



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



BIOTRATAMENTO DE EFLUENTE CONTAMINADO POR
HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

PATRÍCIA ANGÉLICA VIEIRA

UBERLÂNDIA-MG

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**BIOTRATAMENTO DE EFLUENTE CONTAMINADO POR
HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO**

Patrícia Angélica Vieira

Orientadoras: **Dra. Vicelma Luiz Cardoso**
 Dra. Francisca Pessoa de França

**Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Doutora em
Engenharia Química.**

Uberlândia – MG

2008

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE
PATRÍCIA ANGÉLICA VIEIRA, APRESENTADA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DE UBERLÂNDIA, EM 26/02/2008.

BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a. Dr.^a. Vicelma Luiz Cardoso
Orientadora (FEQUI/UFU)



Prof.^a. Dr.^a. Francisca Pessoa de França
Co-Orientadora (EQ/UFRJ)



Prof.^a. Dr.^a. Miriam Maria Resende
(FEQUI/UFU)



Dr.^a. Alcina Maria Fonseca Xavier
(UFU)



Prof.^a. Dr.^a. Lúcia Helena Innocentini Mei
(FEQUI/UNICAMP)



Dr. Fernando Jorge Santos de Oliveira
(PETROBRÁS)



Prof. Dr. Luiz Nishyama
(IG/UFU)

FICHA CATALOGRÁFICA

V658b Vieira, Patrícia Angélica, 1978-

Biotratamento de efluente contaminado por hidrocarbonetos de petróleo / Patrícia Angélica Vieira. - 2008.

142 f. : il.

Orientadoras : Vicelma Luiz Cardoso, Francisca Pessoa de França.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Biodegradação - Teses. 3. Combustíveis diesel - Teses. 4. Gasolina - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz. II. França, Francisca Pessoa de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 66.0

Dedico esta tese

aos meus pais: **JOÃO BATISTA E SANTINA** e
aos meus irmãos, que sempre me apoiaram.

Muito Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, por nos proporcionar a capacidade de escolher nossos caminhos e nos abençoar sempre. Aos meus pais, João Batista e Santina, e aos meus irmãos Rafael e Frederico, meu eterno e sincero agradecimento pela confiança e dedicação, que nunca me foram negados durante toda a minha vida e formação profissional. Vocês sempre serão referências para mim.

À Prof^a. Vicelma Luiz Cardoso pela orientação, pela total dedicação e oportunidade depositada, durante os nossos 10 anos de parceria, que se originou desde o começo da minha graduação.

À Prof^a. Francisca Pessoa de França pelas diretrizes e apoio.

Ao Prof. Eloízio Júlio Ribeiro pela ajuda e amizade construída durante todos estes anos.

À Prof^a. Miriam Maria de Resende pela cooperação e amizade.

Às Prof^{as}. Alcina Maria Fonseca Xavier e Lúcia Helena Innocentini Mei, ao Engenheiro Químico Fernando Jorge Santos de Oliveira e ao Prof. Luiz Nishyama, pelas sugestões e correções.

Aos professores da FEQUI que contribuíram para a minha formação acadêmica, e pela convivência do dia a dia.

Aos meus colegas Cristian, Fernanda, Líbia, Marília e Sandra pelo companheirismo nos bons e maus momentos e agradável convívio que me proporcionaram a amizade compartilhada, que nunca serão esquecidos.

Ao Engenheiro Édio José Alves pelo auxílio e colaboração na parte informática.

Aos funcionários da FEQUI: Zuleide, Roberta, Anísio, Silvino e José Henrique, sempre dispostos a ajudar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

À FAPEMIG pela oportunidade a mim concedida de fazer parte do programa de pós-graduação e pelo apoio financeiro, sem o qual este projeto não poderia ser realizado.

À CAPES pelo apoio financeiro destinado a infra-estrutura dos laboratórios.

À CARGIL AGRÍCOLA S/A Uberlândia-MG, por nos dar suporte com as análises Carbono Orgânico Total (TOC).

Enfim, a todos que colaboraram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

*“Descobri como é bom chegar quando se tem
paciência.*

*E para se chegar, onde quer que seja,
aprendi que não é preciso dominar a força, mas a
razão.*

É preciso, antes de mais nada, querer.”

(Amyr Klink)

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	i
Lista de tabelas.....	v
Lista de símbolos.....	viii
Resumo.....	x
Abstract	xi
 CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	 1
 CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	 5
2.1 – O Petróleo.....	5
2.2 – Refinarias no Brasil.....	6
2.3 – Gasolina.....	9
2.4 – Óleo Diesel.....	11
2.5 – Terminais de Distribuição de Combustíveis (Óleo Diesel e Gasolina) no Brasil.....	14
2.6 – O Gerenciamento de Áreas Contaminadas por Derivados de Petróleo....	14
2.7 – Algumas Técnicas de Tratamento de Áreas Contaminadas.....	22
2.8 – Microrganismos Envolvidos no Processo de Biodegradação.....	25
2.8.1 – Microrganismos Degradores de Hidrocarbonetos.....	25
2.8.2 – Produção de Biosurfactantes.....	28
2.9 – Fatores que Afetam o Processo de Biodegradação.....	29
2.9.1 – Condições de Processo.....	29
2.9.2 – Limitações Metabólicas.....	34
2.10 – Metabolismo de Degradação de Hidrocarbonetos.....	36
2.11 – Planejamentos Experimentais.....	41
2.11.1 – Planejamento Experimental Composto Central.....	42
2.11.2 – Padrão da Análise Estatística de Respostas PCC.....	43

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1 – Matéria-prima : Efluente Contaminado.....	46
3.2 – Fonte dos Microrganismos Empregados.....	47
3.3 – Adaptação das Culturas ao Efluente Sintético – Prévia Adaptação.....	48
3.3.1 – Efluente Sintético para Prévia Adaptação.....	48
3.3.2 – Manutenção das Culturas Puras e Mista Após Adaptação.....	48
3.3.3 – Meio de Cultura Utilizado no Isolamento dos Microrganismos Presentes na Cultura Mista.....	49
3.3.3.1 – Identificação dos Microrganismos.....	49
3.4 – Caracterização do Efluente.....	49
3.5 – Adaptação das Culturas ao Efluente <i>in natura</i>	50
3.6 – Padronização dos Inóculos Utilizados nos Reatores para o Estudo da Cinética de Biodegradação do Efluente Contaminado.....	51
3.7 – Estudo da Cinética de Biodegradação de Efluente Contaminado (Efluente <i>in natura</i> adicionado de fertilizantes) Empregando Culturas Puras e Mista.....	51
3.7.1 – Modelagem Matemática.....	52
3.8 – Estudo da Substituição da Adição de Extrato de Levedo por Levedura Cervejeira Autolizada (LCA) Empregando as Culturas <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 10145 e Mista C ₁	53
3.9 – Planejamentos Experimentais.....	54
3.9.1 – Desenvolvimento dos Experimentos.....	54
3.10 – Estudo Comparativo do Processo de Biodegradação do Efluente Contaminado sob as Condições com Aeração Constante (AC), sem Aeração (SA) e com Aeração Intermitente (AI).....	61
3.11 – Análises Quantitativas.....	61
3.11.1 – Demanda Química de Oxigênio – DQO.....	61
3.11.2 – Demanda Bioquímica de Oxigênio – DBO.....	61
3.11.3 – Determinação de Fósforo Total.....	61
3.11.4 – Determinação de Nitrogênio Total- Método de <i>Kjeldahl</i>	62
3.11.5 – Carbono Orgânico Total.....	63
3.11.6 – Determinação de Hidrocarboneto Total de Petróleo (TPH).....	63
3.11.7 – Quantificação do Crescimento de Biomassa.....	64

