e os degrada a moléculas de tamanhos diferentes as quais poderão ser substrato para crescimento de outro grupo e assim sucessivamente. A idéia de "*co*", neste conceito, refere-se à atuação conjunta de dois ou mais grupos microbianos. Na conceituação clássica, a idéia de "*co*", parece

estar ligada apenas ao fato de termos mais de um substrato envolvido no fenômeno.

Ainda na mesma figura 6.24, observamos também a atividade metabólica (mediante perfil de consumo de oxigênio) no meio reacional em que não foi acrescido inóculo, designado como "resíduo não-tratado". Neste meio, onde estão presentes apenas meio mineral e resíduo não-tratado, o período em que se inicia a atividade metabólica, o qual inferimos ser o período necessário para a preparação da microbiota à indução de enzimas capazes de oxidar e degradar as moléculas de alguns compostos presentes no resíduo, foi em torno 35 horas. Este intervalo de tempo sugere período de aclimatação.

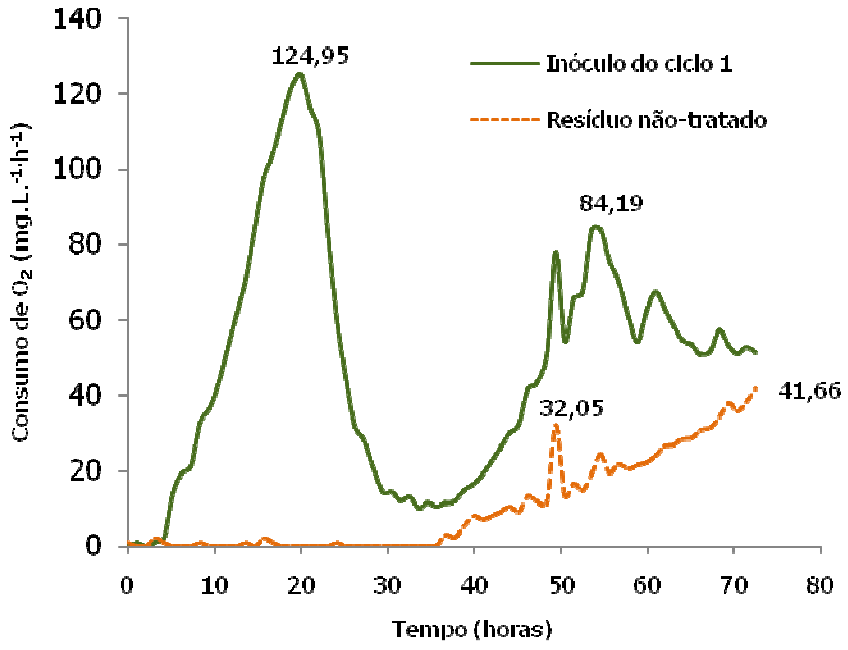


Figura 6.24: Perfil de consumo de O_2 a partir do inóculo aclimatado do ciclo 1

Celis *et al*. (2008), em estudo de biodegradação de ácido 2,4 diclorofenoxiacético, por batelada sequencial em ambos os sistemas aeróbico e anaeróbico, observaram claramente a influência do período de aclimatação na degradação desta substância. Os autores mostram que a remoção completa deste composto se deu quando o mesmo foi submetido a um período de aclimatação de 30 dias, para os estudos em aerobiose, e

70 dias, nos estudos em anaerobiose. Guardadas as dimensões dos reatores utilizados e, principalmente, a natureza química e a toxicidade do composto testado, percebemos a clara influência do período de aclimatação na efetividade do processo aqui estudado.

Ao observarmos os perfís de consumo de oxigênio juntos em um mesmo gráfico (Figura 6.25), notamos mais uma vez a nítida contribuição da fase ou período de aclimatação na redução do tempo inicial de atividade da comunidade mista. Verificamos o início da atividade bioquímica microbiana a partir de, aproximadamente, 0,5 h de ensaio, para o resíduo acrescido do inóculo proveniente do ciclo 2; 1,5 h de ensaio quando é acrescido inóculo proveniente do ciclo 3, e aproximadamente 2,5 h de ensaio, quando é acrescido o inóculo proveniente do ciclo 4. De uma maneira geral, percebe-se a diminuição no tempo de início da atividade microbiana nesses três ciclos.

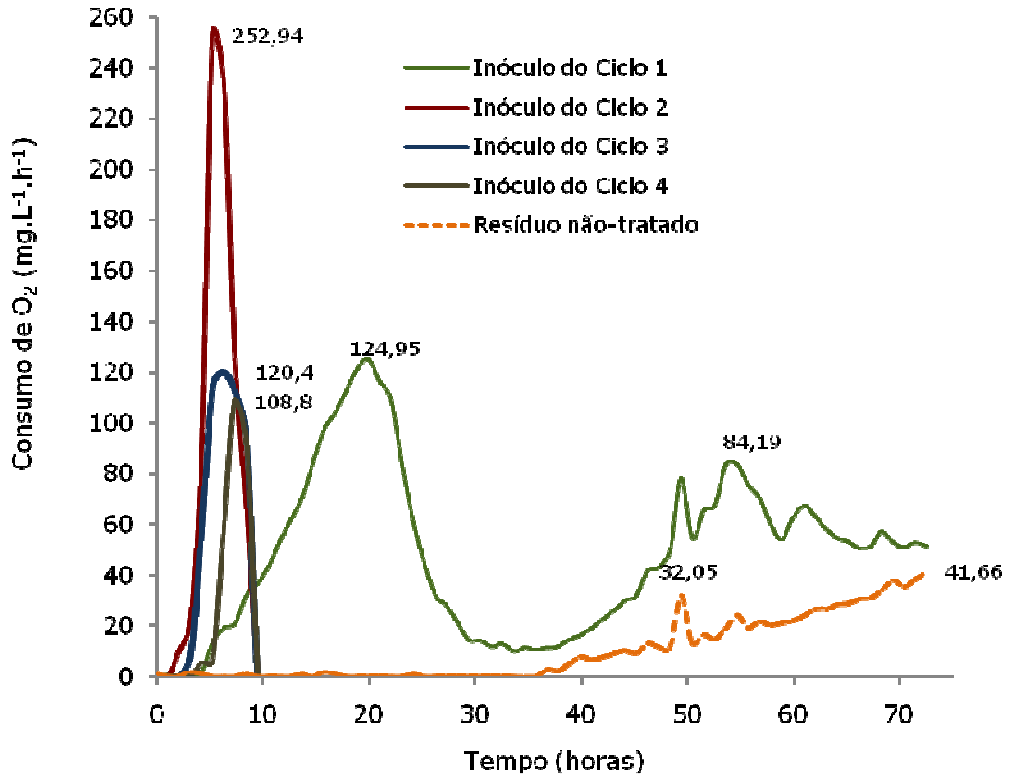


Figura 6.25: Perfis de consumo de O_2 dos inóculos aclimatados de todos os ciclos

A atividade microbiana no resíduo acrescido de inóculo do ciclo 2 se sobressai à atividade no resíduo acrescido de inóculo dos ciclos 3 e 4, o que pode estar associado à perda de eficiência de biodegradação que verficamos nestes dois últimos ciclos da batelada sequencial Sq_{02}.

Para melhor visualizar e compreender as possíveis conexões entre consumo de oxigênio e a redução dos hidrocarbonetos presentes no resíduo, associamos as taxas máximas de consumo de oxigênio obtidas nos experimentos de respirometria, com as taxas de biodegradação em cada ciclo da batelada em biorreator. Como já discutido no capítulo anterior, a taxa de biodegradação é dada pelo quociente entre a eficiência de biodegradação (E_B) e o tempo de duração do ciclo, no caso, fixado em 72 horas, por se tratar da batelada Sq_{02}, sendo os valores expressos em $\%.h^{-1}$, por convenção aqui adotada. Desta forma, tal relação está mostrada na Figura 6.26.

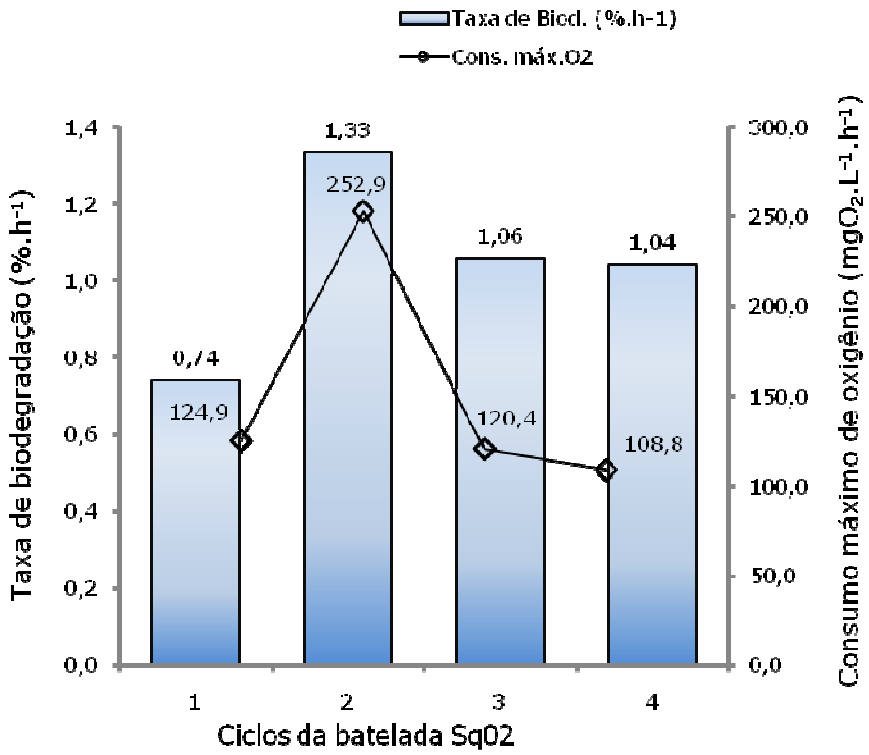


Figura 6.26: Relação entre taxas de biodegradação e consumo de oxigênio

Pudemos verificar, a partir daí, uma conexão clara entre a atividade bioquímica da comunidade mista aclimatada proveniente de cada ciclo e as taxas de biodegradação. A maior taxa de biodegradação (1,33%.h^{-1}) observada para o ciclo 2 da batelada coincide com o maior valor de taxa de consumo de oxigênio verificada para o resíduo inoculado com material proveniente deste mesmo ciclo (252,9mgO_2.L^{-1}.h^{-1}). Para o ciclo 1, foi observado um valor menor de consumo de oxigênio (124,5mgO_2.L^{-1}.h^{-1}) que no ciclo 2, e a menor taxa de biodegradação de toda a batelada está associada a este valor (0,74%.h^{-1}). As taxas de biodegradação caem de 1,33, no ciclo 2, para 1,06%.h^{-1} e 1,04%.h^{-1}, respectivamente, nos ciclos 3 e 4, e o consumo de oxigênio acompanha esta queda, atingindo nos ciclos 3 e 4, valores de 120,4mgO_2.L^{-1}.h^{-1} e 108,8mgO_2.L^{-1}.h^{-1}, respectivamente. Muito embora estes valores de consumo de oxigênio sejam perceptivelmente menores nos ciclos 3 e 4 que no ciclo 2, observa-se que são também menores que os valores encontrados no ciclo 1 (124,5mgO_2.L^{-1}.h^{-1}), o que, aparentemente, não está acompanhando proporcionalmente a redução dos valores de taxa de biodegradação (0,74%.h^{-1} no ciclo 1, contra 1,06%.h^{-1} e 1,04%.h^{-1} nos ciclos 3 e 4, respectivamente). Porém, de uma maneira abragente, podemos constatar a perda de eficiência de biodegradação e, consequentemente, a redução da taxa de biodegradação nestes dois últimos ciclos.

É possível que esta queda desproporcional do consumo de oxigênio esteja relacionada à degenerescência das células devido a sinalizações ocorridas por substâncias produzidas pelos próprios membros da comunidade mista. Entretanto, é bom lembrar que a verificação do consumo de oxigênio aqui realizada não está diretamente ligada ao experimento em biorreator, mas sim a condições estabelecidas nos ensaios de respirometria, sendo estes resultados provenientes de uma estimativa a partir da utilização da microbioata aclimatada do experimento em biorreator.

6.5 Microbiota Associada ao Processo

A partir da utilização de técnicas clássicas de isolamento de microrganismos, foram obtidos 10 isolados do resíduo não tratado com base nas suas características morfológicas e coloniais. Destes, seis foram obtidos utilizando-se técnicas para isolamento de bactérias e quatro utilizando-se técnicas para isolamento de fungos.

As características dos isolados fúngicos e bacterianos obtidos a partir do isolamento do resíduo não tratado, bem como das bateladas seqüenciais estão descritas nas Tabelas 6.16 e 6.17 a seguir:

Tabela 6.16: Isolados fúngicos

Característica	**Designação do isolado**			
	F1	**F2**	**F3**	**F4**
Forma	Arredondada	Miceliar	Arredondada	Arredondada
Bordo da colônia	Arredondado liso	Filamentosa	Arredondado liso	Arredondado liso
Elevação da colônia	Côncava	Irregular	Côncava	Irregular
Coloração da colônia	Branca	Amarelada	Branca	Opaca

As características morfo-estruturais e coloniais dos isolados obtidos a partir do resíduo não tratado, também foram verificadas nos isolados obtidos no resíduo tratado ao longo do processo conduzido por batelada seqüencial. Desta forma alguns deles foram considerados como sendo os mesmos isolados e por isso mantida a nomenclatura.

Tabela 6.17: Isolados bacterianos

Característica	**Designação do isolado**					
	B1	**B2**	**B3**	**B4**	**B5**	**B6**
Forma da célula	Bastonete	Cocobacilo	Bastonete pequeno	Bastonete	Bastonete pequeno	Bastonete
Bordo da colônia	Arredondado	Arredondado	Arredondado	Arredondado	Circular	Arredondado
Elevação da colônia	Côncava	Ondulada	Irregular	Côncava	Irregular	Côncava
Coloração da colônia	Amarela	Branca	Branca	Esbranquiçada	Amarela	Amarela
Arranjo das células	Separadas	Separadas	Separadas	Separadas	Separadas	Separadas
Teste Gram	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Dentre os isolados microbianos obtidos por técnicas adaptadas para isolamento de microrganismos tolerantes e hidrocarbonoclásticos,

foram encontradas células com características leveduriformes, sendo estas também muito semelhantes entre os isolados obtidos ao longo do processo. Assim, estes isolados foram designados como um único isolado, o I-1 caracterizado como fungo leveduriforme.

Os isolados B1, B3, B4, B5 e B6, apresentaram características preliminares de bactérias do gênero *Pseudomonas*.

À parte todos os gêneros já descritos na revisão da literatura, destacamos aqui algumas espécies isoladas por técnicas clássicas ao longo de processos conduzidos por bateladas simples e seqüenciais por Cassidy & Hudak (2001): *Candida tropicalis, Brevibacterium casei, Flavobacterium aquatile, Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*. Estas espécies de leveduras e bactérias foram encontradas predominando ao longo de todo o processo descrito pelos autores.

Ecologia Molecular Microbiana

Utilizando-se os mesmos critérios adotados nos experimentos de respirometria quanto à escolha da batelada a ser investigada (melhores taxas de biodegradação e melhores valores de eficiência específica de biodegradação), selecionou-se aqui também a batelada seqüencial Sq_{02} para se avaliar as mudanças na comunidade microbiana mista ao longo do processo.

Desta forma, investigaram-se os grupos predominantes ao longo desta batelada, utilizando-se a técnica de DGGE, a fim de se estabelecer relações entre tais grupos e os altos valores de taxa de degradação e de eficiência específica de biodegradação, e que mudanças ocorridas na comunidade microbiana poderiam estar associadas à variação nestes valores.

A partir da técnica de DGGE utilizada foram obtidas as bandas em géis as quais são provenientes dos fragmentos de 16S rDNA. Na fotografia do gel, mostrada na Figura 6.27, estão indicadas as bandas

correspondentes aos respectivos tratamentos. Todas as bandas foram cortadas, purificadas e seqüenciadas em seqüenciador *MegaBace*®.

As bandas indicadas por setas correspondem aos fragmentos que apresentaram maior percentual de similaridade com a base de dados e cujo seqüenciamento representou maior precisão na identificação dos nucleotídeos das seqüências. Empregando-se o seqüenciador *MegaBACE*®, chegou-se às seqüências que posteriormente foram identificadas utilizando-se o sistema de busca BLAST-N. As seqüências obtidas foram comparadas às da base de dados GenBAnk, estabelecendo-se valores de percentual de similaridade entre elas.