3.11.8 – Análise Cromatográfica.....	64
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1 – Caracterização do Efluente.....	66
4.1.1 – Características Gerais do Efluente	66
4.1.2 – Caracterização Cromatográfica do Efluente.....	67
4.2 – Adaptação de Culturas Puras e Mista ao Efluente.....	68
4.3 – Identificação da Cultura Mista C ₁	69
4.4 – Cinética de Culturas Pura e Mista.....	70
4.4.1 – Cinética de Crescimento Celular.....	70
4.4.2 – Cinética de Biodegradação.....	72
4.4.3 – Modelagem da Cinética de Crescimento Celular e Biodegradação.....	74
4.5 – Estudo da Substituição de Extrato de Levedo por Resíduo de Levedura Cervejeira Autolizada (LCA).....	76
4.5.1 – Crescimento Celular	77
4.5.2 – Biodegradação	78
4.6 – 1º Planejamento Experimental – Otimização das Concentrações de Nutrientes e da Concentração de Inóculo.....	81
4.6.1 – Análise de Regressão dos Resultados Obtidos para a Remoção de TPH a partir das Variáveis Estudadas.....	82
4.6.2 – Análise de Regressão dos Resultados Obtidos para a Concentração de Biomassa a partir das Variáveis Estudadas.	88
4.6.3 – Aspectos Visuais dos Experimentos.....	94
4.6.4 – Teste de Reprodutibilidade Empregando as Melhores Condições de Concentrações de Nitrogênio, Fósforo e Inóculo Obtidas Pelo Planejamento Experimental.....	95
4.6.4.1 – Avaliação dos Resultados Empregando Cromatografia Gasosa para os Experimentos R ₁₅ e R _{pot exp}	96
4.7 – 2º Planejamento Experimental - Otimização do Intervalo de Aeração e do Nível de Agitação.....	99

4.7.1 – Análise de Regressão dos Resultados Obtidos na Remoção de TPH a partir das Variáveis Estudadas.....	100
4.7.2 – Análise de Regressão dos Resultados Obtidos no Crescimento Celular a Partir das Variáveis Estudadas.....	104
4.7.3 – Monitoramento do pH.....	108
4.7.4 – Monitoramento do Oxigênio Dissolvido (O_{2d}).....	110
4.7.5 – Teste de Reprodutibilidade Empregando as Melhores Condições de Intervalo de Aeração e Nível de Agitação Obtidos Pelo Planejamento Experimental.....	112
4.7.5.1– Avaliação dos Resultados Empregando Cromatografia Gasosa para os Experimentos R_{10} e $R_{pot,IA,Vag}$	113
4.8 – Estudo Comparativo do Processo de Biodegradação do Efluente Contaminado Sob as Condições Com Aeração Constante (AC), Sem Aeração (SA) e com Aeração Intermitente (AI).....	116
4.8.1 – Resultados de Concentração e Remoção de TPH.....	116
4.8.2 – Resultados de pH e Crescimento de Biomassa.....	119
4.8.3 – Remoção dos Hidrocarbonetos Avaliada por Análise Cromatográfica.....	121
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....	129
5.1 – Conclusões.....	129
5.2 – Sugestões para Próximos Trabalhos.....	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132

LISTAS DE FIGURAS

Figura 2.1 - Esquema resumido do processo de refino do petróleo bruto com a obtenção de seus derivados.....	6
Figura 2.2 - Localizações das refinarias pertencentes à Petrobrás no Território Brasileiro.....	8
Figura 2.3 - Distribuições das porcentagens de derivados de petróleo da produção nacional em 2006.....	9
Figura 2.4 - Esquema do sistema de distribuição de combustíveis partindo das refinarias.....	14
Figura 2.5 - Evolução da classificação das áreas contaminadas de maio de 2002 a novembro de 2007, no Estado de São Paulo.....	16
Figura 2.6 - Distribuições de registros de contaminações por atividades em novembro de 2007.....	20
Figura 2.7 - Constatações de grupos de contaminantes verificados nos locais contaminados em novembro 2007.....	20
Figura 2.8 - Percentuais de distribuições de áreas contaminadas, quanto ao estágio de remediação em novembro de 2007.....	21
Figura 2.9 - Comparação entre os percentuais de distribuição de áreas contaminadas quanto ao estágio de remediação nos anos de 2006 e 2007.....	21
Figura 2.10 - Técnicas mais empregadas nas remediações implantadas nas áreas contaminadas em novembro de 2007.....	22
Figura 2.11 - Esquema da degradação de uma substância orgânica por um microrganismo.....	34
Figura 2.12 - Rota de degradação de hidrocarbonetos alifáticos.....	38
Figura 2.13 - Rota metabólica de composto aromático: benzeno.....	39
Figura 2.14 - Rota metabólica de composto aromático: tolueno.....	40
Figura 2.15 - Rota metabólica de hidrocarbonetos poliaromáticos: naftaleno..	41
Figura 2.16 - Esquema do planejamento composto central.....	43
Figura 2.17 - Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.....	45
Figura 3.1 - Lagoa mostrando a canaleta e o bocal de descarga do efluente na mesma.....	46

Figura 3.2 - Localização das lagoas de efluente do terminal de combustível na Fazenda Rio das Pedras, de onde foram obtidas as amostras dos solos.....	47
Figura 3.3 - Esquema da unidade experimental empregada nos ensaios de planejamento composto central.....	54
Figura 3.4 - Rotâmetro.....	55
Figura 3.5 - Desenho Esquemático das tubulações de distribuição de ar e de coleta de amostras.....	55
Figura 4.1 - Adaptação das 4 culturas estudadas ao efluente após adição de fertilizantes e extrato de levedo.....	68
Figura 4.2 - Crescimento de biomassa das 4 culturas estudadas durante os 42 dias de processo.....	71
Figura 4.3 - Concentrações de TPH ao longo dos 42 dias de processo, empregando as 4 culturas estudadas.....	73
Figura 4.4 - Remoções de TPH ao longo dos 42 dias de processo, empregando as 4 culturas estudadas.....	73
Figura 4.5 - Resultados da modelagem da cinética de crescimento celular ao longo dos 42 dias de processo, para as 4 culturas estudadas.....	74
Figura 4.6 - Resultados da modelagem da cinética da concentração de TPH durante 42 dias de processo, para as 4 culturas estudadas.....	76
Figura 4.7 - Remoção de TPH para cultura <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145, ao longo dos 14 dias de processo.....	80
Figura 4.8 - Remoção de TPH para cultura C ₁ , ao longo dos 14 dias de processo.....	80
Figura 4.9 - Distribuição dos resíduos relativa à remoção de TPH.....	84
Figura 4.10 - Valores preditos em função dos observados relativos à remoção de TPH.....	85
Figura 4.11 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta remoção de TPH em função da concentração de nitrogênio (X ₁) e concentração de fósforo (X ₂).....	86
Figura 4.12 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta remoção de TPH em função da concentração de nitrogênio (X ₁) e concentração de inóculo (X ₃).....	87