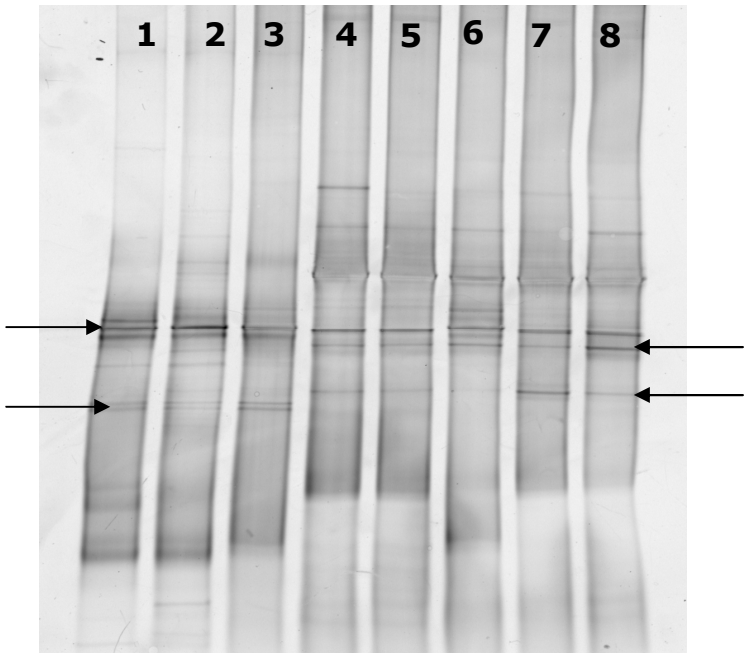


Figura 6.27: Fragmentos de rDNA em gel de agarose:

lane 1: resíduo não tratado;
lane 2: ciclo 1 início;
lane 3: ciclo 1 após 12horas;
lane 4: final do ciclo 1;
lane 5: ciclo 2 após 12 horas;
lane 6: ciclo 3 após 12 horas;
lane 7: ciclo 3 final;
lane 8: ciclo 4 final.

Na Tabela 6.18 estão mostradas as identidades das seqüências nucleotídicas obtidas, os microrganismos referência constantes na base de

dados, o código de acesso das referências, os percentuais de similaridade e as etapas do processo às quais tais seqüências estão associadas. Estas seqüências correspondem às indicações das setas na Figura 6.27.

Tabela 6.18: Identidade das seqüências das bandas derivadas dos fragmentos de 16S rDNA

Código de acesso (*GenBank*)	Microrganismo referência	Similaridade (%)	Etapa do processo
FJ006889	*Pseudomonas sp.* WPCB087	94	(A)
EU852413	*Pseudomonas sp.* P85	88	(B)
EU282110	*Burkholderia cepacia* GS3C	92	(C)
AB079372	*Burkholderia sp.* S-2	94	(D)

(A) Resíduo não tratado e todos os ciclos;
(B) Resíduo não tratado; ciclo 1 início e ciclo 1, 12hs;
(C) Ciclo 1 final; ciclo 2, 12hs; ciclo 3, 12hs; ciclo 3 final e ciclo 4 final;
(D) Ciclo 1 final; ciclo 2, 12hs; ciclo 3, 12hs; ciclo 3 final e ciclo 4 final.

Para inferir a distância de ligação genética entre as seqüências dominantes, bem como sua distribuição ao longo do processo, utilizou-se o coeficiente de correlação de Ward e Pearson (PEIXOTO *et al*., 2006), resultando em uma matriz geradora da distância entre as seqüências. Adicionalmente, foi gerado um dendrograma derivado dessa matriz, utilizando-se o software *Statistica® v 5.1* (Figura 6.28).

Observando o dendrograma (Figura 6.28), percebemos de imediato a ocorrência de uma mudança significativa nos componentes dominantes da comunidade a partir do final do ciclo 1 da batelada, separando os membros da comunidade em dois grandes blocos: o primeiro, constando daqueles membros presentes no resíduo não tratado e no resíduo tratado nas primeiras 12 horas do ciclo 1 (indicação "Ciclo 1T1"); e o segundo constando daqueles membros presentes no resíduo tratado desde o final do ciclo 1 até o final do ciclo 4. Esta mudança mais significativa na estrutura da comunidade pode ser também evidenciada pelo surgimento de novas bandas, que aparecem a partir do final do ciclo 1 (figura 6.27 *lane* 4 e figura 6.28 indicação "Ciclo 1 Final"). A partir deste ponto, as bandas aparecem quase todas na mesma posição, diferindo

basicamente na intensidade (figura 6.27 *lane*: 5, 6, 7 e 8). Entre o final do ciclo 1 e as primeiras 12 horas do ciclo 2 (indicação "Ciclo 2T1" figura 6.28 e figura 6.27 *lane* 5), verifica-se na comunidade o estabelecimento de um novo grupo de membros dominantes com características semelhantes entre si. A partir daí, ocorrem pequenas mudanças durante o ciclo 3, sendo verificada uma tendência ao restabelecimento da comunidade presente ao final do ciclo 4 (indicação "Ciclo 4 Final" figura 6.28 e figura 6.27 *lane* 8).

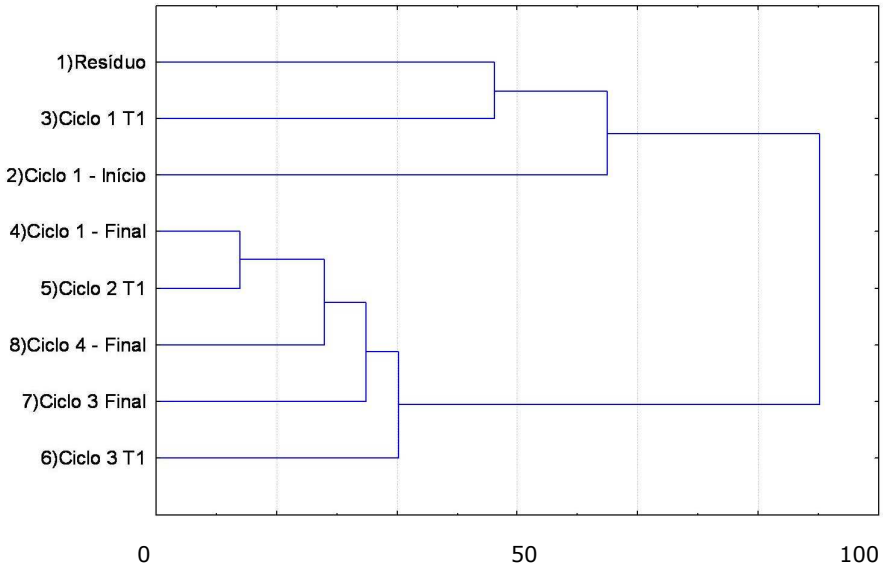


Figura 6.28: Dendrograma - Análise da distância de ligação entre os fragmentos de 16S rDNA extraídos de amostras das diversas etapas da batelada seqüencial Sq_{02}

É perceptível ainda, a prevalência de alguns grupos dominantes, estando presentes desde o resíduo não tratado até o material tratado ao final da batelada, o que pode ser evidenciado pelas bandas presentes no gel (figura 6.27 do *lane* 1 ao *lane* 8). Outros grupos aparecem no início do processo e depois não prevalecem após 12 horas do ciclo 1 (figura 6.27 do *lane* 1 ao *lane* 3), e por último verificamos o surgimento de novas bandas a partir do ciclo 2 (figura 6.27 do *lane* 4 ao *lane* 8).

Comparando estes resultados com os resultados de eficiência de biodegradação obtidos, é possível estabelecermos uma relação entre a

mudança, ou *shift*, na comunidade, com as mudanças de eficiência de biodegradação nos ciclos 2 e 3, conforme mostrado na figura 6.19 do item 6.3.3 (secção anterior). Lá, verificamos que a eficiência de biodegradação (E_B) atinge 53,3% ao final do ciclo 1, chega ao máximo de 96,0% no ciclo 2, e posteriormente cai para 76,2% no ciclo 3, permanecendo em torno de 75,0% ao final do ciclo 4. Estes valores iniciais de eficiência de biodegradação no ciclo 1, podem estar indicando uma adaptação da microbiota presente no resíduo que, como mostrado no dendrograma e nos perfis das seqüências em gel, apresentam a predominância de poucos grupos no início do ciclo 1, sendo praticamente os mesmos grupos observados no resíduo não tratado. A eficiência de biodegradação no final do ciclo 2 atinge valores percentuais máximos concomitantemente com o *shift* que ocorre na comunidade ao final do ciclo 1 e início do ciclo 2. Posteriormente, a partir do ciclo 3, verifica-se uma pequena variação nos grupos dominantes e uma queda na eficiência de biodegradação, que pode estar associada à presença de metabólitos tóxicos para esses grupos (muito embora a ecotoxicidade a este ponto do processo tenha também diminuído – discussão no próximo tópico).

Evans *et al*. (2004), estudando o impacto da bioestimulação e da contaminação por petróleo na diversidade bacteriana de solo, observaram maiores mudanças na comunidade em solo contaminado quando comparada à comunidade presente em solo bioestimulado não contaminado. Embora o trabalho citado não reporte experimentos em biorreator, é importante salientarmos que, utilizando as mesmas técnicas moleculares que as utilizadas no presente trabalho, os autores perceberam também o momento em que ocorreram mudanças significativas na comunidade a partir da introdução da mistura hidrocarbônica no meio estudado. Estas observações evidenciam que, a utilização dos estudos de ecologia molecular microbiana por técnicas como as de DGGE associada aos biotratamentos de resíduos, favorecem à investigação das mudanças na comunidade microbiana responsável pela

degradação do poluente orgânico, podendo-se com isto, por exemplo, inferir em que momento do processo poderemos fazer ajustes nas condições químicas e físico-químicas do meio reacional para favorecer a determinados grupos microbianos.

Outra característica importante nos estudos de ecologia microbiana associada aos biotratamentos é a possibilidade de avaliação do impacto causado na diversidade microbiana pela adição de resíduos oleosos ou outros materiais recalcitrantes. Li Hui *et al*. (2007), estudando a dinâmica das mudanças na estrutura da comunidade microbiana durante a degradação de compostos de petróleo, verificaram que o número de bandas de DGGE decresceu de 40 para 25, quando as concentrações de óleo testadas chegaram a valores de 5.000mg/kg de solo, confirmando com isso que a altas concentrações os compostos recalcitrantes promovem uma pressão seletiva na comunidade.

Outrossim, verifica-se também a importância assumida pelas investigações dos perfis da comunidade microbiana por DGGE no delineamento de culturas mistas com elevado potencial degradador de hidrocarbonetos de petróleo. Díaz-Ramirez *et al*. (2007), em trabalho recente, avaliaram a atividade degradadora de dez isolados microbianos frente a diferentes hidrocarbonetos de petróleo, analisando os perfis em géis de cada tratamento e observado as seqüências prevalentes em cada situação. Desta forma, os autores propuseram um consórcio microbiano com base nas habilidades degradadoras particulares de cada microrganismo.

Nas investigações aqui realizadas, verificamos que as condições preconizadas pelo processo permitiram a adaptação de alguns grupos de microrganismos da comunidade presentes no resíduo, colocando-os em evidência pela sua capacidade de tolerar e, principalmente, degradar os hidrocarbonetos do resíduo. Nosso alvo é, portanto, não o estudo dos

efeitos do resíduo sobre a microbiota, mas os reflexos que as mudanças na comunidade podem vir a ter na efetividade do processo.

Convém salientar que investigações da dinâmica das mudanças na comunidade não refletem apenas os microrganismos ativos presentes no resíduo, mas sim todo o DNA encontrado no meio reacional. Desta forma, destacamos que as bandas reveladas no gel de DGGE refletem a dominância de grupos, não significando que alguns grupos anteriores, por exemplo, que foram evidenciados no início do processo, tenham desaparecido nas etapas subseqüentes, mas sim que tenham diminuído significativamente sua população. Do contrário, muitos grupos que são verificados em todas as etapas do processo, podem não necessariamente estar ligados à biodegradação, mas sim ao acúmulo de biomassa, uma vez que, no caso das bateladas seqüenciais, trabalha-se com a biomassa acumulada ao longo do processo, sendo esta mantida na fase aquosa durante todos os ciclos. Eichner *et al*. (1999), mostram que o número e intensidade das bandas de DGGE não são iguais ao número e abundância de genótipos dentro da comunidade microbiana devidos às características da filogenia baseada no 16S rDNA e à tendência à amplificação do PCR a partir de misturas parentais complexas.

É possível que as bandas representem as espécies mais abundantes, mais ativas, ou aquelas cujo DNA seja mais extraível, ou ainda todas essas alternativas ao mesmo tempo. Ainda não existe consenso com relação a qual dessas possibilidades é a mais propensa a acontecer. Entretanto, tem-se observado que a técnica de DGGE é bastante sensível e rápida para a investigação das mudanças na estrutura da comunidade. Para os estudos de biodegradabilidade ou biotratamento em biorreatores, sobretudo quando da condução do processo por bateladas seqüenciais, onde é possível a avaliação do material tratado a cada ciclo, esta técnica revela-se como uma ferramenta que pode ser amplamente utilizada na investigação dos agentes biodegradadores, bem

como na otimização das condições de tratabilidade com base nas capacidades de cada espécie isoladamente.

Em relação às identidades das seqüências de fragmentos de 16S rDNA aqui reveladas, verificamos percentuais de similaridade relativamente baixos, quando comparados a uma parcela significativa de trabalhos publicados nesta área, onde, comumente utilizam-se percentuais não menores que 98%. Cabe salientar que, as identificações foram feitas a partir de seqüências parciais de DNA. Algumas apenas com o seguimento *foward* outras apenas com o seguimento *reverse*, devido a dificuldades encontradas na purificação do DNA. Apesar disto, verificamos que dois dos quatro microrganismos referência indicados pela base de dados *GenBank*, foram isolados de ambientes com histórico de contaminação por compostos hidrocarbônicos (Tabela 6.19).

Tabela 6.19: Histórico das referências do *GenBank*

ACESSO/AUTORES	REFERÊNCIA	TRABALHO	ORIGEM/INSTITUIÇÃO
FJ006889 (2008) Baik,K.S., Park,S.C. & Seong,C.N.	*Pseudomonas sp.* WPCB087 16S rRNA, seqüência parcial	"Diversity of Bacterial Community in Freshwater of Woopo Wetland"	Department of Biology, University Maegok-Dong South Korea
EU852413 (2008) Bautista,M.A., Bedoya-Reina,O.C. and Dussan,J.	*Pseudomonas sp*. P85 16S rRNA seqüência parcial	"Evaluation of primers targeting the rpoB gene and different hypervariable regions of the 16S rRNA gene for the assessment of a hydrocarbon-degrading bacterial consortium using PCR-DGGE"	Biological Sciences, Universidad de los Andes, Bogota, Colombia
EU282110 (2008) Wu,R.-R. and Dang,Z.	*Burkholderia cepacia* GS3C 16S rRNA, seqüência parcial	"n-alkanes degrading bacteria"	Environmental Science and Engineering, South China University of Technology
AB079372 (2008) Amo,Y.	*Burkholderia sp.* S-2	"Isolation of Several Soil Bacteria Resistant to Cadmium and the Incorporation of Cadmium Ion into their Cells"	Hokkaido University, Graduate School of Environmental Earth Science Japan

É comum o isolamento por técnicas clássicas, de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*, em ambientes com histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo ou em sistemas em que se

utilizem hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia. Estudos os mais variados, detalhando, desde a metabolização de tais fontes de carbono por parte desses microrganismos até a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa*, têm sido produzidos desde a década de 1970. Um sem-número de revisões já foi publicado sobre a atuação destes microrganismos. Trabalhos mais recentes envolvendo identificação molecular, não só corroboram com estes estudos mais antigos, como também revelam gêneros microbianos vivendo em ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo nunca antes relatados até o advento da utilização de técnicas moleculares. Recentemente, Andreoni *et al*. (2004), identificaram alguns gêneros predominantes em solo contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) dentre os quais figuravam, além dos gênero *Pseudomonas* e *Burkholderia*, os gêneros: *Methylobacterium*, Alcaligenes, *Rhizobium*, *Aquamicrobium, Stenotrophomonas* e *Ralstonia*. Assim como também reportado por Díaz-Ramirez *et al*. (2007) que identificaram seqüência de 16SrDNA do gênero *Pseudomonas*, Pizzul *et al*. (2006) e Das & Mukherjee (2007) identificaram além do gênero *Pseudomonas*, o gênero *Bacillus*, em estudos de diversidade molecular microbiana em presença de hidrocarbonetos.