Figura 4.13 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta remoção de TPH em função da concentração de fósforo (X_2) e concentração de inóculo (X_3).....	88
Figura 4.14 - Distribuição dos resíduos relativa à concentração celular.....	90
Figura 4.15 - Valores preditos em função dos observados relativos à concentração celular.....	90
Figura 4.16 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta a variação da concentração de biomassa (ΔC_{bm}) em função da concentração de nitrogênio (X_1) e concentração de fósforo (X_2). ..	91
Figura 4.17 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta variação da concentração de biomassa (ΔC_{bm}) em função da concentração de nitrogênio (X_1) e concentração de inóculo (X_3).....	92
Figura 4.18 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta ΔC_{bm} em função da concentração de fósforo (X_2) e concentração de inóculo (X_3).....	93
Figura 4.19 - Degradação dos hidrocarbonetos identificados para a condição do experimento R15, após 3 dias de processo.....	98
Figura 4.20 - Degradação dos hidrocarbonetos identificados para a condição do experimento $R_{pot\ exp}$, após 3 dias de processo.....	99
Figura 4.21 - Distribuição dos resíduos relativa à remoção de TPH.....	102
Figura 4.22 - Valores preditos em função dos observados relativos à remoção de TPH.....	102
Figura 4.23 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta remoção de TPH em função do intervalo de aeração (X_1) e nível de agitação (X_2).....	103
Figura 4.24 - Distribuição dos resíduos relativa ao aumento de biomassa.....	105
Figura 4.25 - Valores preditos em função dos observados relativos ao aumento de biomassa.....	106
Figura 4.26 - Superfície de resposta e curva de contorno para a concentração de biomassa em função do intervalo de aeração (X_1) e nível de agitação (X_2) nas formas codificadas e reais.....	107
Figura 4.27 - Perfil de pH dos experimentos definidos pela matriz do	

planejamento composto central (experimentos de 1 a 11), durante os 3 dias de processo.....	109
Figura 4.28 - Perfis de queda da concentração de oxigênio dissolvido no reator para as condições do experimento 1, a cada aeração intermitente (12h).....	111
Figura 4.29 - Degradação dos hidrocarbonetos identificados para a condição do experimento R10, após 3 dias de processo.....	115
Figura 4.30 - Degradação dos hidrocarbonetos identificados para a condição do experimento $R_{pot,IA,Vag}$, após 3 dias de processo.....	115
Figura 4.31 - Concentrações e remoções de TPH nas três condições estudadas AC, SA e AI, empregando a cultura mista C_1 , durante 22 dias de processo.....	117
Figura 4.32 - Concentrações de biomassa nas três condições estudadas AC, SA e AI, ao longo dos 22 dias de processo.....	120
Figura 4.33 - Perfil de pH para as condições CA, SA e AI, ao longo dos 22 dias de processo.....	121
Figura 4.34 - Porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos na condição AI após 22 dias de processo.....	124
Figura 4.35 - Porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos identificados na condição AC após 22 dias de processo.....	126
Figura 4.36 - Porcentagem de remoção dos hidrocarbonetos identificados na condição SA após 22 dias de processo.....	127

LISTAS DE TABELAS

Tabela 2.1 - Parâmetros físico-químicos de importância para a mobilidade de hidrocarbonetos.....	10
Tabela 2.2 - Distribuições das áreas contaminadas no Estado de São Paulo por regiões em 2007.....	17
Tabela 2.3 - Distribuições das áreas contaminadas nas unidades de gerenciamento de recursos hídricos – UGRHI, por tipo de atividade em 2007.....	17
Tabela 2.4 - Distribuições das áreas contaminadas nas unidades de gerenciamento de recursos hídricos – UGRHI, por classificação do estado de remediação em 2007.....	19
Tabela 2.5 - Gêneros microbianos hábeis na degradação de hidrocarbonetos de petróleo.....	27
Tabela 3.1 - Composição do meio inorgânico (M ₁) adicionado de extrato de levedo para adaptação prévia.....	48
Tabela 3.2 - Meio de cultivo utilizado no isolamento dos microrganismos.....	49
Tabela 3.3 - Variáveis de processo estudadas no planejamento e os valores de seus respectivos níveis.....	57
Tabela 3.4 - Matriz do planejamento experimental 1.....	58
Tabela 3.5 - Variáveis de processo e os valores dos seus respectivos níveis.....	59
Tabela 3.6 - Matriz do planejamento experimental 2.....	60
Tabela 3.7 - Colunas e condições da cromatografia.....	65
Tabela 4.1 - Caracterização do efluente antes e após a correção nas concentrações de nutrientes (adicionado de fertilizantes e extrato de levedo).....	66
Tabela 4.2 - Relação dos principais hidrocarbonetos identificados pela cromatografia presentes no efluente contaminado.....	67
Tabela 4.3 - Valores dos parâmetros ajustados para cada cultura empregada, segundo os modelos adotados.....	75

Tabela 4.4 - Crescimento celular para as culturas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 e mista C ₁ empregando LCA em várias concentrações e extrato de levedo a 2g/L.....	77
Tabela 4.5 - Resultados de remoções de TPH e crescimento celular, em diferentes condições experimentais de acordo com a matriz do planejamento composto central.....	81
Tabela 4.6 - Resultados da regressão múltipla para remoção de TPH, com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	82
Tabela 4.7 - Resultados da regressão múltipla para remoção de TPH, apresentando apenas as variáveis significantes com seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	83
Tabela 4.8 - Resultados da regressão múltipla para aumento na concentração de biomassa (ΔC_{bm}), apenas com as variáveis significantes e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	89
Tabela 4.9 - Valores das variáveis concentração de nitrogênio (CN), concentração de fósforo (CP) e concentração de inóculo (CI) após otimização.....	93
Tabela 4.10 - Colorações observadas do meio biodegradado nos experimentos do planejamento composto central no final de 3 dias de processo.....	95
Tabela 4.11 - Comparativo dos resultados de remoções de TPH e variações de concentrações de biomassa, nas condições experimentais do ponto central (E15 e E16), do ponto otimizado (E _t).....	96
Tabela 4.12 - Porcentagens de degradações das classes de hidrocarbonetos identificados para as condições experimentais R15 e R _{pot exp} , após 3 dias de processo.....	97
Tabela 4.13 - Resultados de remoções de TPH e biomassa, em diferentes condições experimentais definida pela matriz do planejamento composto central.....	100
Tabela 4.14 - Resultados da regressão múltipla para remoção de TPH, apresentando apenas as variáveis significativas com seus parâmetros e níveis de significância.....	101

Tabela 4.15 - Resultados da regressão múltipla para crescimento de biomassa, apresentando apenas as variáveis significativas com seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	104
Tabela 4.16 - Valores das variáveis intervalo de aeração (IA_e) e velocidade de agitação (VA_g) após otimização.....	108
Tabela 4.17 - Resultados comparativos das respostas variação da concentração de biomassa e remoção de TPH dos experimentos do ponto central e do ponto otimizado.....	112
Tabela 4.18 - Porcentagem de remoção para cada classe de hidrocarbonetos identificados no efluente.....	113
Tabela 4.19 - Porcentagens de remoções das classes de hidrocarbonetos identificados para cada condição operacional estudada ao final de 22 dias de processo.....	122
Tabela 4.20- Porcentagens de degradação dos hidrocarbonetos identificados sob as condições AI, AC e SA, após 22 dias de processo.....	125