6.6 Avaliação Ecotoxicológica

Pelos mesmos critérios adotados na investigação do consumo de oxigênio por respirometria e na investigação da dinâmica da comunidade microbiana na batelada Sq_{02}, foi investigada também a efetividade do processo quanto à redução da ecotoxicidade do resíduo oleoso. Os ensaios de ecotoxicidade foram realizados com a fração hidrossolúvel de amostras provenientes do resíduo não tratado e do resíduo tratado ao final dos ciclos 2 e 4, bem como do solvente hexano utilizado na amostragem do resíduo no biorreator.

De um modo geral, os resultados dos ensaios de ecotoxicidade revelaram mudanças significativas nas características tóxicas do resíduo oleoso ao longo da batelada Sq_{02}. As reduções na ecotoxicidade observadas foram da ordem de 70% ao final do ciclo 2, chegando a níveis não detectáveis de toxicidade no ciclo 4 para os testes com *Echinometra lucunter* (redução de teoricamente 100%) e da ordem de 86,6% ao final do ciclo 4 para os testes com *Crassostrea rhizophorae.* Para os testes com *Pseudokirchneriella subcaptata*, já no ciclo 2, não se observaram níveis de toxicidade detectáveis (redução de, teoricamente 100%) (Figura 6.29).

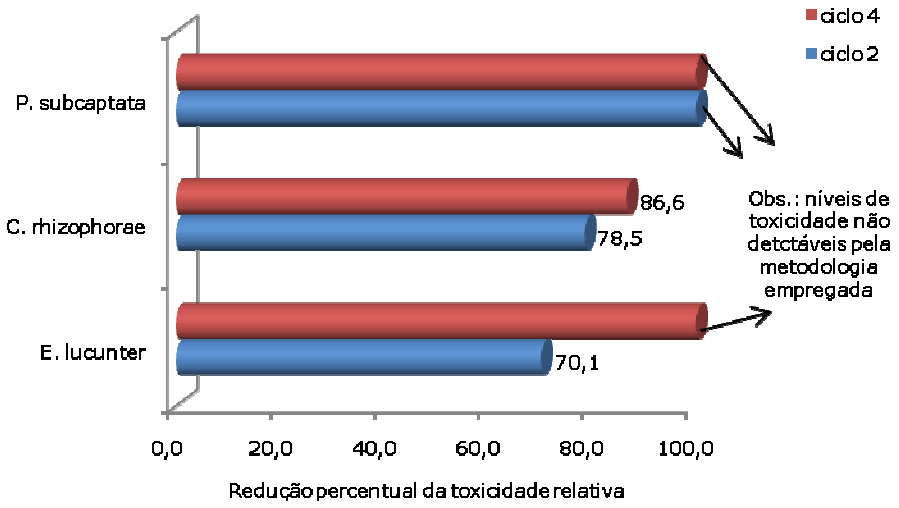


Figura 6.29: Comparação entre as reduções percentuais da toxicidade relativa com os três organismos-teste

Com base no percentual de anormalidade para 50% da população testada (CE_{50}) nos testes com estágios embriolarvais de *C. rhizophorae* e *E. lucunter* e de inibição de crescimento de 50% da população testada (CI_{50}) para os ensaios com algas *P. subcaptata* (Woelke, 1972; Araújo & Nascimento, 1999), os valores de CE_{50} e CI_{50} foram determinados pelo método de correlação *Trimmed Spearman Karber* (Hamilton *et al.*, 1977). Para reportar os valores em termos de toxicidade relativa, utilizou-se o artifício da transformação dos valores em unidades tóxicas (UT), calculada segundo a Equação 6.1:

$$UT = 100 / CE_{50} \qquad \text{Equação 6.1}$$

Onde, CE_{50} corresponde à concentração efetiva que causa anormalidades em 50% dos embriões de *E. lucunter* e larvas de *C. rhizophorae* testados. Para os resultados obtidos nos testes com algas *P. subcaptata*, substitui-se CE_{50} por CI_{50} na expressão.

Para os testes com *E. lucunter* a resposta de toxicidade em termos de CE_{50} e UT, apresentada para substância padrão dodecil sulfato de sódio (DSS),mostrou-se semelhante às respostas esperadas para este organismo-teste, conforme verificado por Paixão *et al*., 2007. A fração solúvel em água (FSA) do resíduo não-tratado apresentou maior nível de toxicidade quando comparada à FSA do solvente hexano. A inclusão do hexano no teste (conforme exposto no capítulo anterior) é justificada pela necessidade de investigação da influência de tal solvente nas respostas dos testes de ecotoxicidade.

Tabela 6.20: Valores de CE_{50} e UT nos testes com larvas de *E. lucunter*

AGENTE ESTRESSOR	*CE_{50}*	*U.T.*
Dodecil sulfato de sódio	3,5 ppm	28,6
Resíduo não tratado (%v/v)	14,8	6,7
Hexano (%v/v)	53,5	1,8
Ciclo 2 (%v/v)	49,4	2,0
Ciclo 4 (%v/v)	n.d.*	n.d.*

*não detectado pelo método estatístico

Como mostrado na tabela 6.20 acima, os valores de toxicidade relativa, expressos em UT, indicam que a fração solúvel em água (FSA) do solvente hexano parece não se caracterizar como um interferente na resposta de toxicidade dos tratamentos. O valor em UT para a FSA do hexano e a FSA do resíduo tratado no ciclo 2, expressam reduzida toxicidade quando comparados ao valor para a FSA do resíduo não tratado. A CE_{50} para a fração solúvel em água do resíduo tratado no ciclo 4 não pôde ser determinada pelo método *Trimmed Spearman Karber*, indicando valores de CE_{50} muito altos, e conseqüentemente, valores de UT muito baixos, tendendo a zero.

Estabelecendo uma relação entre os valores de toxicidade relativa para estágios embriolarvais de *E. lucunter* e os valores de eficiência de biodegradação (E_B) nos ciclos 3 e 4, verificamos que, muito embora tais valores de E_B tenham sido menores nestes ciclos do que no ciclo 2, observa-se uma diminuição significativa da ecotoxicidade a partir do ciclo 2, no qual os valores de toxicidade relativa decrescem de 6,7 UT no resíduo não tratado, para 2,0 UT, no resíduo tratado do ciclo 2 e, posteriormente, decrescem a níveis não detectáveis para o resíduo tratado do ciclo 4.

A diminuição na E_B pode indicar indiretamente um acúmulo na concentração do resíduo, o que poderia levar a um aumento da toxicidade. No entanto, como observado por alguns autores, compostos orgânicos polares, intermediários do processo de biodegradação, são reconhecidamente capazes de diminuir a biodisponibidade da fração inalterada do resíduo para alguns organismos, como os ouriços-do-mar (SACO-ÁLVAREZ *et al*., 2008). Além disso, uma série de eventos citados por Bearden *et al.* (1998) pode levar à diminuição do efeito dos poluentes: adaptação genética, resultando em uma população resistente; a seqüestração de alguns hidrocarbonetos na acumulação de lipídeos durante o crescimento celular, a existência de sistemas químicos endógenos de adaptação que podem causar rápidas mudanças celulares.

Desta forma, é possível que fenômenos relacionados à natureza química dos produtos formados na biodegradação do resíduo neste estágio tenham tornado tanto a fração solúvel em água do hexano quanto os compostos originais presentes no resíduo, menos disponíveis para o organismo testado (*E. lucunter*). Estes resultados, do ponto de vista da qualidade final do efluente gerado pelo processo, são desejados em termos de confirmação da efetividade do processo, uma vez que reduzem a toxicidade no seu decurso.

Um artifício utilizado para calcular o risco estimado do agente estressor ao organismo-teste é o risco líquido percentual. Este índice mostra o risco inerente ao agente estressor e é representado pela relação entre a variação nos níveis de normalidade dos embriões na população não submetida ao agente estressor e a variação após adição do agente estressor, conforme definido por Nascimento *et al*. (2000).

A tabela 6.21 mostra os valores percentuais de risco líquido, que descrevem o risco potencial relativo de cada tratamento testado com *E. lucunter* em função do controle (branco).

A fração solúvel em água do resíduo tratado do ciclo 2 bem como a fração solúvel em água do hexano apresentaram valores de risco líquido percentual muito baixos e próximos entre si, indicando que o efeito da fração solúvel em água do hexano pode ser negligenciado, e conseqüentemente, sua utilização como solvente para extrair o resíduo não interfere qualitativamente no resultado final (estes resultados corroboram com os anteriores). Para o resíduo tratado no ciclo 4, observa-se que o risco líquido diminui sobremaneira, inclusive chegando a valores menores que os obtidos para a fração solúvel em água do hexano. Mais uma vez, sugere-se a perda de biodisponibilidade do hexano, agora quando misturado a compostos presentes no material proveniente do ciclo quatro.

A importância e o significado da utilização de estágios embriolarvais de *E. lucunter* como indicadores de toxicidade, segundo Araújo & Prósperi, (2002), reside no fato de que este estágio é mais sensível à ação de poluentes tóxicos e de que os aspectos fisiológicos deste organismo já são bastante conhecidos. Além disso, é abundante, de fácil coleta, manuseio e obtenção dos gametas. A maior vantagem discutida por diversos autores, entretanto, é a ampla distribuição destes organismos, desde a Flórida (EUA) até o sul do Brasil (BEIRAS *et al*., 2001; KOBAYASHI, 1980).

Por outro lado, quando comparado a outras espécies utilizadas em testes de ecotoxicidade, a espécie *E. lucunter* parece ser consideravelmente menos sensível. Observa-se nas Tabelas 6.22 e 6.23, os resultados obtidos com *C. rhizophorae* e nota-se a diferença entre estes resultados e aqueles obtidos com *E. lucunter*, quer seja na comparação direta entre valores de CE_{50} quer seja na comparação entre valores percentuais de risco líquido.

Tabela 6.21: Percentuais de risco líquido nos testes com *E. lucunter*

Agente Estressor	Concentração	% Risco líquido
	ppm	
	0,56	28,40
Dodecil sulfato de sódio	1,00	28,40
	1,80	28,40
	3,20	34,18
	5,60	100,00
	% $v.v^{-1}$	
	2,20	0,00
	4,60	0,00
Resíduo não tratado	10,00	0,00
	22,00	100,00
	46,00	100,00
	100,00	100,00
	% $v.v^{-1}$	
	2,20	0,00
	4,60	0,00
Hexano	10,00	0,00
	22,00	0,00
	46,00	31,22
	100,00	100,00
	% $v.v^{-1}$	
	2,20	0,00
	4,60	0,00
Ciclo 2	10,00	0,00
	22,00	12,17
	46,00	29,52
	100,00	100,00
	% $v.v^{-1}$	
	2,20	0,00
	4,60	0,00
Ciclo 4	10,00	0,00
	22,00	0,00
	46,00	0,00
	100,00	0,53

Nascimento *et al*. (2000), em um estudo integrativo entre diferentes testes de ecotoxicidade, obtiveram valores médios de risco líquido 10 a 70 por cento mais baixos nos testes com a espécie *E. lucunter*

em relação àqueles obtidos nos testes com a espécie *C. rhizophorae*. Serrazanetti *et al*. (1995), estudando a presença de hidrocarbonetos, esteróis e outros compostos como o esqualeno, na espécie de ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*, sugeriram que a presença desses compostos associada a essa espécie é influenciada pelos parâmetros: composição da dieta com conseqüente acumulação de compostos lipossolúveis; necessidades fisiológicas que levam à rápida biossíntese de esqualeno e mevalonato (como observado em outros Equinodermata) e; contaminação antropogênica.

Tabela 6.22: Valores de CE_{50} e UT nos testes com embriões de *C. rhizophorae*

Agente Estressor	CE_{50}	U.T.
Dodecil sulfato de sódio	1,01ppm	99,00
Resíduo não tratado	2,74 %	36,49
Hexano	23,92%	4,18
Ciclo 2	12,80%	7,85
Ciclo 4	20,44%	4,89

É evidenciada a tolerância desses Equinodermatas a concentrações relativamente altas de compostos xenobióticos, sobretudo de hidrocarbonetos de petróleo. Araújo & Nascimento (1999), investigando a sensibilidade de testes ecotoxicológicos, reafirmam a diferença de sensibilidade das espécies *E. lucunter* e *C. rhizophorae* mediante a utilização da substância de referência dodecil sulfato de sódio. Analisando testes de sensibilidade os autores atestaram que o teste com embriões de *C. rhizophorae* é, pelo menos, duas vezes mais sensível que o teste com *E. Lucunter*. No presente trabalho, observamos valores de UT 3,5 vezes maiores para o dodecil sulfato de sódio 5,4 vezes para o resíduo oleoso; e 15 vezes para o hexano, nos testes com *C. rhizophorae*. Observamos, mais uma vez, o hexano como potencialmente assimilável pela espécie *E. lucunter*.

Na Tabela 6.24, veremos os valores de CI_{50} e UT para os testes conduzidos com a espécie de microalga *Pseudokirchneriella subcaptata*.

Tabela 6.23: Percentuais de risco líquido nos testes com *C. rhizophorae*

Agente Estressor	Concentração	% Risco líquido
DSS	**ppm**	
	0,56	2,94
	1,00	20,59
	1,80	33,19
	3,20	94,33
	5,60	100,00
Resíduo não tratado	**%v.v^{-1}**	
	2,2	23,11
	4,6	36,55
	10,0	72,27
	22,0	100,00
	46,0	100,00
	100,0	100,00
Hexano	**%v.v-^{1}**	
	2,2	3,78
	4,6	6,51
	10,0	6,51
	22,0	42,86
	46,0	86,13
	100,0	96,64
Ciclo 2	**%v.v^{-1}**	
	2,2	8,19
	4,6	13,24
	10,0	37,18
	22,0	71,01
	46,0	100,0
	100,0	100,0
Ciclo 4	**%v.v^{-1}**	
	2,2	10,5
	4,6	17,02
	10,0	23,53
	22,0	35,5
	46,0	93,7
	100,0	100,0

Segundo mostrado na tabela 6.24, a partir do ciclo 2, não são observados efeitos tóxicos mensuráveis para a população testada de *P. subcapitata,* de acordo com a metodologia adotada. Estes resultados mostraram-se aparentemente atípicos, quando levamos em conta que estes organismos têm apresentado maior sensibilidade quando comparados aos outros dois organismos-teste supracitados.

Tabela 6.24: CI_{50} e UT nos testes com *Pseudokirchneriella subcaptata*

Tratamento	CI_{50}	U.T.
DSS	40,19ppm	2,48
Resíduo *in natura*	20,06%	4,98
Hexano	n.d.*	n.d.*
Ciclo 2	n.d.*	n.d.*
Ciclo 4	n.d.*	n.d.*

Entretanto, podemos vislumbrar aqui a ocorrência do fenômeno de hormesis. Segundo Calabrese & Baldwin (2002), hormesis é uma resposta adaptativa compensatória bifásica, em que ambas as fases possuem faixas de amplitudes quantitativas muitas vezes similares, resultantes da compensação de distúrbios do equilíbrio homeostásico. Esta resposta é estimulatória a baixas concentrações da substância ou substâncias em questão e inibitória a altas concentrações. O "benefício" ou "malefício" da resposta compensatória dependerá do contexto biológico ou ecológico em que a mesma esteja inserida. Assim, no caso em estudo, essa resposta pode subestimar os valores de ecotoxicidade, fornecendo valores que podem estar a refletir tão somente uma resposta adaptativa da espécie *P. subcaptata* aos agentes estressores, e não a toxicidade.

Sobretudo por não se tratar de uma cultura axênica, esse fenômeno torna-se mais propenso a ocorrer, devido à possível atuação concomitante de outros microrganismos. Mas devemos ressaltar que de acordo com Chapman *et al*. (2002), as respostas adaptativas características do fenômeno da hormesis, para serem efetivamente aceitas, devem estar respaldadas em ferramentas estatísticas que possam assegurar correlações válidas, necessitando-se análises ulteriores que venham a corroborar com essas hipóteses.

6.7 Considerações Gerais

Os experimentos em frascos agitados refletem tão-somente as condições testadas, e, algumas respostas obtidas, embora significativas, têm efeitos mais qualitativos que quantitativos. Tais efeitos são devidos,

sobretudo, às dificuldades encontradas na transposição dos experimentos de frascos para biorreator.

Os resultados dos ensaios em biorreator suscitaram novas discussões a respeito do papel da biomassa total na biodegradação efetiva dos hidrocarbonetos presentes no resíduo oleoso. Ficou indicado que as modificações ocorridas na biomassa parecem não ter interferido proporcionalmente na redução dos compostos do resíduo. A impactação do biorreator com altas concentrações de biomassa parece não estar, até certo limite, atrelada às taxas de degradação. Estabelecendo-se paralelos entre: a eficiência de biodegradação (E_B); a ecotoxicidade; a eficiência específica de biodegradação (E_{EB}); as taxas de biodegradação; os perfis de consumo de oxigênio; a tensão superficial e as mudanças na comunidade microbiana mista durante os ciclos da batelada seqüencial Sq_{02}, observamos que, em linhas gerais, a partir do segundo ciclo mudanças significativas na comunidade microbiana parecem ser responsáveis por alterações na composição e estrutura do meio reacional.