LISTAS DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<i>AC</i>	Aeração Constante
<i>AI</i>	Aeração Intermitente
<i>ANP</i>	Agência Nacional de Petróleo
<i>BTEX</i>	Benzeno, tolueno e etilbenzeno
<i>C_I</i>	Cultura Mista
<i>CETESB</i>	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
<i>C:N:P</i>	Relação Carbono:Nitrogênio: Fósforo
<i>CN</i>	Concentração de Nitrogênio
<i>CI</i>	Concentração de Inóculo
<i>CP</i>	Concentração de Fósforo
<i>DBO</i>	Demanda Bioquímica de Oxigênio
<i>DQO</i>	Demanda Química de Oxigênio
<i>GLP</i>	Gás Liquefeito de Petróleo
<i>IA_e</i>	Intervalo de Aeração
<i>K^a_{DW}</i>	Coeficiente de partição octanol-água
<i>LCA</i>	Levedura Cervejeira Autolizada
<i>LGN</i>	Líquido de Gás Natural
<i>MTBE</i>	Composto Metil, Terc-Butil-Éter
<i>-OH</i>	Grupo hidroxila
<i>O_{2d}</i>	Oxigênio Dissolvido
<i>PAHs</i>	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
<i>PCC</i>	Planejamento Composto Central
<i>S</i>	Concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo
<i>SA</i>	Sem Aeração

TOC	Carbono Orgânico Total
TPH	Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
VA_g	Velocidade de Agitação
vvm	Volume por volume de meio
v/v	Relação volume/volume
$Y_{x/s}$	Rendimento do crescimento celular em relação a degradação de TPH
X	Concentração de biomassa

Símbolos Numéricos

X_{-1}	Valor do nível inferior da variável estudada
X_0	Valor do nível central da variável estudada
X_{+1}	Valor do nível superior da variável estudada
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento
R^2	Coefficiente de Correlação
α	Alfa de ortogonalidade
X^*	Parâmetro de crescimento celular estacionário
X_1	Variável estudada 1
X_2	Variável estudada 2
X_3	Variável estudada 3
t	t de student
ρ	Nível de significância
ΔC_{bm}	Aumento na biomassa

RESUMO

O presente trabalho avaliou a capacidade de biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos presentes em efluente contaminado por óleo diesel e gasolina, empregando culturas puras (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* PATC) e mista (C1). Após a adaptação destas culturas ao efluente contaminado (com correção das concentrações de nitrogênio e fósforo) foi realizada a cinética de biodegradação, durante 42 dias de processo. Os resultados da cinética mostraram, que as culturas C1 e as *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 apresentaram maior potencial de biodegradação em relação à resposta remoção de TPH. Visando reduzir os custos operacionais foi realizada a substituição de extrato de levedo por levedura cervejeira residual autolizada (LCA) para as duas culturas selecionadas e os resultados mostraram, que a substituição não proporcionou prejuízos na remoção de TPH. Visando otimizar e verificar a influência das variáveis concentrações de nitrogênio, fósforo e inóculo, na resposta remoção de TPH, foi empregado um planejamento composto central (PCC), utilizando a cultura C1. As concentrações de nutrientes e inóculo otimizadas proporcionaram remoções de TPH de 71,5%, após 3 dias de processo de decomposição. Nesta mesma condição, os resultados cromatográficos mostraram as seguintes frações percentuais de remoção de degradação dos hidrocarbonetos identificados: 87,1 para as parafinas, 77,7 para as isoparafinas, 78,6 para as olefinas, 38,4 para os naftênicos e 71,7 para os aromáticos. Posteriormente, foi realizado o segundo planejamento composto central (PCC), visando otimizar e verificar a influência do intervalo de aeração e do nível de agitação na resposta remoção de TPH. As condições otimizadas proporcionaram remoções de TPH de 75,9%, após 3 dias de processo. Os resultados cromatográficos mostraram os seguintes valores percentuais de degradações das classes de hidrocarbonetos identificados: 91,8 para as parafinas, 83,3 para as isoparafinas, 80,9 para as olefinas, 39,3 para os naftênicos e 80,9 para os aromáticos. Na última etapa do trabalho foi realizado o estudo comparativo do processo de biodegradação do efluente contaminado sob as condições com aeração constante (AC), sem aeração (SA) e aeração intermitente (AI). Os resultados mostraram, que a condição AI apresentou os melhores resultados de remoções de TPH, durante os 22 dias de processo, seguido da condição AC e SA. Para a condição AI foi verificado ao final de 22 dias de processo uma remoção de TPH de 90%. Os resultados cromatográficos ao final do processo mostraram os seguintes valores percentuais de degradação dos hidrocarbonetos identificados: 99,6 para as parafinas, 94 para as isoparafinas, 95,4 para as olefinas, 70,8 para os naftênicos e 83,4 para os aromáticos. Pode-se observar, por meio dos resultados obtidos, que este trabalho conseguiu proporcionar uma evolução no aumento da remoção de TPH, após a otimização das condições operacionais de processo, empregando a cultura mista. Esta evolução, muitas vezes, não é verificada em diversos trabalhos científicos devido, a erros cometidos durante a etapa de adaptação das culturas ao efluente contaminado. Pois, esta etapa é crucial para a seleção dos microrganismos mais resistentes e com maior capacidade metabólica em biodegradar os contaminantes. Por isto, é necessário estabelecer com critério as condições operacionais desta etapa, que será responsável pela sustentação para os estudos subseqüentes.

Palavras-chave: biodegradação de gasolina e óleo diesel, cultura mista, hidrocarbonetos totais de petróleo, aeração intermitente.

ABSTRACT

The present work evaluated the capacity of biodegradation of hydrocarbons present in contaminated effluent for diesel oil and gasoline, using pures (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* PATC) and mixed cultures (C1). After the adaptation of these cultures in contaminated effluent (with correction in the phosphorous and nitrogen concentrations) was accomplished the biodegradation kinetic, during 42 days of process. The results of the kinetics showed, that the cultures C1 and the *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 showed higher biodegradation potential in relation to the answer TPH removal. Aiming to reduce the operational costs was accomplished the substitution of yeast extract for autolyzed brewery yeast (ABY) for the two selected cultures and the results showed, that the substitution didn't provide damages in the TPH removal. Aiming to optimize and to verify the influence of the variables nitrogen, phosphorous and inoculum concentrations in the answer TPH removal, a central composite design was used (CCD), employing the culture C1. The optimized nutrients and inoculum concentrations provided TPH removals of 71,5%, after 3 days of process. In this same condition, the results chromatographic showed the following values of degradation of the identified hydrocarbons, in %: 87,1 for the paraffinics, 77,7 for the isoparaffinics, 78,6 for the olefinics, 38,4 for the naftenics and 71,7 for the aromatics. Later, the second central composite design (CCD) was accomplished, aiming to optimize and to verify the influence of the aeration interval and the agitation level in the answer TPH removal. The optimized conditions provided TPH removal of 75,9%, after 3 days of process. And the chromatographic results showed the following results of degradations of the classes of identified hydrocarbons, in % of : 91,8 for the paraffinics, 83,3 for the isoparaffinics, 80,9 for the olefinics, 39,3 for the naftenics and 80,9 for the aromatics. In the last stage of the work was accomplished the comparative study of the process of biodegradation of the contaminated effluent under the conditions with constant aeration (CA), without aeration (WA) and intermittent aeration (IA). The results showed, that the condition IA presented the best results of TPH removals, during 22 days of process, following by the condition CA and WA. For the condition IA was verified at the end of 22 days of process a TPH removal of 90%. And the results chromatographic after the 22 days of process, showed the following values of degradation of the identified hydrocarbons, in % of: 99,6 for the paraffinics, 94 for the isoparaffinics, 95,4 for the olefinics, 70,8 for the naftenics and 83,4 for the aromatics. Through the obtained results can be observed, that this work got to provide an evolution in the increase of the TPH removal, after the optimization of the process operational conditions, using the mixed culture. This evolution, often, it is not verified in several scientific works, because of the mistakes committed during the adaptation stage of the cultures to the contaminated effluent. After all, this stage is crucial for the selection of the most resistant microorganisms and with larger metabolic capacity to biodegrade the pollutants. For this, is necessary to establish with criterion the operational conditions of this stage, that it will be responsible for the sustentation for the subsequent studies.

Key words: biodegradation of gasoline and diesel oil, mixed culture, total petroleum hydrocarbons, intermittent aeration.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A crescente contaminação do ambiente com substâncias tóxicas e perigosas é um dos maiores problemas enfrentados pelo mundo. Atualmente, a indústria do petróleo tem gerado altas quantidades de derivados, que vem contaminando o ar, solos, rios, mares e águas subterrâneas a partir de derrames rotineiros e acidentais.

Os vazamentos e derrames acidentais são ocorrências freqüentes durante a exploração, produção, o transporte e estocagem de petróleo e seus derivados, gerando contaminações, geralmente, de difícil degradação. Além das contaminações acidentais, a vasta quantidade de lodos de óleo gerado nas refinarias, a partir dos sistemas de separação água e óleo, e o acúmulo de sobra de materiais oleosos, da parte inferior dos tanques de estocagem de óleo cru, é também causa de muitos problemas de contaminação. Geralmente, estes problemas são decorrentes das limitações dos processos padrões de tratamento, já existentes, utilizados para descontaminar solos e água. Isto muitas vezes resulta, em efetividade parcial do tratamento dos locais contaminados, não sendo possível solucionar totalmente o problema (FERRARI, 1996; VASUDEVAM e RAJARAM, 2001).

Devido à grande extensão territorial do Brasil existe uma rede de distribuição de combustíveis através de oleodutos, responsáveis pelo transporte de gasolina e óleo diesel das refinarias até os terminais de combustíveis, que estão localizados em determinados centros urbanos.

Nestes terminais ou bases de distribuição de óleo diesel e gasolina são abastecidos diariamente muitos caminhões tanques, que em sua maioria, podem ser compartimentabilizados, possibilitando o carregamento e transporte de diversos tipos de combustíveis em um mesmo veículo.

Para o transporte dos combustíveis, a partir dos terminais, para outros locais e regiões do país é utilizada a malha rodoviária promovendo a distribuição até consumidores, como postos de combustíveis, grandes centros consumidores e atacadistas. Os terminais de distribuição de combustíveis estão localizados em pontos estratégicos do país, para facilitar o processo de transporte e distribuição de combustíveis de uma região para a outra.

Durante o procedimento de carregamento da carga de combustíveis (óleo diesel e da gasolina) para os caminhões pode ocorrer o derrame de tais produtos no pátio. As águas de lavagens dos pátios e da parte externa dos caminhões geram um efluente contaminado com óleo diesel e gasolina. Por outro lado, efluentes com características semelhantes também podem ser gerados em postos de gasolina e em ocasiões em que acidentalmente águas superficiais são contaminadas por gasolina e óleo diesel.

Vale ressaltar que, efluentes com tais características gerados em terminais de distribuição de combustíveis é típico do Brasil, que adota esse tipo de sistema, onde a primeira etapa do transporte é realizada por meio de oleoduto e a segunda ocorre em caminhões tanques que utilizam a rede rodoviária do país.

De acordo com a Transpetro, dos 11 mil quilômetros de dutos operados pela Empresa, 7 mil são utilizados para o transporte de petróleo, derivados, biocombustível, GLP (gás liquefeito de petróleo), petroquímicos e outros renováveis líquidos e 4 mil quilômetros de gasodutos. Em 2006, os oleodutos transportaram 654 milhões m³/ano de petróleo, derivados e etanol, o que representou um crescimento de 2,2% em relação ao ano anterior (<http://www.transpetro.com.br/portugues/empresa/dutosTerminais/dutosTerminais.shtml>, 2007).

A Petrobras anunciou em dezembro de 2007 o recorde histórico de produção de petróleo de 2.000.238 barris diários, sendo justificado pela operação de mais seis novas plataformas neste mesmo ano, responsáveis pela produção de 590 mil barris diários (<http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2007/12/26/materia.2007-12-6.5628329788/view>).

Os dados apresentados anteriormente mostram a dimensão do sistema (capacidade de produção e armazenamento) da indústria do petróleo no Brasil e os possíveis problemas que esta indústria pode gerar em termos de contaminação do meio ambiente.

O tratamento de áreas contaminadas tem sido heterogêneo nos diferentes Estados do Brasil, mas no Estado de São Paulo, em especial, o modelo técnico de gerenciamento de áreas contaminadas, para solos e águas subterrâneas, adotado com base no modelo desenvolvido pelo órgão ambiental holandês tem sido aplicado. A metodologia holandesa é baseada em critérios científicos, usando a modelagem matemática de avaliação de risco à saúde (MANCINI, 2002).

Em 26 de outubro de 2001, a CETESB publicou o Relatório de Estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo, visando prevenir e controlar a poluição. A primeira lista de valores orientadores contemplou 37 substâncias, dentre elas as frações da gasolina denominadas de BTEX, relacionados aos

compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno. E em dezembro de 2005 a CETESB publicou no Diário Oficial do Estado, a nova lista de valores orientadores agora contemplando 84 substâncias, sendo definidos três valores orientadores para solo e água subterrânea: valor de referência de qualidade (VRQ), valor de prevenção (VP) e valor de intervenção (VI) (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/agua_sub/valores.asp, 2007).

Em casos de contaminações em aquíferos por hidrocarbonetos de petróleo, muitas vezes ocorre o desenvolvimento de populações microbiológicas capazes de degradar estes contaminantes, em condições aeróbias e anaeróbias (CHAPELLE, 1999). Por tal motivo, a diversidade da capacidade metabólica dos microrganismos tem sido explorada pelo homem em diversas formas na biodegradação.

A utilização de culturas puras (bactérias, leveduras ou fungos filamentosos) e mistas nos processos de descontaminação é uma alternativa tecnológica bastante promissora, por muitas vezes ser capaz de proporcionar limpeza ou diminuição da carga poluidora que possa estar presente em solo ou em meio líquido (BIELICKA *et al.*, 2002; PIEDADE *et al.*, 2000; LAKHA *et al.*, 2005; TOWNSEND *et al.*, 2004; GOGOI *et al.*, 2003; GRISHCHENKOV *et al.*, 2000; etc).

Para muitas espécies de bactérias, a capacidade de reduzir ou eliminar a carga poluidora, muitas vezes, está associada ao potencial dos microrganismos em produzir biosurfactantes. As propriedades emulsificantes apresentadas pelos biosurfactantes é equivalente aos surfactantes sintéticos, que facilitam o contato da bactéria com o contaminante a ser biodegradado. Mas com a vantagem de serem mais facilmente biodegradados aumentando o poder de biodegradação final (JOHNSON *et al.*, 2005).

Muitas abordagens científicas têm sido usadas na biodegradação no local da contaminação (*in situ*) ou com a remoção dos contaminantes para o tratamento em outro local (*ex situ*). Nestes casos, a extensão da biodegradação é criticamente dependente de fatores como: fontes de energia, doadores e aceptores de elétrons, nutrientes, pH, temperatura e de fonte de carbono realmente assimilável (BOOPATHY, 2000).