A avaliação da ecotoxicidade dos hidrocarbonetos de petróleo constitui um desafio devido à natureza complexa dessas misturas. Aproximações analíticas tradicionais utilizadas na caracterização de contaminações por hidrocarbonetos, nas quais se quantificam, tanto os hidrocarbonetos totais, como classes de compostos selecionados, são geralmente pobres na predição da ecotoxicidade, porque estes métodos falham na distinção entre a toxicidade relativa de hidrocarbonetos individuais e a toxicidade de todo o complexo. Estes dados fomentam as bases de uma avaliação conservativa que ora, superestima, ora subestima os riscos ecológicos.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Face às avaliações feitas a partir dos resultados descritos anteriormente, e face às ponderações acerca das interconexões, dos desenvolvimentos e dos possíveis desdobramentos destes resultados, listamos a seguir, as conclusões proeminentes a que chegamos com a consolidação desta Tese.

- O resíduo oleoso do terminal portuário de SUAPE-PE, em estudo, é tratável, apresentando baixa recalcitrância, embora possua toxicidade elevada, compatível com a toxicidade do óleo Diesel original;

- A concentração inicial de resíduo (ou carga orgânica inicial) mostrou-se como o parâmetro mais importante, influenciando de forma negativa na biodegradação;
- A aeração influencia positivamente na biodegradação do resíduo até certos limites, podendo a partir destes limites passar a ter influência negativa e aumentar as perdas abióticas por volatilização;
- A efetividade do processo, no que concerne às taxas de biodegradação do resíduo original, não tem relação constante com as taxas de crescimento microbiano. O valor máximo de taxa de biodegradação atingido com a condução do processo na batelada seqüencial de 4 ciclos de 72 horas foi de 1,33%.h^{-1} no ciclo 2, onde a taxa de crescimento microbiano foi de 0,36.h^{-1}. Nesta mesma batelada, a taxa de biodegradação decresceu para 1,06%.h^{-1} e 1,04%.h^{-1} nos ciclos 3 e 4, respectivamente. Porém, as taxas de crescimento microbiano mantiveram-se em ascensão de 0,54.h^{-1} para 0,81.h^{-1}. O que leva-nos a inferir que o meio reacional complexo nesta etapa pode apresentar uma série de compostos intermediários que, em princípio, fomentam o crescimento microbiano da comunidade mista, ou de grupos microbianos específicos presentes nela;
- O fenômeno da biodegradação de compostos hidrocarbônicos envolve uma série de transformações subjacentes à natureza química dos compostos originais presentes no resíduo, e que podem alterar (inclusive diminuindo) as taxas de biodegradação dos hidrocarbonetos originais;
- Partindo-se da perspectiva da efetividade quanto à qualidade ambiental do resíduo tratado, o processo mostrou-se, *a priori*, eficiente na redução da ecotoxicidade do resíduo, reduzindo de 70 a 78% da toxicidade original já no ciclo 2;

- A produção microbiana de tensoativos pode afetar as taxas de biodegradação. Contudo, é também observável a redução da tensão superficial sem a pronta relação proporcional de aumento da taxa de biodegradação de hidrocarbonetos, fato este que dependerá de fatores intrínsecos relacionados à natureza das substâncias e aos microrganismos componentes da comunidade mista. Foram observados ao final da batelada de três ciclos de 110 horas, valores de tensão superficial de 35,2mN.m^{-1} onde a taxa de crescimento microbiano foi de 0,97.h^{-1} e a taxa de biodegradação foi de 0,90%.h^{-1} e ao final da batelada de quatro ciclos de 72 horas, valores de tensão superficial de 47,5mN.m^{-1} onde a taxa de crescimento microbiano foi de 0,81.h^{-1} e a taxa de biodegradação foi de 1,04%.h^{-1};
- Estudos de diversidade molecular microbiana, quando aplicados aos processos de biotratamento de resíduos por batelada seqüencial, mostram-se bastante eficientes e práticos, quando se objetiva entender as mudanças na comunidade e suas possíveis associações com mudanças nas taxas de biodegradação. As mudanças na comunidade mista no final do ciclo 1 e início do ciclo 2 da batelada de ciclos de quatro 72 horas parecem estar associadas às variações nas taxas de biodegradação (de 1,33%.h^{-1}, para 1,06 e 1,04%.h^{-1}) e à diminuição na tensão superficial;
- Testes de ecotoxicidade com organismos próprios da biota local são uma alternativa aos testes padronizados com organismos alóctones, conferindo um caráter realístico à avaliação da efetividade dos tratamentos, sendo necessário avaliar critérios como sensibilidade, ampla distribuição dos organismos, fácil cultivo e representatividade nos quatro níveis tróficos.
- A avaliação da ecotoxicidade com os estágios embriolarvais de *C. rhizophorae* revelou menor tolerância deste organismo ao resíduo em estudo, sendo recomendada a sua utilização, uma vez que trata-se de moluscos bivalves filtradores e bastantes representativos de

ambientes estuarinos, semelhantes às áreas contíguas ao terminal de SUAPE-PE;

- A condução do processo por batelada seqüencial mostrou alta eficiência na redução dos hidrocarbonetos presentes, bem como na redução da ecotoxicidade, sendo recomendados estudos em escala piloto.

RECOMENDAÇÕES

Mediante a discussão dos resultados e após a culminância das conclusões, enumeramos algumas sugestões e recomendações para trabalhos futuros que possam complementar os estudos aqui apresentados e explorar aspectos importantes suscitados no decurso desta Tese.

1. Realização de bateladas seqüenciais com números maiores de ciclos variando-se a duração dos ciclos, a fim de verificar as tendências de cometabolismo perfiladas pelos resultados obtidos com os ensaios respirométricos;

2. Exploração dos fenômenos relacionados a perdas abióticas e à transferência de oxigênio;

3. Proposições de experimentos em escala piloto agregados aos intervalos de tempo ou periodicidade de descarte de resíduos do terminal de SUAPE-PE;

4. Realização de ensaios de ecotoxicidade com organismos-teste representativos da biota local pertencentes a níveis tróficos diferentes. Realização de testes de citotoxicidade;

5. Verificação de uma suplementação mínima de sais para obtenção de boas taxas de biodegradação;

6. Condução por processo contínuo.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, P. D. (1991): Approaches to measuring the toxicity of pollutants to marine organisms. In: Ecotoxicology and Marine Environment. New York. Ellis Horwood Limited.

ABNT, (1984): Classificação doa Resíduos sólidos. NBR 1004: revisada 2004.

AIDAR, E.; PEREIRA, S. A.; SOUSA, E.C.P.M.; BRASIL-LIMA, G.M.S. (2002): "Testes de Ecotoxicidade com Microalgas" *in* Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. Editores: Iracema Andrade Nascimento, Eudinetty Ceci Pereira Moreira de Sousa, Marion Nipper. Editora Artes Gráficas. 1ed. 262p. São Paulo.

ALEXANDER, M. (1994): Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, 2ed.

AMELLAL, N.; PORTAL, J., M.; BERTHELIN, J.(2001): Effect of Soil Structure on the Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons within Aggregates of a Contaminated Soil". Applied Geochemistry. v. 16, p. 1611-1619.

ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO M.A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL_AMICO E.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. (2004): Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. Chemosphere. V.57 p.401-412.

ANP (2000): Agência Nacional do Petróleo - Portaria Nº 137, de 1º de Agosto de 2000.

ANP. (2005): Site acessado em junho de 2005 http://www.anp.gov.br/petro/importacao_dados.asp.

API, (1997): "Environmental Guidance Document: Waste Management in Exploration and Production Operations", Publication No. E5 API 2nd Edition, Exploration and Production Department, American Petroleum Institute, Washington, D.C., February.

API, (2000a): "Non-Aqueous Phase Liquid (NAPL) Mobility Limits in Soil," G. E. DeVaull and E. J. Brost, *Soil and Groundwater Research Bulletin No. 9*, American Petroleum Institute, Washington,DC, April.API, 1997;

API, (2000b): "Simulation of Transport of Methyl Tert-Butyl Ether (MTBE) to Groundwater from Small Volume Releases of Gasoline in the Vadose Zone, *Soil and Groundwater Research Bulletin No. 10*, American Petroleum Institute, Washington, DC.

API (2001): "Risk-Based Methodologies for Evaluating Petroleum Hydrocarbon Impacts at Oil and Natural Gas E&P Sites". API Publication Number 4709. American Petroleum Institute, Washington,DC, April.API,

ARAÚJO, M.M. & NASCIMENTO, I.A. (1999): Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de sensibilidade. Ecotoxicology and Environmental restoration. V. 2, p.41-47.

ARAÚJO, M.M.S & PRÓSPERI, V.A.(2002): Testes de Toxicidade Crônica com *Lytechynus variegatus in*: Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil. I.A. Nascimento, E.C.P.M. Sousa, M. Nipper editores. São Paulo.

ARAÚJO, M.M.S.; & NASCIMENTO, I.A. (1999): Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. Ecotoxicological and Environmental Restoration. Coimbra-Portugal Instituto Ambiente e Vida. 2 (1) 41-47.

ASTM D 1500 - 07 "Standard Test Method for ASTM Color of Petroleum Products (ASTM Color Scale)".

ASTM D – 93 (1999) - Petroleum products: Determination of the flash-point by Pensky-Martens closed cup. 1999

ASTM D – 971 (1999) - 99th, Standard tests Method for Interfacial Tension of Oil against Water by the Ring *in*: Method – America Society for Testing and Materials, 1999.

ASTM D1298 (1985). "Standard practice for density, relative density (specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method", 1-5.

ASTM D 445 (1994): Petroleum products - Transparent and opaque liquids-Determination of kinematic viscosity and calculation of dynamic viscosity.

ASTM D 93 Standard Test Method for Flash Point by Pensky-Martens Closed Cup Tester. 1998.

ASTM D 445 Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids and Calculation of Dynamic Viscosity. 1995.

ATLAS, R.M. & BARTHA, R. (1970): Abundance, distribution and oil biodegradation potential of micro-organisms in Raritan Bay. Environmental Pollution v.4, Issue 4, pp. 291-300.

ATLAS, R. M. & BARTHA, R.(1972): Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Menlo Park, California. Benjamin/Cumins Publishing Company.

ATLAS, R. M. (1981a): Microbial degradation of Petroleum Hydrocarbons.: An environmental Perspective. Microbial Reviews. v. 45, n. 1, p. 180-209.

ATLAS, R. M. (1981b): Fate of Oil from Two Major Oil Spills: Role of microbial Degradation in Removing Oil from The AMOCO Cadiz and IXTOC I Spills. Environmental International. v. 5, p. 33-38.

ATLAS, R. M. (1984): Petroleum Microbiology. New York. Macmillan Publishing Company.

ATLAS, R.M.(1990): Microbial upgrading of Stuart shale oil: removal of heterocyclic nitrogen compounds. Jacqueline AISLABIE and Fuel. 5th Australian Workshop on Oil Shale Volume 69, Issue 9, September 1990, Pages 1155-1157

ATLAS, R. M. (1995a): Bioremediation of Petroleum Pollutants. International Biodeterioration & Biodegradation. p. 317- 327.

ATLAS, R. M. (1995b): Handbook of Media for Environmental Microbiology. London. CRC Press.

ATLAS, R. M.(1995c): Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. Marine Pollution Bulletin. p.178 - 182.

ATLAS, R. M.(1998): Microbial Hydrocarbon Degradation – Bioremediation of Spill. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. v. 52, p. 149-156.

BAIRD, D. J.; MALTBY, L.; GREIG-SMITH, P. W.; DOUBEN, P. E. T. (Editors). (1996): ECOtoxicology: Ecological Dimensions. Chapman Hall, London.

BAKER, K. H.; HERSON, S. (1994): Bioremediation. New York. McGraw-Hill, inc. 375p.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. (2000): Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol., 53: 495-508.

BARTHA, R. & ATLAS, R.M. (1977): The Microbiology of Aquatic Oil Spills Advances in Applied Microbiology. Volume 22, 1977, Pages 225-266.

BEARDEN, A.P.; SINKS, G.D.; VAES, W.H.J.; URRESTARAZU RAMOS, E.; HERMENS, J.L.M.; Schultz, T.W.(1998): Bioavailability, Biodegradation, and Acclimation of Tetrahymenapyriformisto1-Octanol. Ecotoxicology and Environmental Safety 44, 86-91 Environmental Research, Section B.

BEIRAS, R.; VÁSQUEZ, E.; BELLAS, J.; LORENZO, J.I.; FERNANDEZ, N.; MACHO, G.; MARIÑO, G.; CASA L. (2001): Sea-Urchin Emryo Bioassay for *in situ* Evaluations of the Quality of Coastal Sea Water. Estuarine, Coastal and Shelf Science. V. 52, pp. 29-32.

BILLET, S.; ABBAS, I.; Le Goff, J.; VERDIN, A.; ANDRE, V.; LAFARGUE, P.; HACHIMI, A.; FRANÇOIS, CAZIER, F.; SICHEL, F.; SHIRALI, P.; GARÇON, G. (2008): Genotoxic potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM2.5) in human lung epithelial A549 cells. Cancer Lett. (2008) doi:10.1016/j.canlet.2008.04.044.

BONNAMY, S.; OBERLIN, A.; BEHAR, F. (1987): Geochemical study of a series of biodegraded oils: Microtexture and structure of their coked asphaltenes. Organic Geochemistry. Vol. 11, Issue 1, pp. 1-13.

BOGNOLO, G.(1999): Biosurfactant as Emulsifying Agets for Hydrocarbons. Colloid and surfaces . A: Physicochemical ad Engineering Aspects. n. 152, p. 41-52.

BRADDOCK, J.F.; CATTERALL, P.H.(1999): A simple method for enumerating gasoline and Diesel-degrading microorganisms. Bioremediation Journal. v. 3, p. 81-84.

BRITTON, L. N.(1984): Microbial Degradation of Aliphatic Hydrocarbons *in*: Microbial degradation of Organic Compounds" New York. D. T. Gibson ed. Marcel Dekker, Inc. p. 89-129.

BROWN, J. E.; BRADDOCK, J.F (1990): Sheen Screen, a Miniaturized Most-Probable-Number Method for Enumeration of Oil-Degrading Microorganisms. Applied and Environmental Microbiology. v. 56. n.12. p. 3895-3896.

CALABRESE, E.J. & BALDWIN, L.A. (2002): Defining Hormesis. BELLE – Biological Effects of Low Level Exposures - News Letter. V. 10, nº1. P. 25-43.

CALOW, P. Ecology (1996) *in* ecotoxicology: some possible 'rules of thumb'. In: Ecotoxicology: ecological Dimensions. London. Baird, D. J., Maltby, L., Greig-Smith, P. W., Douben, P.E.T. eds. p. 5-12.

CAPPUCCINO, G. J.; SHERMAN, N.(1996): Microbiology: A Laboratory Manual. California. Publishing Company, 4 ed. Benjamin/Cummings. Inc. 477.

CASSIDY, D., EFENDIEV, S.; WHITE, D.M. (2000): A comparison of CSTR and SBR Bioslurry Reactor Performance. Wat. Res. V. 34, p. 4333-4342.

CASSIDY D. P.; HUDAK, A.J. (2001).: Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor Jour. of Haz. Mat.

CELIS, E.; ELEFSINIOTIS P.; SINGHAL, N. (2008): Biodegradation of agricultural herbicides in sequencing batch reactors under aerobic or anaerobic conditions. Water research. V. 42, p.3218-3224.

CHAPMAN, P.M. (1995): Sediment Quality Assessment: Status and Outlook. Journal of Aquatic Ecosystem Health 4, 183–194.

CHAPMAN, P.M.; HO, T.K.; MUNNS Jr, W.R. SOLOMON, K.; WEINSTEIN, M.P. (2002): Issues in Sediment Toxicity and Ecological Risk Assessment. Marine Pollution Bulletin. V. 44, p.271-278.

CHO, B.H.; CHINO, H.; TSUJI, H.; KUNITO, T.;NAGAOKA, K.;OTSUKA, S.; UCHIDA, H.; MATSUMOTO, S.; OYAIZU, H. (1997b): analysis of oil components and hydrocarbons-utilizing microorganism during laboratory-scale bioremediation of Oil-Contaminated-Soil of Kwait. Chemosphere. V. 35. N. 7, pp. 1613-1621.

CHO, B.H.; CHINO, H.; TSUJI, H.; KUNITO, T.;NAGAOKA, K.;OTSUKA, S.; YAMASHITA, K.;MATSUMOTO, S.; OYAIZU, H. (1997b): Laboratory-scale Bioremediation of Oil-Contaminated-Soil of Kwait with Soil Amendments Material. Chemosphere. V. 35. N. 1, pp. 1599-1661.

CLAXTON, L. D.; HOUK, V. S.; HUGHEs, T. J. (1998): Genotoxicity of industrial wastes and effluents. Mutation Research 410.237–243.

COLLINA, E.; BESTETTI, G.; DI GENNARO, P.; FRANZETTI, A.; GUGLIERSI, F.; LASAGNI, M.; PITEA, D. (2005): Naphthalene biodegradation kinetics in an aerobic slurry-phase bioreactor Environment International v.31, pp.167– 171.

COOPER,D.G. & PADDOCK, D.A. (1984) Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. Appl. Environ. Microbiol. 47: 173-176.

CORSEUIL, H. X.; HUNT, R. S.; SANTOS, R. C. F. (1997): The Influence of the Gasoline Oxygenate Ethanol on Aerobic and Anaerobic BTEX Biodegradation. Water Research. v. 32. p. 2065 – 2072.

CUNDELL, A.M. & TRAXLER, M.W. (1973): Microbial degradation of petroleum at low temperature. Marine Pollution Bulletin V 4, Issue 8, PP.125-127.

CUNDELL, A..M. & YOUNG, R.R. (1975): Hindgut microflora from oil-polluted soft-shell clams. Marine Pollution Bulletin V. 6, Issue 9, pp. 134-136.

DAS, K. & MUKHERJEE, A.K. (2007): Crude petroleum-oil biodegradation eYciency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology. V. 98, pp.1339–1345.

DAVIES, J.S., WESTLAKE, D.W.S. (1979): Crude oil utilization by fungi. Canadian Journal of Microbiology 25, 146–156.

DAVIS, S.J. & GIBBS, C.F. (1975): The effect of weathering on a crude oil residue exposed at sea. Water Research v. 9, Issue 3, pp.275-285.

DAVIS' J.; GIBBS, C.F.; PUGH, K.B. (1970): Quantitative studies on marine biodegradation of oil, III. Comparison of different crude oil residues and effects of sea water source Environmental Pollution. V. 13, pp. 203-215.

DE JONGE, H.; FREIJER, J.I.; VERSTRATEN, J.M.; WESTERVELD,J.; VANDER, J.; WIELEN, F.W.M. (1997): Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. Environmental Science and Technology. V.31, pp.771-775.

DEL'ARCO, J. P.; FRANÇA, F. P.(1999): Biodegradation of Crude Oil in Sandy Sediment. International Biodeterioration & Biodegradation . v. 44. p. 87-92.

DÍAZ-RAMIREZ, I.J.; ESCALANTE-ESPINOSA, E.; FAVELA-TORRES, E.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; RAMÍREZ-SAAD, H. (2007): Design of Bacterial Defined Mixed Cultures for Biodegradation of Specific Oil Frctions, Using Population Dynamics Analysis by DGGE. Int. Biodt. And Biodeg. (2007) doi:10.1016/j.ibiod.2007.11.001.

DIBBLE, J. T.; BARTHA, R.(1976): Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. Applied and Environmental Microbiology. v.37, p. 729-739.

DORDICK,J.S.,KHMELNITSKI,Y.L.,SERGEEVA,M.V. (1998): The Evolution Of Biotransformation Technologies.Curr.Opin.Microbiol. v.1, pp.311-318.

DUARTE, C. M. (2000): Marine Biodiversity and Ecosystem Services: An Elusive link. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. V. 250, pp. 117-131.

EICHNER, C. A.; ERB, R. W.; TIMMIS, K. N. (1999): Thermal Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Bioprotection from Pollutants Shocks in the Activated Sludge Microbial Community. Applied Environmental Microbiology, v. 65, pp. 102-109.

ENGLERT, C. J. & KENZIE, E. J. (1993). "Bioremediation of petroleum products in soil" *in* "Princ. Prac. Pet. Contam. Soils". *API,* 40 (82917-79059h), 111-129.

ENVIRONMENT AGENCY – EA (2007): "How to Find Out if Waste Oil and Wastes that Contain Oil are Hazardous" Reference number HWR08, Version 3.1 – June 2007. Rio House Waterside Drive, Aztec West Almondsbury, Bristol BS32 4 UD.

EPA (1997): Health Effects Assessment Summary Tables (HEAST): Annual Update, U.S. Environmental Protection Agency,National Center for Environmental Assessment, Cincinnati, OH.

ERIKSSON, M., SWARTLING, A., DALHAMMAR, G., 1998. Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solid phase microextraction and GC–MS. Applied Microbiology Biotechnology 50, 129–134.

EVANS, F. F.; ROSADO, A. S.; SEBASTÁN, G. V.; CASELLA, R.; MACHADO, L.O.A.; HOLMSTRÖM, C.; KJELLEBERG, S.; VAN ELSAS, J.D.; SELDIN, L. (2004): Impact of Oil Contamination and Biostimulation on the Diversity of Indigenous Bacterial Communities in Microcosms. FEMS Microb. Ecol. V. 49 p.295-305.

FARHADIAN, M.; DUCHEZ, D.; VACHELARD, C.; LARROCHE, C. (2008): Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors - A review. WAT ER RE S E ARCH. V. 42, p. 1325 – 1341.

FARINAZLEEN, M.G., RAJA NOOR, Z.A., ABU, B.S., MAHIRAN, B. (2004): Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation 54, 61–67.

FEDORAK PM, Semple KM, WESTLAKE DWS. (1984)Oil degrading capabilities of yeasts and fungi isolated from coastal marine environments. Canadian Journal of Microbiology. V. 30, PP.565-71.

FERNANDES, M. (1994): Efeito da 9, 10 – Fenatrenoquinona na Fotodegradação do Petróleo. Dissertação de mestrado – Instituto de Química UFRJ.

FLOODGATE, G.D.; GIBBS, C.F.; PUGH, K.B. (1971): The biodegradation of oil. Marine Pollution Bulletin v.2, Issue 9, p.143.

FLOODGATE, G. D. (1984): The Fate of Petroleum in Marine Ecosystem *in*: Petroleum Microbiology. New York. Macmillan publishing company.

FRANKENBERGER Jr., W.T. (1992): The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. *In:* Hydrocarbon contaminated soils and groundwater Boca Raton. E.J. Calabrese and P.T. Kostecki eds. p. 237-293.

GARY, A.; GUÉNETE, C.C.; OWENS, E.H.; PRINCE, R.C.; LEE, K. (2003): In-situ Treatment of Oiled Sediment Shorelines. Spill Science Technology Bulletin. V.2, no2, pp.237-244.

GASCA, J.; ORTIZ, E.; CASTILLO, H.; JAIMES, J.L.; U. GONZ!ALEZ, U. (2004):The impact of liquefied petroleum gas usage on air quality in Mexico City. Atmospheric Environment. V. 38, pp. 3517–3527.

GEERDINK, M.J., KLEIJNTJENS, R.H., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., LUYBEN,K.C.A.M. (1996). Microbial decontamination of polluted soil in aslurry process. Journal of Environmental Engineering. V.11, p.975-982.

GIANFREDA, L., RAO, M. (2004): Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. Enzyme and Microbial Technology 35, 339–354.

GIBBS, C.F. (1976): A continuously recording polarographic respirometer and its use in oil biodegradation studies. Water Research. v.10, Issue 5, pp.443-451.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H.(1995): Microbial Biotechnology - Fundamentals of Applied Microbiology. New York. W. H. Freeman and Company Editors.

GRAY, M.R., BANERJEE, D.K., DUDAS, M.J., PICKARD, M.A., 2000. Protocols to enhance biodegradation of hydrocarbon contaminants in soil. Bioremediation Journal 4, 249–257.

GUPTA, R. S.; FONDEKAR, M. S.; SHAILAJA, M.; SAKANARAYNAN, S. (1996): Maersk Navigator Oil Spill in the Great Channel (Andaman Sea) in January 1993 and its environmental Impacts. Spill Science and Technology. Bulletin v.2/3 p. 113-119.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THRUSTON, R.V. (1977): Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environm. Sci. Technol., v.11, n.7, p. 714-719. Correction: v.12, n.4, p.417, 1978.

HANSON, K. G.; DESAI, D.; DESAI, A. J. (1993): A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. Biotechnology Techniques, v 7, n. 10. p. 745-748.

HAWTHORNE, S. B. & MILLER, D. J. 1998. "Hydrocarbon Characterization of Gas Condensates and Impacted Soils," Proceedings of the International Petroleum Environmental Conference, Albuquerque, NM, October 20-23.

HARMSEN, J. (1991). Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated sites. *In*: On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment. HINCHEE, R.E., OLFENBUTTEL, R.F. (Editors.). Butterworth-Heinemann, London.

HEAD, I.M. (1998): Bioremediation: towards a credible technology. Microbiology 144, 599–608. Juhasz, A.L., Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. International Biodeterioration & Biodegradation 45, 57–88.

HEJAZI, R.F. (2002). Oily Sludge Degradation Study Under Arid Conditions Using a Combination of Landfarm and Bioreactor Technologies. PhD thesis, Faculty of Engineering and Applied Science, Memorial University of Newfoundland, St John's, Canada.

IJAH, U. J. J. (1998): Studies on Capabilities of Bacterial and yeast Isolates from Tropical Soil in degrading Crude Oil. Waste Management. (18), 293-299.

IJAH, U. J. J.; ANTAI, S. P. (2003): "Removal of Nigerian light Crude Oil in Soil Over a 12-month Period". International Biodeterioration and Biodegradation. v. 51, 93-99.

INGERSOLL, E. P.; WILT, F. H. (1997): Matrix Metalloproteinase Inhibitors Disrupt Spicule Formation by Primary Mesenchyme Cells in the Sea Urchin Embryo. Developmental Biology 196, 95-106.

IRWIN, R. J., VANMOUWERICK; STEVENS, L.; SEESE, M. D.; BASHAM, W.(2001): Jet Fuel 'A' Entry" *In* Environmental Contaminants Encyclopedia. Colorado. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins.

IWAMOTO, T.; TANI, K.; NAKAMURA, K.; SUZUKI, Y.; KITAGAWA, M.; EGUCHI, M.; NASU, M. (2000): Monitoring Impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. FEMS Microbiol. Ecol. 32, 129-141.

KANIKKANNAN, N.; LOCKE, B. R.; SINGH, M. (2004): Effect of Jet Fuels on the skin morphology and irritation in hairless rats. Toxicology. v.175, p. 37-47.

KÄSTNER, M., BREUER-JAMMALI, M., MAHRO, B., 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Applied Microbiology Biotechnology 41, 267–273.

KECK, J.; SEMS, R.C.; COOVER, M.; PARK, K.; SYMONS, B. (1989): Evidence for cooxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil Water Research. v. 23, Issue 12, pp.1467-1476.

KHAN F.L I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. (2004): An Overview and Analysis of Site Remediation Technologies. Journal of Environmental Management. V. 71, p.95–122.

KOBAYASHI, N. (1980): Comparative Sensitivity of Various Developmental Stages of Sea Urchins to Some Chemicals. Mar. Biol. V. 58, pp. 163-171.

KOWALICK, W. W., JR. (1991): Removing Impediments to the use of Bioremediation and Other Innovative Technologies *in*: Environmental Biotechnology for waste Treatment. New York. G. S. Sayler, R. Fox, and J. W. Blackburns editors. Plenum Press, p. 53-60.

LANG, S. (2002): Biological Amphiphiles (Microbial Biosurfactants). Current Opinion in Colloid and Interface Science. v.7, p.12-20.

LAUNEN, L.A., PINTO, L.J., MOORE, M.M., 1999. Optimization of pirene oxidation by *Penicillium janthinellum* using response-surface methodology. Applied Microbiology Biotechnology 51, 510–515.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. (1990): Microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment. Microbiol. Ver. v.54, p. 305-315. 1990.

LEE, M.; KIM M. K.; MI-JUNG, K.; PARK B. D.; KIM M. H.; GOODFELLOW, M.; LEE, S. (2005): "Effect of the Synthesized Mycolic Acid on the Biodegradation of Diesel Oil by *Gordonia nitida* Strain LE31". Journal of Bioscience and Bioengineering Vol. 100, No. 4, 429–436.

LEVY, E. M.; EHRHARDT, M.; KOHNKE, D., SOBTCHENKO, E.; SUZUOKI, T.; TIRO, A.(1981): Global Oil Pollution: Results of MAPMOPP, the IGOSS pilot project on Marine Pollution (Petroleum) Monitoring. Paris France. Intergovernmental Oceanographic Comission, UNESCO.

LI, A.; YANGA, S.; Li, X.; GUB, J. (2008): Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates. Water Research. V. 42, p. 3552 – 3560.

LI HUI, ZHANG, Y.; KRAVCHENKO, I.; XU Hui; ZHANG, C. (2007): Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds A laboratory experiment. Journal of Environmental Sciences v.19, p.1003–1013.

MAACHI, R.; ABOUSSEOUD, M.; CHAABANE, T., (2001): Kinetics of biodegradation of petroleum by *Pseudomonas* sp. (crescimento x Biodegradação) Desalination 139 367.

MAKKAR, R.S. & CAMEOTRA, S.S. (1997): Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. Journal American Oil Chem. Society 74: 887-889.

MAIER, R. (1999): Environmental Microbiology. Academic Press, New York.

MARCHAL, R., PENET, S., SOLANO-SERENA, F., AND VANDECASTEELE, J.P. (2003): Gasoline and diesel oil biodegradation. Oil Gas Sci. Technol., 58, 441–448.

MARTY, J. C., SALIOT, A. (1976): Hydrocarbons (n-Alkanes) in the Surface Microlayer of Seawater. Deep Sea Resources. v. 23, p. 863-874.

MILLE, G., ALMALLAH, M., BIANCHI, M., VAN WAMBEKE, F., BERTRAND, J.C. (1989). Effect of salinity on petroleum biodegradation. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 339, 788–791.

MILNER, C.W.D.; ROGERS, M.A.; EVANS, C.R. (1977): Petroleum transformations in reservoirs. Journal of Geochemical Exploration. V.7, pp.101-153.

MOLLEA, C., BOSCO, F., RUGGERI, B., 2005. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. Chemosphere 60, 636–643.

MORELI, I.S., DEL PANO, M.T., DE ANTONI, G.L., PAINCEIRA, M.T., 2005. Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation 55, 271–278.

MPHEKGO, P.M., RANDIMA, P., SURRIDGE, K., DRONEN, K., THOMAS, E.C., 2005. Evaluation of microbial diversity of different soil layers at a contaminated diesel site. International Biodeterioration & Biodegradation 55, 39–44.

MULDER, J.L., EL-HENDAWY, H. (1999). Microfungi under stress in Kuwait's coastal saline depressions. Kuwait Journal of Science and Engineering 26, 157–170.

MULDER, J.L., GHANNOUM, M.A., KHAMIS, L., ABU ELTEEN, K. (1989). Growth and lipid composition of some dematiaceous hyphomycete fungi grown at different salinities. Journal of General Microbiology 135, 3393–3404.

NANO, A.; BORRONI, A.; ROTA, R.(2003): Combined Slurry and Solid-Phase Biorremediation of Diesel Contaminated Soils. Jour. Of Haz. Mat. V. 100, p. 79-94.

NASCIMENTO, I.A.(1989): Bioassays of Water Quality in Aratu Bay, Bahia, Brazil, Using Embryonic Development of the Mangrove Oyster *Crasssostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). Proceedings of the International Symposium on Utilization of Coastal Ecosystems: Planning, Pollution and Productivity, 1982. Rio Grande do Sul. V. 2, p. 195-212.

NASCIMENTO, I.A.; SMITH, D.H.; PEREIRA, S.A.; SAMPAIO DE ARAÚJO, M.M.; SILVA, M.A.; MARIANI, A.M. (2000): Integration of Varying Responses of Different Organisms to Water and Sediment Quality at Sites Impacted and not Impacted by the Petroleum Industry. Aq. Ecos. Health and Man. V. 3, p. 449-458.

NOCENTINI, M.; PINELLI, D.; FAVA, F. (2000): Bioremediation of Soil Contaminated by Hydrocarbon Mistures: The Residual concentration Problem. Chemosphere. v.41, p.1115-1123.

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. (1996): Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. J. Bacteriol. 178, 5636-5643.

OBUEKWE, C.O., AL-ZARBAN, S., (1998). Bioremediation of crude oil in the Kuwaiti Desert: the role adherent microorganisms. Environment International 24, 823–834.

OKPOKWASILI GC, AMANCHUKWU SC.(1988): Petroleum hydrocarbon degradation by Candida species. Environment International. V.14, pp.243-47.

OREN, A., (1988). "Anaerobic Degradation of Organic Compounds at High Salt Concentration". Antoine van Leeuwenhoek 54, 267–277.