Neste contexto, o objetivo geral desta tese foi estudar a biodegradação de efluentes contendo óleo diesel e gasolina utilizando culturas puras e mista empregando reator em sistema batelada com 5 L de volume útil.

Os objetivos específicos foram:

1- Adaptar a cultura mista C₁ (isolada de solo de lagoa contaminada por derivados de petróleo) e as culturas puras (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* isolada PATC) em efluente contendo óleo diesel e gasolina;

2- Isolar e identificar os microrganismos mais abundantes presentes na cultura mista C₁;

3- Avaliar o comportamento cinético da biodegradação do efluente de terminais de combustíveis, empregando as culturas puras e mistas anteriormente mencionadas;

4- Substituir a adição de extrato de levedo em efluente por levedura cervejeira autolizada (LCA) e selecionar a cultura que promoveu a maior redução de hidrocarbonetos totais de petróleo;

5- Estabelecer as melhores condições de concentração de nutrientes (nitrogênio e fósforo) utilizando fertilizantes a base de nitrato de amônia e superfosfato simples e concentração de inóculo. Para tal foi aplicado planejamento composto central (PCC), em sistema batelada empregando reator com 5L de volume útil;

6- Otimizar o tempo de aeração e o nível de agitação, empregando um planejamento composto central (PCC), em sistema batelada com reatores de 5L de volume útil;

7- Comparar o desempenho da cultura mista sob condições de aeração contínua, sem aeração e com aeração intermitente, nas condições otimizadas de nutrientes, inóculo e agitação.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- O Petróleo

O petróleo é encontrado em camadas geológicas sedimentares, formado graças à decomposição lenta de animais e vegetais soterrados há mais de 10 milhões de anos, e que sofreram no decorrer deste período à ação de microrganismos, calor e pressão (DEL'ARCO e DE FRANÇA, 1999).

O petróleo é considerado uma fonte de energia não renovável, de origem fóssil e é matéria-prima da indústria petrolífera e petroquímica. O petróleo bruto possui em sua composição cadeias de hidrocarbonetos, cujas frações leves formam os gases e as frações pesadas o óleo cru. A distribuição dos percentuais de hidrocarbonetos é que define os diversos tipos de petróleo existentes no mundo (<http://www.ambientebrasil.com.br>, 2005). No Brasil a maior parte do petróleo brasileiro é classificado como óleo pesado (CRAPEZ *et al.*, 2002).

Segundo Parente *et al.* (2004), o Brasil possui a maior área sedimentar da América do Sul, cerca de 6.420.000 km² de bacias sedimentares, dos quais 4.880.000 km² são em terra (*onshore*) e 1.550.000 km² em plataforma continental (*offshore*). Nos últimos anos a PETROBRAS vem investindo em pesquisas e desenvolvimento de novas tecnologias, principalmente na exploração de águas profundas e ultraprofundas. Com isso, a produção brasileira de petróleo vem crescendo a cada dia e despertando o interesse de outras companhias.

A Figura 2.1 mostra um esquema simplificado do processo de refino do petróleo bruto, bem como a obtenção de seus derivados (<http://ciencia.hsw.uol.com.br/refino-de-petroleo5.htm>, 2007).

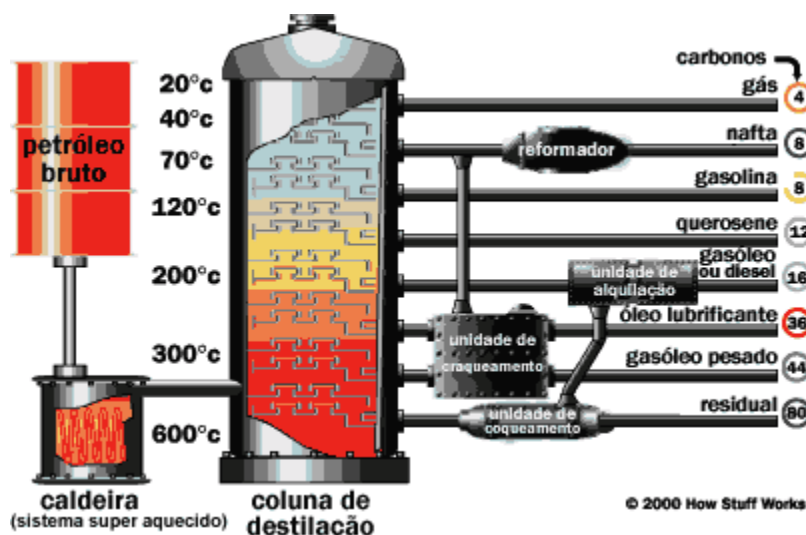


Figura 2.1- Esquema resumido do processo de refino do petróleo bruto com a obtenção de seus derivados.

Durante o processo de produção de petróleo é comum o aparecimento de gás e água associados. A separação dessas fases faz-se necessária, pois o gás apresenta relevante interesse econômico para a indústria, e a água, por apresentar elevado teor de sal em sua composição e formar emulsões com viscosidades superiores à do petróleo desidratado, deve ser removida, pois afeta o dimensionamento do sistema de bombeio e transferência, compromete certas operações de processo nas refinarias, além de representar volume ocioso na transferência e tancagem do petróleo e gerar problemas de incrustação e corrosão nos oleodutos de exportação. Portanto, o objetivo do processamento primário do petróleo é o de separar gás, sob condições controladas, e o de remover água, sais e outras impurezas, suficientemente para torná-lo estável e adequado para ser transferido (RAMALHO, 2000).

Após a etapa inicial do processamento do petróleo descrito anteriormente, inicia-se a sua destilação em uma série de frações caracterizadas pelos intervalos de temperatura e pressão. Além da destilação, numerosos processos de refinaria são utilizados para otimizar a obtenção de certos produtos desejados (http://www.epa.gov/oust/pubs/fpr_c3.pdf, 2003).

2.2- Refinarias no Brasil

Atualmente, o número de refinarias no Brasil passou para um total de 11, todas pertencentes à Petrobrás (Figura 2.2). Este novo quadro foi devido a compra do Grupo Ipiranga pela Petrobras juntamente com a Braskem e a Ultrapar, em março de 2007 e o fechamento da refinaria privada de Manguinhos.

As refinarias estão concentradas na região Sudeste, sendo quatro localizadas em São Paulo, uma no Rio de Janeiro e uma em Minas Gerais. Na Região Sul, está localizada mais três refinaria e no Norte e Nordeste localizam-se outras duas (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Petrobras>, 2008), sendo elas:

1. Refinaria Landulpho Alves (Rlam) - Mataripe, Bahia;
2. Refinaria Presidente Bernardes (RPBC) - Cubatão, São Paulo;
3. Refinaria Duque de Caxias (Reduc) - Campos Elíseos, Rio de Janeiro;
4. Refinaria Gabriel Passos (Regap) - Betim, Minas Gerais;
5. Refinaria Alberto Pasqualini (Refap) - Canoas, Rio Grande do Sul;
6. Refinaria de Paulínia (Replan) - Paulínia, São Paulo;
7. Refinaria de Manaus (Reman) - Manaus, Amazonas;
8. Refinaria de Capuava (Recap) - Mauá, São Paulo;
9. Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar) - Araucária, Paraná;
10. Refinaria Henrique Lage (Revap) - São José dos Campos, São Paulo;
11. Refinaria Ipiranga – Rio Grande, Rio Grande do Sul.