OREN, A. (1990): Anaerobic Degradation of Organic Compounds in Hypersaline Environments: Possibilities and Limitations. In: Wise, D.L. (Ed.), Bioprocessing and Biotreatment of Coal. Marcel Dekker, New York, pp. 155–175.

OUDOT, J. (1994): Soil pollution by petroleum products and treatments. Analysis Magazine. v. 22, n. 2, p.16 – 18.

OUDOT J. & DUTRIEUX, E. (1989): 'Hydrocarbon weathering and biodegradation in a tropical estuarine ecosystem', Mar.Environ.Res.27,195–213.

OUDOT,J.; DUPONT, J.; HALOUI, S; ROQUEBERT, M.F. (1987):'Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi', Soil Boil. Biochem. 25,1167–1173.

PAIXÃO J.F.; NASCIMENTO, I.A; PEREIRA, S.A; LEITE, M. B. L.; CARVALHO, G.C; SILVEIRA JR., J. S. C.; REBOUÇAS, M.; MATIAS, G. R. A.; RODRIGUES, I.L.P.(2007):Estimating the Gasoline Components and Formulations Toxicity to Microalgae (*Tetraselmis chuii*) and Oyster (*Crassostrea rhizophorae*) Embryos: An Approach to Minimize Environmental Pollution Risk. Environmental Research v. 103, p. 365-374.

PARALES, R.E., DITTY, J.L., HARWOOD, C.S. (2002): Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. Appl. Environ. Microbiol. 66 (9), 4098–4104.

PARKERTON, T.F.; STONE, M.A.; LETINSKI, D.J. (2000): Assessing the aquatic toxicity of complex hydrocarbon mixtures using solid phase microextraction. Toxicology Letters v.112–113, pp. 273–282.

PATEL K. M.; DESAI, J. D. E DESAI, A. J.(1979): "Amino Acid Production by Submerged Cultivation of *Pseudomonas fluorescens* on Gasoline". Folia Microbiol. v.30, p. 420-426.

PEIXOTO, R.S.; COUTINHO, H.L.C.; MADARI, B.; MACHADO, P.L.O.A.; RUMJANEK, N.G.; VAN ELSAS, J.D.; SELDIN, L.; ROSADO, A.S. (2006): Soil Agregation and Bacterial Community Structure as Affected by Tillage and Cover Cropping in the Brazilian Cerrados. Soil and Tillage Research. V. 90. P.16-18.

PEIXOTO, R.S.; COUTINHO, H.L.C.; RUMJANEK, N.G.; MACRAE, A.; ROSADO, A.S. (2002): Use of *rpobB* and 16S rRNA Genes to Analyze Bacterial Diversity of a Tropical Soil Using PCR and DGGE. Lett. Appl. Microbiol. 35(4), 316-320.

PEREIRA, S.A.; NASCIMENTO, I.A; SILVA, C. C.; RODRIGUES, A.R. (2001): Impact of petrochemicals on the Photosynthesis of *Tetraselmis chuii*, using Chlorophyll Fluorescence. Abstract. 11th Annual Meeting of SETAC Europe, 06-10 May, Madrid, Spain.

PIÑA, J.; MERINO, J.; ERRAZU, A. F.; BUCAL, V.(2002): Thermal Treatment of soils Contaminated with Gas Oil: Influence of Soil Composition and Treatment Temperature. Journal of Hazardous Materials. v. 94, p. 273-290.

PIZZUL, L.; CASTILLO, M. P.; STENSTRO, m,J. (2006): Characterization of selected actinomycetes degrading polyaromatic hydrocarbons in liquid culture and spiked soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology v. 22, pp. 745-752.

PLICE, M. J. (1948). "Some Effects of Crude Petroleum on Soil Fertility," *Soil Science Society Proceedings 1948*, 13:413-416.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; MAKSUNG, S.; HUAYYAI, O.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJ, S. (2008), Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa SP4 using sequencing batch reactors: Effects of oil loading rate and cycle time. Bioresource Technology.

RAAG - Remediation Alternative Assessment Group (2000): Evaluation of Risk Based Corrective Action Model. Memorial University of New found land, StJohnís, NF, Canada.

RAMADAN, M. A.; EL-TAYER, O. M. E ALEXANDER, M. (1990): Inoculum Size as a Factor Limiting Success of Inoculation for Biodegradation. Applied and Environmental. Microbiology. v. 56, p. 1392-1396.

REDDY, C.M. & QUINN, J.G.(1999): GC-MS Analysis of Total Petroleum Hydrocarbons and Policyclic Aromatics Hydrocarbons in Sea Water Samples After the *North Cape* Oil Spill. Marine Pollution Bulletin. V.38. n.2. p. 126-135.

RISER-ROBERTS, E. (1998): Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. (2001): Natural roles of biosurfactants. Environmental Microbiology. 3(4): p.229-236.

RON, E. Z. & ROSENBERG, E. (2002): biosurfactants and Oil Bioremediation. Current Opinion in Biotechnology. v. 13: p.249-252.

RONTANI, J. F.; GIUSTI, G. (1986): Study of the Biodegradation of Polybranched Alkanes by Marine Bacterial Community. Marine Chemistry. v.20. pp.197-205.

ROSADO, A. S.; SELDIN, L.; WOLTERS, A.; VAN-ELSAS, J. (1997): Molecular Microbial Ecology: A Minireview. Braz. J. Microbiol. 28, 135-147.

ROSEMBERG, M. (1991): Basic and Applied Aspects of Microbial Adhesion at the Hydrocarbon: Water Interface. Critical Reviews in Microbiology. v. 18, n.2, p. 159-173.

SACO-ÁLVAREZ, L.; BELLAS, J.; NIETO, Ó.; BAYONA J. M.; ALBAIGÉS, J.; BEIRAS, R.(2008): Toxicity and phototoxicity of water-accommodated fraction obtained from Prestige fuel oil and Marine fuel oil evaluated by marine bioassays. Science of the Total Environment v. 394, pp. 275 – 282.

SANTOS, U. (2008): Comunicação Pessoal: Informação técnica sala de operações TRANSPETRO-SUAPE –PE.

SASSEN, R. (1980): Biodegradation of crude oil and mineral deposition in a shallow Gulf Coast salt dome. Organic Geochemistry Volume 2, Issues 3-4, pp.153-166.

SCHERRER, P.; MILLE G. (1990): Biodegradation of crude oil in experimentally-polluted clayey and sandy mangrove. Soils Oil and Chemical Pollution Volume 6, Issue 3, pp. 163-176.

SCHIPPERS, C.; GEßNER, K.; MÜLLER,T.; SCHEPER, T. (2000): Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. Journal of Biotechnology v. 83, pp189–198.

SEEGER, M.; TIMMIS, K., N.; HOFER, B. (1997): Bacterial Pathways for the Degradation of Polychlorinated Biphenyls. Marine chemistry. v. 58, p. 327-33.

SERRAZANETTI, G.P.; PAGNUCCO C.; CONTE, L.S.; CATTANI, O. (1995): Hydrocarbons, Sterols and Fatty Acids in Sea Urchin (*Paracentrotus lividus*) of the Adriatic Sea. Chemosphere, Vol. 30, No. 8, pp. 1453-1461.

SHULGA, A.; KARPENKO, E.; VILDANOVA-MARTISHIN, R.; TUROVSKY, A.; SOLTYS, M. (2000): Biosurfactant-enhanced remediation of oil contaminated environments. Adsorption Science and Technology 18: 171-176, 2000SKOOG, D.A. & LEARY, J.J. - "Principles of Instrumental Analysis" - 4th. ed., Fort Worth - Philadelphia, Saunders (1992), 700 pp.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. (1992): Principles of Instrumental Analysis. Fifth Edition. Mc Graw Hill. Harcourt Brace & Co. Illinois.

SONG H.G., PREDERSEN T.A., BARTHA R. (1986): Hydrocarbon mineralization in soil: Relative bacterial and fungal contribution. Soil Biology and Biochemistry. V.28 n.1, pp.109-11.

SPAULDING, M. L. (1988): A state-of-the-art Review of Oil Spill Trajectory and Fate Modeling. Oil and Chemical Pollution. V. 4, Issue I, pp. 39-55.

TAM, N.F.Y.; GUO, C.L.; YAU, W.Y.; WONG, Y.S. (2002): Preliminary study on biodegradation of phenanthrene. Marine Pollution Bulletin. V.45, pp. 316-324.

TORSLOV, JENS. (1992): Comparison of Bacterial Toxicity Tests Based on Growth, dehydrogenase Activity, and Esterase activity of

Pseudomonas florescens . Ecotoxicology and Environmental Safety. v.25, p. 33-40.

TSUTSUMI, H.; HIROTA, Y.; HIRASHIMA, A. (1999): Bioremediation on the Shore after an Oil Spill from the Nakhodka in the Sea of Japan. II. Toxicity of a Bioremediation Agent with Microbiological Cultures in Aquatic Organisms. Marine Pollution Bulletin Vol. 40, No. 4, pp. 315-319.

URURAHY, A. F. P. (1998) Biorremediação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria. Tese de Doutorado em Ciências. Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro.

URURAHY, A. F. P. & PEREIRA Jr., N. (2006): Tecnologias de Tratamento de Resíduos da Indústria Petroleira: Novas Tendências. *in* :"Gestão em Biotecnologia". ADELAIDE ANTUNES, NEI PEREIRA Jr & MARIA DE FÁTIMA EBOLE, Editores. E-Papers Serviços Editoriais LTDA. Rio de Janeiro.

USEPA (1995a): How to Evaluate alternative cleanup technologies for Underground storage tank sites. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency. Publication#EPA 510-B-95-007,Washington,DC.

USEPA (1995b): Abstracts of remediation case studies.Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency.PublicationnumberEPA-542-R-95 001,Washington,DC.

USEPA (1996): A citizens guide to soil washing. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency Publication #EPA542-F-96-002,Washington, DC.

USEPA (1998): Soil vapor extraction (SVE). Office of the Underground Storage Tank, US Environmental Protection Agency. Publication # practice. Air and Waste Management Association's Magazine for EPA510-B-95-007, http://www.epa.gov/swerust1/cat/sve1.htm

WALKER JD, PETRAKIS L, COLWELL RR. (1978): Degradation of petroleum by pure cultures of bacteria, algae, yeasts and filamentous fungi. Archives of Microbiology. V.30, pp.79-81.

WALTER, M. V. Bioaugmentation. (1997) In: Manual of Environmental Microbiology. Washington. American Society for Microbiology - ASM. p.753-57.

WATANABE, K. (2001): Microorganisms Relevant to Bioremediation. Current Opinion in Biotechnology, v. 12, p.237–241.

WATANABE, K. (2002): Linking Genetics, Physiology and Ecology: an Interdisciplinary Approach for Advancing Bioremediation. Journal of Bioscience and Bioengeneering. V. 94, 557-562.

WHYTMAN, B. T.; DUCKYWORTH, D. F., HARDING, A. A. B., JEFFRREY, P. G.; PERRY, S. C. (1975) Marine Pollution by Oil: Characterization of Pollutants, Sampling, Analysis and Interpretation. *In*: Applied Science. London.

WOELKE, C.E. (1972): Development of Receiving Water Quality Bioassay Criterion Based Upon the 48-hour Pacific Oyster (Crassostrea gigas) Emryo. Tech. Rept. Wash. Dep. Fish. V.9, 93p.

WSPA – (Western States Petroleum Association) (1993): Chemical and Physical characteristics of Crude Oil, Gasoline, and Diesel Fuel: A Comparative Study, Western States Petroleum Association, Glendale, California, September 17.

YANG, L.; LAI, C. T.; SHIEH. (1999) "Biodegradation of Dispersed Diesel Fuel under High Salinity Conditions". Wat. Res. v. 34, n. 13 p. 3303 –3314.

YERUSHALMI, L.; ROCHELEAU, S.; CIMPOIA, R.; SARRAZIN, M.; SUNAHARA, G.; PEISAJOVICH, A.; LECLAIR, G.; GUIOT, S. R. (2003): Enhanced Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soil. Bioremediation Journal. v.7.n.1, p. 37 - 51.

ZAJIC, J. E., MAHOMEDY, A. Y. in: Petroleum Microbiology. New York. Macmillan Publishing Company. 1984.

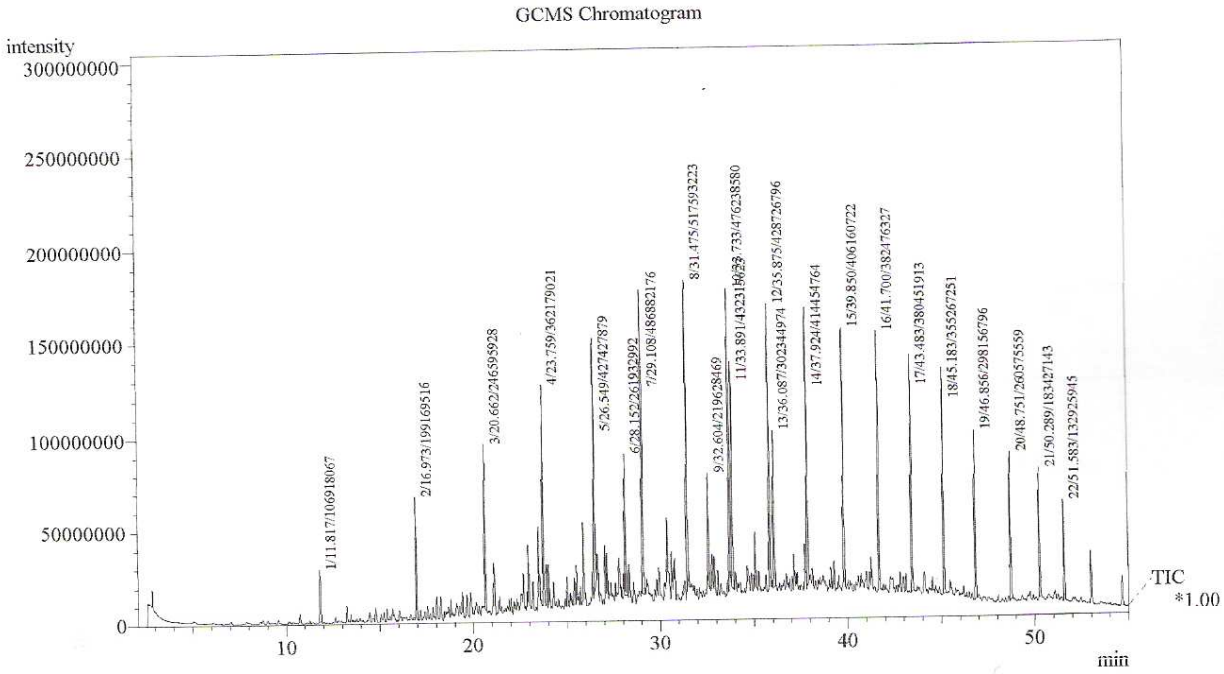
ZAJIC, E. & SUPPLISSON, B. (1972): Emulsification and degradation of Bunker C'' fuel oil by microorganisms. Biotechnology and Bioengineering. V.14, pp.331-43.

ZHANG, Y., MAIER, W.J., MILLER, R.M., 1997. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. Environ. Sci. Tech.

ZHU, L.; LU, H.; CHEN, S. (2008): Pollution level, phase distribution and source analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in residential air in Hangzhou, China. Journal of Hazardous Materials. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.05.150.

ANEXOS

9.1 Cromatogramas



GCMS Peak Report

Peak#	R.Time	Area	%Total	Name	Base m/z
1	11.817	106918067	1.47		43.00
2	16.973	199169516	2.74		57.00
3	20.662	246595928	3.39		57.00
4	23.759	362179021	4.97		57.00
5	26.549	427427879	5.87		57.00
6	28.152	261932992	3.60		57.00
7	29.108	486882176	6.69		57.00
8	31.475	517593223	7.11		57.00
9	32.604	219628469	3.02		57.00
10	33.733	476238580	6.54		57.00
11	33.891	432315623	5.94		57.00
12	35.875	428726796	5.89		57.00
13	36.087	302344974	4.15		57.00
14	37.924	414454764	5.69		57.00
15	39.850	406160722	5.58		57.00
16	41.700	382476327	5.25		57.00
17	43.483	380451913	5.22		57.00
18	45.183	355267251	4.88		57.00
19	46.856	298156796	4.09		57.05
20	48.751	260575559	3.58		57.00
21	50.289	183427143	2.52		57.05
22	51.583	132925945	1.83		57.00
		7281849663	100.00		

Figura 9.1: Cromatograma do resíduo não tratado (GC-MS)

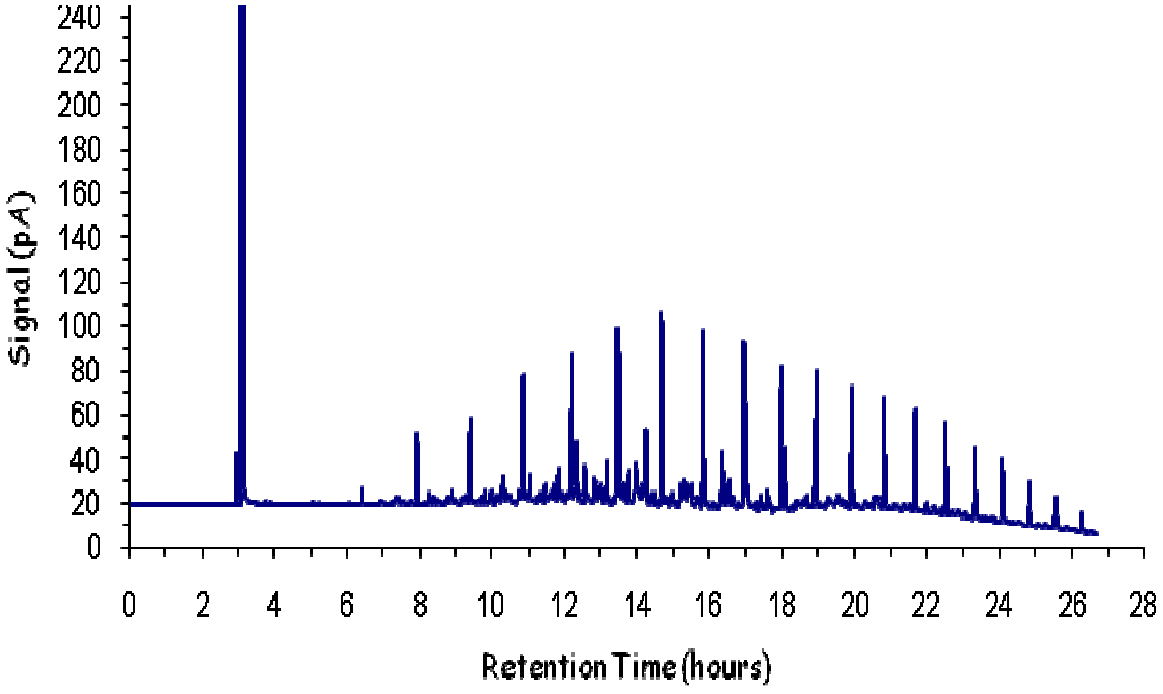


Figura 9.2: Cromatograma do resíduo não tratado (GC-FID)

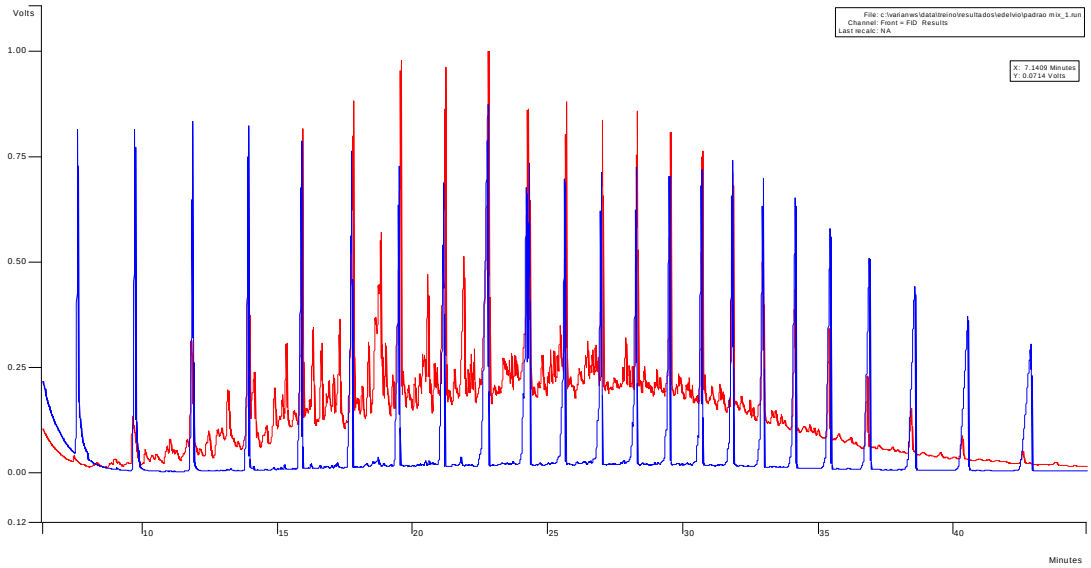


Figura 9.3: Comparação entre o perfil cromatográfico do padrão (Accustandard®) e o perfil da amostra de resíduo

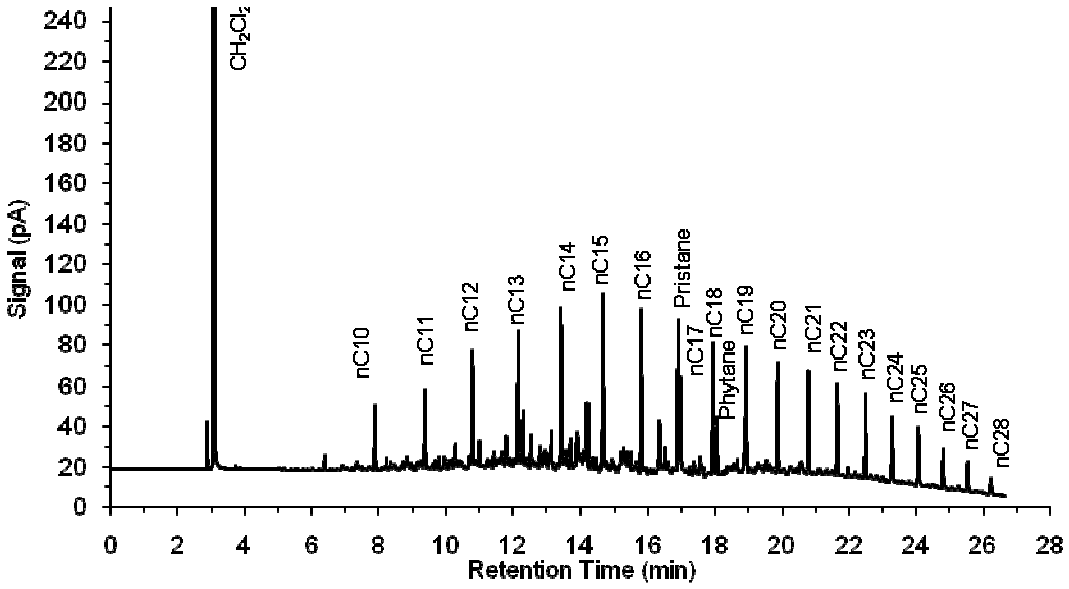
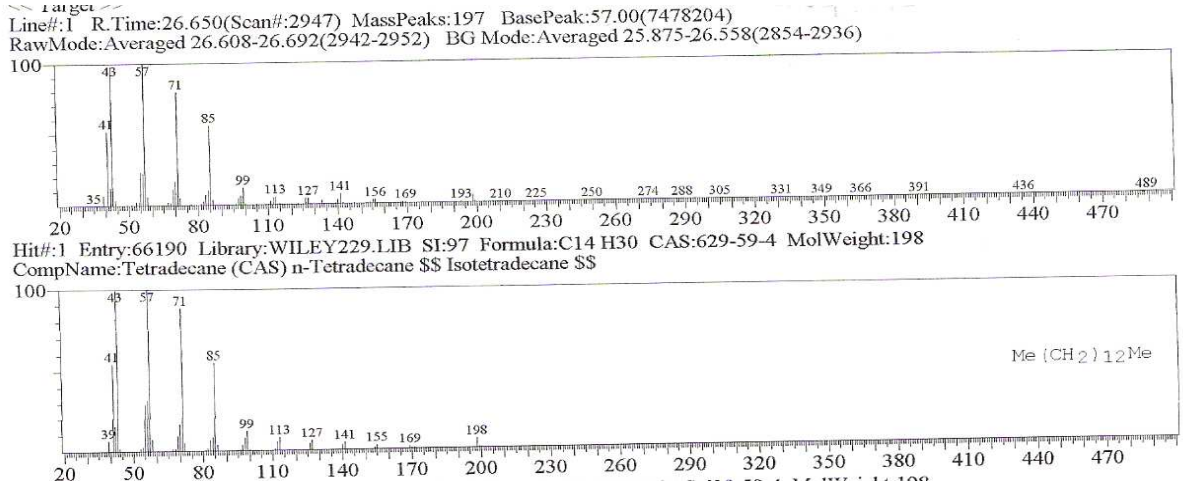


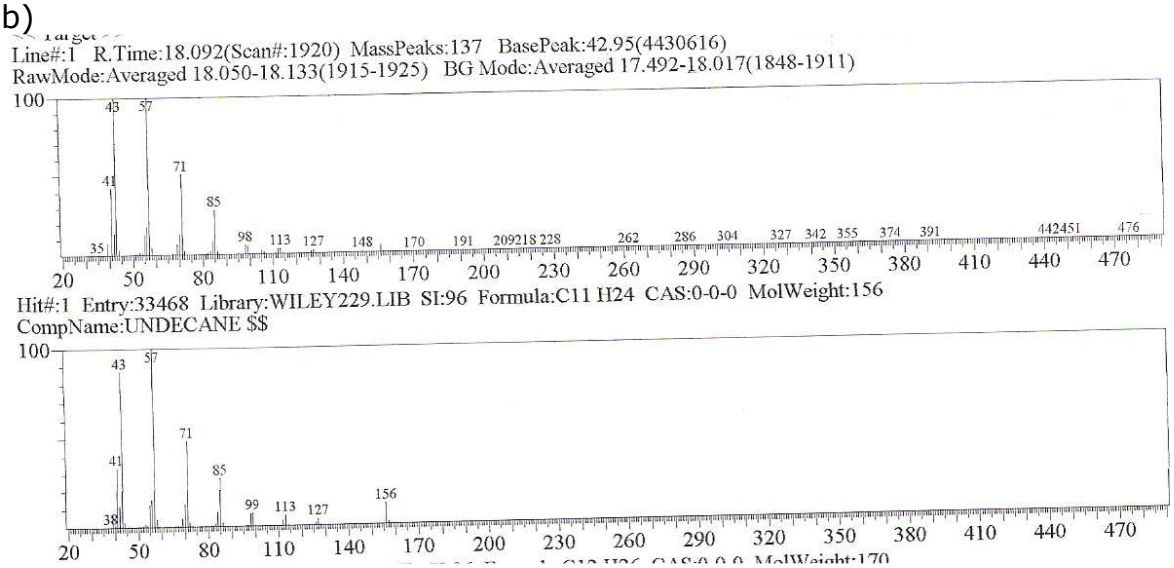
Figura 9.4: Perfil com identificações

9.2 Espectro de Massa de alguns Hidrocarbonetos Identificados no Resíduo

a)

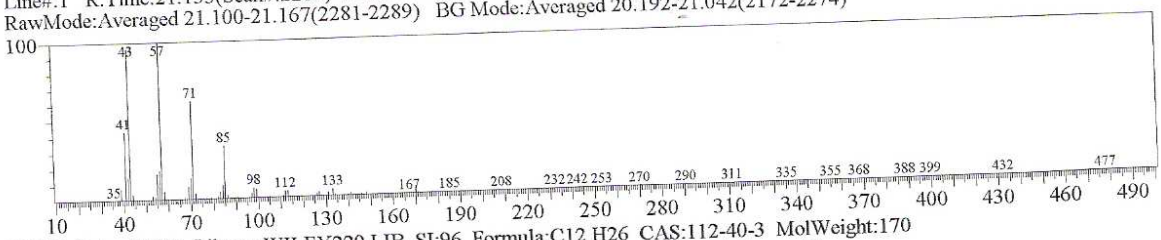


b)

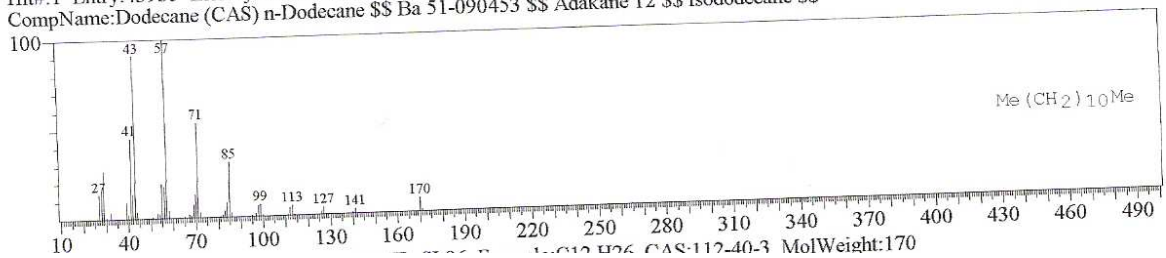


c)

Line#:1 R.Time:21.133(Scan#:2285) MassPeaks:154 BasePeak:57.00(6919880)
RawMode:Averaged 21.100-21.167(2281-2289) BG Mode:Averaged 20.192-21.042(2172-2274)

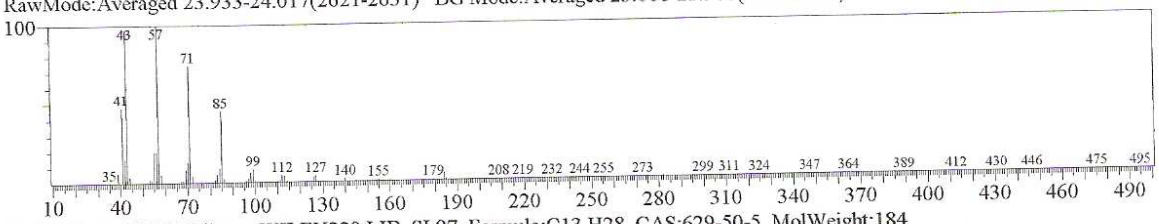


Hit#:1 Entry:43935 Library:WILEY229.LIB SI:96 Formula:C12 H26 CAS:112-40-3 MolWeight:170
CompName:Dodecane (CAS) n-Dodecane $$ Ba 51-090453 $$ Adakane 12 $$ Isododecane $$

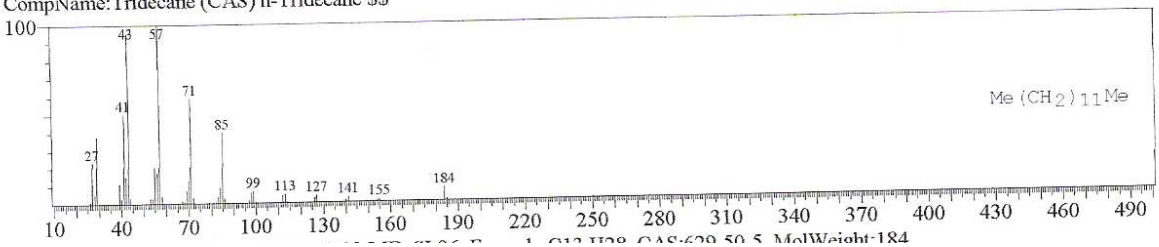


d)

Line#:1 R.Time:23.983(Scan#:2627) MassPeaks:136 BasePeak:57.00(6629269)
RawMode:Averaged 23.933-24.017(2621-2631) BG Mode:Averaged 23.008-23.908(2510-2618)

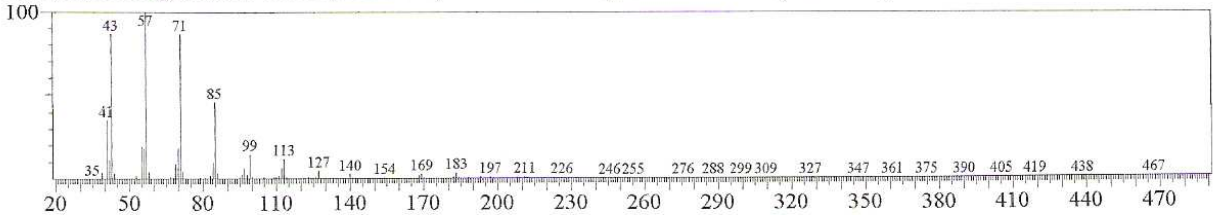


Hit#:1 Entry:54725 Library:WILEY229.LIB SI:97 Formula:C13 H28 CAS:629-50-5 MolWeight:184
CompName:Tridecane (CAS) n-Tridecane $$