No ano de 2006, a produção nacional diária de petróleo incluindo óleo cru e condensado, (não incluindo LGN (líquido de gás natural)), óleo de xisto, GLP (gás liquefeito de petróleo) e C_5^+ (resultante do processamento de gás e utilizado como base para fabricação de vernizes e tintas) foi de 1,7 milhão b/d (628,8 milhões de barris no ano), tendo elevado-se 5,5% em relação a 2005. Entre 1997 e 2006, houve um crescimento médio anual de 8,3% da produção de petróleo do país. Em 2006, o Brasil manteve-se como o 16º maior produtor mundial de petróleo (incluindo óleo cru, condensado e LGN). A Relação reserva/produção (R/P) passou de 23,2 ano em 1997 para 19,4 ano em 2006. Em média, este índice reduziu-se a uma taxa de 2,0% ao ano nos últimos 10 anos (<http://www.anp.gov.br/doc/anuario2007/Secao2.pdf>, 2007). Em dezembro de 2007 foi divulgado pela Petrobrás o recorde histórico de produção de petróleo de 2.000.238 barris diários. Este resultado alcançado foi possível devido, às seis novas plataformas que entraram em operação neste mesmo ano, responsáveis por 590 mil barris diários (<http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2007/12/26/materia.2007-12-26.5628329788/view>).

Em 2006 as refinarias nacionais apresentaram uma capacidade de armazenamento de 34,9 milhões de barris de petróleo e 6,4 milhões m³ de derivados de petróleo, álcool e MTBE (Metil, Terc-Butil-Éter). Da capacidade total de armazenamento de petróleo, 66,3% situaram-se na Região Sudeste, sendo que as refinarias do Estado de São Paulo concentraram 38,6% do

total nacional. As refinarias com as maiores capacidades de armazenamento de petróleo no Brasil foram a REPLAN (SP), com 18,2% do total nacional, e a REDUC (RJ), com 17,6% (<http://www.anp.gov.br/doc/anuario2007/Secao2.pdf>, 2007).

O Sudeste também foi à região que concentrou a maior capacidade de armazenamento de derivados de petróleo, álcool e MTBE em refinarias, com 71,5% do total, sendo que 43,0% da capacidade brasileira localizava-se no Estado de São Paulo.

As maiores capacidades de armazenamento de derivados de petróleo, álcool e MTBE no Brasil estavam localizadas na REDUC (RJ), 19,6% do total nacional, REPLAN (SP), 17,1%, e REVAP (SP), 16,4% (<http://www.anp.gov.br/doc/anuario2007/Secao2.pdf>, 2007).

Do volume total de derivados produzidos no Brasil em 2006, o óleo diesel participou com 36,4% (38,7 milhões m³) e a gasolina A com 20,1% (21,3 milhões m³). Entre os derivados não-energéticos, destacou-se a nafta, responsável por 8,1% (8,6 milhões m³) da produção total de derivados e por 54,6% da produção de não-energéticos (<http://www.anp.gov.br/doc/anuario2007/Secao2.pdf>, 2007).



Figura 2.2- Localizações das refinarias pertencentes à Petrobrás no Território Brasileiro.

Fonte: (http://www2.petrobras.com.br/Petrobras/portugues/plataforma/pla_campos_petroleo.htm, 2007).

A Figura 2.3 mostra a distribuição dos percentuais de derivados produzidos no Brasil no ano de 2006.

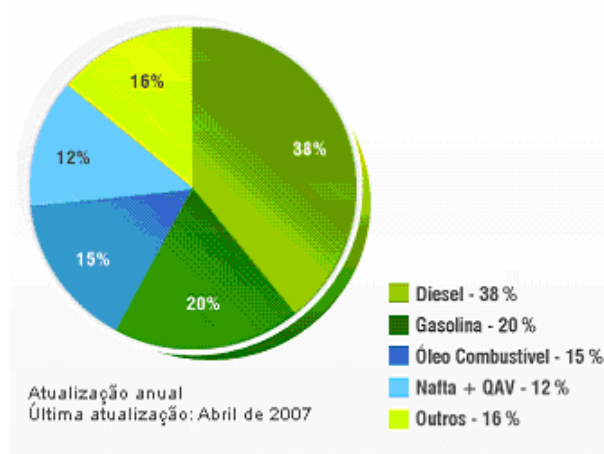


Figura 2.3- Distribuições das porcentagens de derivados de petróleo da produção nacional em 2006.

Fonte:(http://www2.petrobras.com.br/Petrobras/portugues/plataforma/pla_campos_petroleo.htm, 2007).

2.3 - Gasolina

A gasolina é um combustível obtido do refino do petróleo sendo composta, basicamente, por uma mistura de hidrocarbonetos. Os processos de refino utilizados na produção da gasolina compreendem várias etapas. De modo geral, o processo inicial consiste na separação física, denominada destilação. Da destilação aproveita-se a nafta para a produção da gasolina. Dessa mesma destilação obtêm-se várias parcelas, uma delas denominada gasóleo. O gasóleo passa por processo complexo, que modifica a estrutura das moléculas, chamado craqueamento catalítico. Deste processo é obtida uma outra nafta chamada nafta de craqueamento que pode ser adicionada à nafta de destilação para a produção de gasolina (<http://www.br.com.br/portalbr>, 2007).

A gasolina é líquida, volátil, inflamável e constituída quimicamente por uma mistura complexa de mais de 400 hidrocarbonetos. As características e especificações dos componentes da gasolina são regulamentadas pela Agência Nacional de Petróleo (ANP) (<http://www2.petrobras.com.br/espacoconhecer/Produtos/gasolina.asp>, 2007). De acordo com a portaria N.º 309/2001 (anúário da ANP, 2001), as características são: cor, aspecto, massa específica, número de octano motor (MON), número de octano pesquisa (RON), índice antidetonante (IAD), curva de destilação, teor de álcool etílico anidro (AEAC), pressão de vapor, goma atual, teores máximos de enxofre, benzeno, hidrocarbonetos aromáticos e olefinicos (GUIMARÃES *et al.*, 2004).

Os hidrocarbonetos que compõem a gasolina são, em geral, mais "leves" do que aqueles que compõem o óleo diesel, pois são formados por moléculas com menor cadeia carbônica (normalmente cadeias de 4 a 12 átomos de carbono), cuja faixa de destilação varia de 30 a 220°C. Além dos hidrocarbonetos e dos oxigenados, a gasolina contém compostos de enxofre, compostos de nitrogênio e compostos metálicos, todos eles em baixas concentrações (<http://www.br.com.br/portalbr>, 2007).

Com relação à composição os compostos aromáticos (BTEx- benzeno, tolueno etilbenzeno e xileno) perfazem cerca de 10 a 59% da gasolina (massa/massa), enquanto que os hidrocarbonetos alifáticos compreendem 41 a 62%. Os hidrocarbonetos aromáticos são geralmente mais tóxicos que os compostos alifáticos com o mesmo número de carbonos e possuem maior mobilidade em água, em função da sua solubilidade em água ser da ordem de 3 a 5 vezes maior, como mostra a Tabela 2.1 (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

A gasolina pode conter também os antioxidantes que têm como objetivo evitar a formação da chamada “goma”, proveniente da oxidação da fração que permanece aderida às paredes do carburador e válvulas, impedindo um melhor desempenho dos automóveis. Os detergentes e dispersantes utilizados como aditivos diminuem consideravelmente a formação de depósitos no sistema de alimentação, melhorando a “performance” do motor (CUNHA e LEITE, 2000).

A fração BTEx da gasolina é considerada de maior importância no contexto ambiental, uma vez que, estes compostos são solúveis em água em relação aos demais hidrocarbonetos (Tabela 2.1), são tóxicos e legislados. O benzeno é classificado como carcinogênico, enquanto tolueno e xileno são classificados como tóxicos sistêmicos (MEHLMAN, 1990).

Tabela 2.1- Parâmetros físico-químicos de importância para a mobilidade de hidrocarbonetos.

Composto	Solubilidade em água (mg/L) ^a	Log K ^a _{DW}
Benzeno	1760	2,12
Tolueno	532	2,73
Xileno	163-185	2,95-3,26
Nonano	0,122	4,67
Decano	0,021	6,69
Dodecano	0,005	7,24

K^a_{DW}: coeficiente de partição octanol-água. Fonte: TIBURTIUS *et al.*, 2004.

2.4 – Óleo Diesel

O óleo diesel é um produto inflamável, medianamente tóxico, volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico (<http://www2.petrobras.com.br/espacoconhecer/Produtos/diesel.asp>, 2007).

O óleo diesel é um combustível de composição complexa, constituído basicamente por hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos e aromáticos e, em menor quantidade, por substâncias cuja fórmula química contém átomos de enxofre, nitrogênio, metais, oxigênio, etc. Estes hidrocarbonetos são formados por moléculas constituídas de 8 a 40 átomos de carbono, sendo normalmente, mais pesados do que aqueles que compõem a gasolina. O óleo diesel é formulado pela mistura de diversas correntes como gasóleos, nafta pesada, diesel leve e diesel pesado, provenientes das diversas etapas de processamento do petróleo bruto (http://www.refap.com.br/produtos_diesel.asp, 2005). Este produto é uma mistura de correntes de hidrocarbonetos de faixa de destilação entre 150° C e 380° C (<http://www.manguinhosdistribuidora.com.br/index.jsp?categoria=26eproduto=40>, 2007).

O atual modelo energético brasileiro é apoiado entre outros pontos, no transporte de cargas em motores diesel, por via rodoviária, em detrimento do transporte ferroviário, fluvial ou cabotagem. Isso faz com que o óleo diesel seja o derivado propulsor do refino em nosso país, correspondendo a 34% em volume do barril de petróleo. Na maioria dos outros países do mundo, esta demanda situa-se entre 15 e 25% volume do barril de petróleo, sendo a gasolina o produto que comanda o refino, situação mais fácil de atender em função das características dos petróleos e dos esquemas de refino disponíveis mundialmente (<http://www.comciencia.br/reportagens/petroleo/pet05.shtml>, 2005).

As especificações do óleo diesel tipo B e D estão definidas pela Agência Nacional de Petróleo pela Portaria ANP n.º 310 de 27/12/2001 e Regulamento Técnico ANP n.º 06/2001. As especificações do óleo diesel tipo marítimo estão definidas pela Agência Nacional de Petróleo de acordo com a Portaria n.º 32 de 04/08/1997 e Regulamento Técnico DNC n.º 02/1997 (http://www.refap.com.br/produtos_diesel.asp, 2005).

O óleo diesel pode ser classificado, de acordo com sua aplicação, nos seguintes tipos (<http://www.br.com.br/portalbr/calandra.nsf#http://www.br.com.br/portalbr>, 2005):

Óleo diesel automotivo

O óleo diesel automotivo é dividido em subgrupos que permitem sua adequação às necessidades ambientais e dos usuários, sendo eles:

Tipo "B" (Interior): Caracterizado por possuir um teor de enxofre de, no máximo, 0,35%. Disponível para uso em todas as regiões do Brasil, exceto para as principais regiões metropolitanas. Atendendo a determinação da ANP, conforme Portaria nº 310 passou-se a adicionar corante vermelho no óleo diesel automotivo interior (diesel B), comercializado exclusivamente no interior dos estados. O combustível é utilizado em veículos de carga e, em grande escala, na agricultura.

A adição de corante vermelho no diesel B não altera as outras especificações técnicas do produto, nem o seu custo, muda apenas seu aspecto visual que passa a ter coloração avermelhada. O corante é adicionado na proporção de 20 partes por milhão, ou seja, em um milhão de litros de diesel B serão misturados 20 litros de corante.

O objetivo da medida foi evitar que o diesel B fosse utilizado na região metropolitana das Capitais, na qual, segundo Regulamento Técnico do Ministério do Meio Ambiente, deve ser abastecido somente com o óleo diesel automotivo metropolitano, o diesel D, com menor teor de enxofre. A medida visa contribuir para a melhoria da qualidade do ar em áreas com maior concentração populacional (http://www.refap.com.br/produtos_diesel.asp, 2005).

Tipo "D" (máximo 0,2% de enxofre): O óleo diesel Tipo "D" é utilizado nas regiões com as maiores frotas em circulação e condições climáticas adversas à dispersão dos gases, resultantes da combustão do óleo diesel. Nestas regiões tem-se a necessidade de maior controle nas emissões conforme definido no Anexo I do Regulamento Técnico ANP n.º 6/2001 da Portaria ANP n.º 310 de 27/12/2002. Para as demais regiões do país é utilizado o óleo diesel Tipo "B".

Extra diesel aditivado

O extra diesel aditivado é um óleo diesel, que contém um pacote multifuncional de aditivos com objetivo de manter limpo o sistema de alimentação de combustível, reduzir o desgaste dos bicos injetores, reduzir a formação de sedimentos e depósitos, proporcionar

melhor separação da água eventualmente presente no diesel e conferir maior proteção anticorrosiva a todo o sistema de alimentação.

A utilização continuada do extra diesel aditivado garante uma pulverização mais eficaz do combustível na câmara de combustão, permitindo uma mistura mais homogênea do combustível com o ar, melhorando o rendimento do motor, evitando o desperdício de óleo diesel e reduzindo as emissões, contribuindo para uma melhor qualidade do ar.

Diesel de referência (também chamado diesel padrão)

O chamado óleo diesel de referência é produzido especialmente para as companhias montadoras de veículos a diesel, que o utilizam para a homologação de motores nos ensaios de consumo, desempenho e de emissões.

Óleo diesel marítimo

Neste caso, também ocorrem subdivisões de forma a atender a qualidade requerida pelo usuário. São encontrados os seguintes tipos, comercializados no país e/ou destinados à exportação:

Marítimo comercial: Destinado a motores diesel utilizado em embarcações marítimas. Difere do óleo diesel automotivo comercial apenas na necessidade de se especificar a característica de ponto de fulgor relacionada a maior segurança deste produto em embarcações marítimas. Como ponto de fulgor entende-se a menor temperatura que o óleo diesel vaporiza em quantidade suficiente para formar com o ar uma mistura explosiva, capaz de se inflamar momentaneamente, quando sobre ele se incidir uma chama (fonte de ignição). Para o óleo diesel marítimo o ponto de fulgor é fixado em um valor mínimo de 60°C.

Especial para a Marinha / Ártico: Os tipos especiais para a marinha e ártico são produzidos para atender necessidades militares e apresentam maior rigidez quanto às características de ignição, de volatilidade, de escoamento a baixas temperaturas e de teor de enxofre. Isto se deve às condições adversas de sua