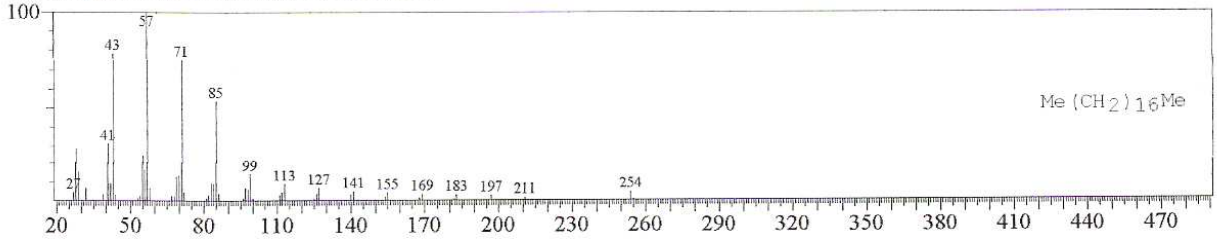


e)

GCMS Library
<< Target >>
Line#:1 R.Time:28.242(Scan#:3138) MassPeaks:166 BasePeak:57.00(4326594)
RawMode:Averaged 28.200-28.283(3133-3143) BG Mode:Averaged 27.267-28.167(3021-3129)

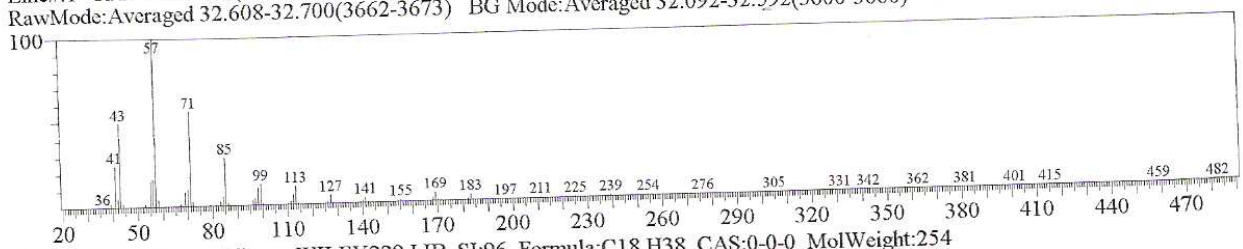


Hit#:1 Entry:112764 Library:WILEY229.LIB SI:94 Formula:C18 H38 CAS:593-45-3 MolWeight:254
CompName:Octadecane (CAS) n-Octadecane $$

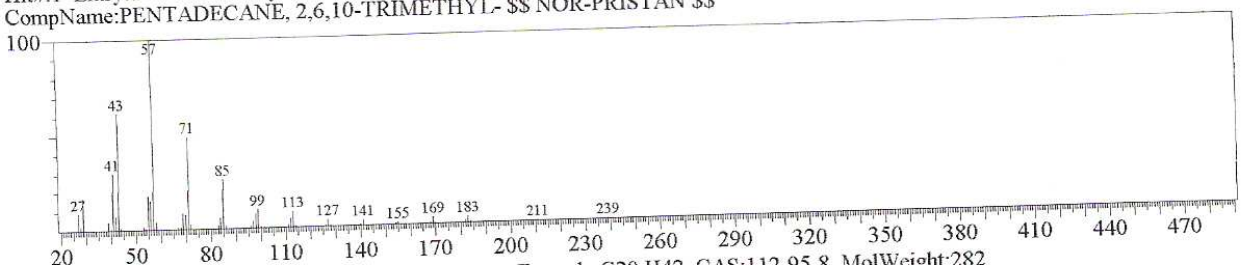


f)

GCMS Library
<< Target >>
Line#:1 R.Time:32.658(Scan#:3668) MassPeaks:195 BasePeak:57.00(4758778)
RawMode:Averaged 32.608-32.700(3662-3673) BG Mode:Averaged 32.092-32.592(3600-3660)



Hit#:1 Entry:112777 Library:WILEY229.LIB SI:96 Formula:C18 H38 CAS:0-0-0 MolWeight:254
CompName:PENTADECANE, 2,6,10-TRIMETHYL- $$ NOR-PRISTAN $$



g)

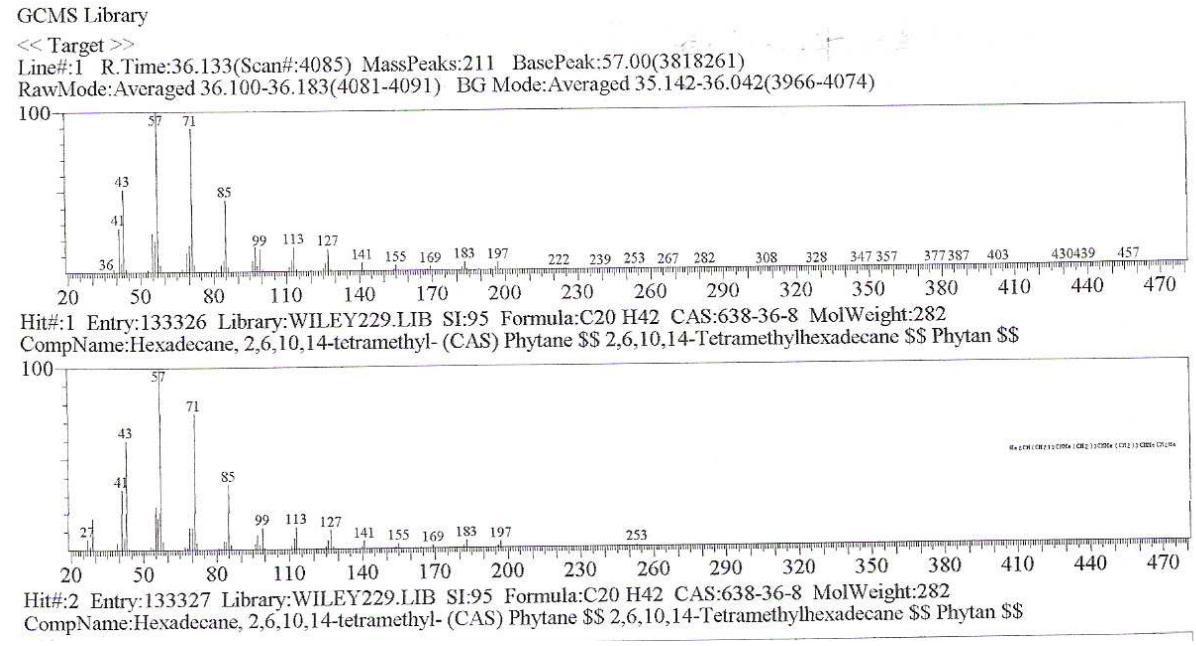


Figura 9.5: Espectro de massas de alguns dos hidrocarbonetos identificados (a) tetradecano (b) undecano (c)dodecano (d)tridecano (e) octadecano (f) pristano (g) fitano

9.3 Produções decorrentes da Tese

"Avaliação de Biodegradabilidade de Resíduo Oleoso, em Biorreator, por Batelada Simples e Batelada Seqüencial" (Diálogos & Ciência, n. 12, v.1, dez. 2007, ISSN1678-0493). Autores: Edelvio de Barros Gomes, Nei Pereira Jr.;

DIÁLOGOS & CIÊNCIA

AVALIAÇÃO DE BIODEGRADABILIDADE DE RESÍDUO OLEOSO, EM BIORREATOR, POR BATELADA SIMPLES E BATELADA SEQÜENCIAL

Edelvio de Barros Gomes[1]
Nei Pereira Júnior[2]

RESUMO: Dois modos de operação de biorreatores foram comparados, quanto à eficiência no tratamento de resíduo de óleo diesel coletado de tanque de armazenamento da Petrobras em Pernambuco, Brasil. O modo de operação por batelada seqüencial (SBR), constituído por três ciclos, apresentou melhor eficiência de biodegradação do resíduo, quando comparado ao modo de operação por batelada simples. A eficiência de degradação do resíduo foi de 97,8% ao final do terceiro ciclo da SBR, contrastando com 25,9% obtidos pelo modo de operação por batelada simples. Dentre os três ciclos da SBR, o primeiro ciclo, apresentou a mais baixa taxa de degradação (0,329) e os segundo e terceiro ciclos apresentaram similares taxas de degradação (0,760 e 0,653, respectivamente). O crescimento microbiano foi aproximadamente 80% maior na SBR que na batelada simples. Com base nos resultados obtidos a partir de ambos os modos de operação, o resíduo investigado apresentou alta tratabilidade e baixa recalcitrância, a qual foi confirmada cromatograficamente, pela preponderância de n-alcanos e pequena quantidade de alcanos ramificados, embora a presença de alcanos ramificados mais recalcitrantes como pristano e fitano tenha sido confirmada. O modo de operação SBR é perceptivelmente o mais recomendado para o tratamento do resíduo em questão.

Palavras-chave: Biodegradação; SBR; Processos periódicos; Resíduo de óleo diesel.

ABSTRACT: Two bioreactors operation modes were compared in terms of their efficiency to treat a diesel fuel waste sampled by a storage tank from Petrobras Company in Pernambuco, Brazil. The Sequential Batch Reactor operation mode (SBR) ordered in three cycles, presented better residue efficiency biodegradation when compared to a batch reactor. The residue biodegradation efficiency was 97.8% at the end of third cycle in the SBR, in contrast with 25.9 % in the batch reactor. Amongst the cycles of SBR, the first cycle, presented lower degradation rate (0.329) and the second and third cycles presented similar degradation rates (0.760 and 0.653 respectively). Microbial growth was approximately 80% greater in the SBR than the batch. Based on the results obtained from the both operation modes, the investigated residue presented high treat-ability and low recalcitrance, which was confirmed chromatographically, by the preponderance of n-alkanes and few amounts of branched alkanes, although the presence of the more recalcitrant branched alkanes as pristane and phytane had been confirmed. The SBR operation mode is perceptibly the best recommended to treat the studied residue.
Key-words: Biodegradation; SBR; Periodic processes; Diesel fuel residues.

[1] Mestre em Biotecnologia de Produtos Bioativos – UFPE, doutorando em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Escola de Química da UFRJ. Bolsista DTI-G pelo CNPq. Professor da Microbiologia Ambiental - Faculdade Frassinetti do Recife – FAFIRE.
E-mail: edelviogomes124@hotmail.com
[2] PhD em Engenharia Bioquímica pela Manchester University Oxford, Inglaterra. Professor titular da Escola de Química – UFRJ. E-mail: nei@eq.ufrj.br

"Avaliação da Eficiência do Modo de Operação de um Biorreator no Tratamento de Resíduo Oleoso" (Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – XVII COBEQ 2008). Autores: Edelvio de Barros Gomes, Adriana Ururahy Soriano, Nei Pereira Jr.;

XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUIMICA
IV CONGRESSO BRASILEIRO DE TERMODINÂMICA APLICADA
14 a 17 de Setembro 2008
ENGENHARIA QUÍMICA ENERGIA E NOVOS DESAFIOS
Mar Hotel - Recife - PE

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MODO DE OPERAÇÃO DE UM BIORREATOR NO TRATAMENTO DE RESÍDUO OLEOSO.

E. B. Gomes[1]; A. U. Soriano[2]; N. Pereira Jr[1]

[1]Departamento de Engenharia Bioquímica – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia bl "E" Ilha do Fundão, CEP 21.949-900 – Rio de Janeiro - RJ, Brasil; [2]Petrobrás Centro de Pesquisa Leopoldo A. Miguez - CENPES, Gerência de biotecnologia e Tratamento Ambiental, Avenida 1, Quadra 7, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro - RJ, CEP 21949-900
Telefone: (**-21) 2562-7618 – E mail: edelviogomes123@hotmail.com

RESUMO – Dois modos de operação de biorreatores foram comparados, quanto a eficiência no tratamento de resíduo de óleo diesel coletado de tanques da Petrobrás em Pernambuco, Brasil. O modo operacional por batelada seqüencial (SBR), constituído por três ciclos, apresentou melhor eficiência de biodegradação do resíduo, quando comparado ao modo por batelada simples. A eficiência de biodegradação foi 97,8% ao final do terceiro ciclo no modo SBR, contrastando com 25,9 % obtidos pelo modo de operação por batelada simples. O crescimento microbiano foi aproximadamente 80% maior no SBR que na batelada simples. O resíduo investigado apresentou grande potencial de tratabilidade de acordo com as condições testadas, e baixa recalcitrância. O modo de operação SBR é perceptivelmente o mais recomendado para o tratamento do resíduo em questão.

PALAVRAS-CHAVE: Biodegradação, SBR, processos periódicos, resíduo de óleo diesel.

ABSTRACT – Two bioreactors operation modes were compared in terms of their efficiency to treat a diesel fuel waste sampled from Petrobrás Company tanks in Pernambuco, Brazil. The Sequential Batch Reactor operation mode (SBR) ordered in three cycles, presented better residue efficiency biodegradation when compared to a batch reactor. The residue biodegradation efficiency was 97.8% at the end of third cycle in the SBR, in contrast with 25.9 % in the batch reactor. Microbial growth was approximately 80% greater in the SBR than the batch. The investigated residue presented high treat-ability and low recalcitrance, according to tested conditions. The SBR operation mode is perceptibly the best recommended to treat the studied residue.

"Physical-Chemical Parameters Affecting Biodegradation of Diesel Oil Residue (Anais do "II Brazilian Symposium of Petroleum Biotechnology" – II BSPB, 2006) Edelvio de Barros Gomes, Nei Pereira Jr.;

II BSPB
Second Brazilian Symposium on Petroleum Biotechnology
Old and New Energy Sources

Certificamos que

Edelvio de B. Gomes e Nei Pereira Jr.

apresentaram o trabalho científico:

PHYSICAL-CHEMICAL FACTORS AFFECTING BIODEGRADATION OF DIESEL STORAGE TANK WASTE

no SECOND BRAZILIAN SYMPOSIUM ON PETROLEUM BIOTECHNOLOGY OLD AND NEW ENERGY SOURCES, promovido pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN e realizado pelo CROB/LBMG do DBG-CB/UFRN durante o período de 13 a 17 de Novembro de 2006.

Natal- RN, Brasil, 17 de Novembro de 2006.

DR. CARLOS A. GALINDO BLAHA
COORDENADOR DO II-BSPB

"Biodegradation of Stored Jet Fuel by a *Nocardia sp.* Isolated From Contaminated Soil" (Brazilian Archives of Biology and Technology – trabalho aceito para publicação em abril de 2008) Autores: Edelvio de Barros Gomes, Adriana Ururahy Soriano, Nei Pereira Jr.;

TECPAR

Brazilian Archives of Biology and Technology

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o artigo: ***"Biodegradation of Stored Jet Fuel by a Nocardia sp. Isolated From Contaminated Soil"***, de autoria de: Edelvio de Barros Gomes, Adriana Ururahy Soriano and Nei Pereira Jr., foi aceito e está em processo de publicação no *Brazilian Archives of Biology and Technology*.

Curitiba, 10 de abril de 2008

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Editor

1/1

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ
Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775 - CIC - CEP 81350-010 -Curitiba - Paraná - Brasil
Fone: (041)3316-3052 - Fax (041)3346-2872 - url: http://www.tecpar.br – email tecpar@tecpar.br

"Ecotoxicological Evaluation of Treated Oil Waste by Sequential Batch in Bioreactor". (Anais do II Workshop Internacional de Meio Ambiente – II WIMA 2008). Autores: Edelvio de Barros Gomes, Adriana Ururahy Soriano, Iracema Andrade Nascimento, Nei Pereira Jr.;

BDG-022: Ecotoxicological evaluation of treated oil waste by sequential batch in bioreactor

E. B. Gomes (1); A. U. Soriano (2); I. A Nascimento (3); N. Pereira Jr. (1)*

(1) Departamento de Engenharia Bioquímica – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia BL "E", Ilha do Fundão, CEP 21.949-900 – Rio de Janeiro - RJ, Brazil; (2) Petrobrás Centro de Pesquisa Leopoldo A. Miguez - CENPES, Gerência de biotecnologia e Tratamento Ambiental, Avenida 1, Quadra 7, Ilha do Fundão, CEP 21949-900, Rio de Janeiro – RJ, Brazil; (3) Laboratório de Biologia Marinha e Biomonitoramento, Universidade Federal da Bahia UFBA, Campus Ondina, CEP 40.170-290. Salvador-BA, Brazil.

"Avaliação da Ecotoxicidade de Resíduo Oleoso Tratado". (Anais do XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental – XI ENAMA 2008). Autores Edelvio de Barros Gomes; Rita C. M. de Miranda; Iracema Andrade Nascimento; Nei Pereira Jr.;

XI ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL
X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO
Fortaleza, 4 a 7 de novembro de 2008

Certificamos que o trabalho "AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE RESÍDUO OLEOSO TRATADO" de autoria de EDELVIO DE BARROS GOMES; RITA DE CÁSSIA MENDONÇA DE MIRANDA; IRACEMA ANDRADE NASCIMENTO; NEI PEREIRA JR **foi apresentado no** XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental e X Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo na forma de pôster.

Regine Helena S. dos Fernandes Vieira
Presidente IX ENAMA e X Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo

Luis Parente Maia
Diretor do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR - UFC

Realização: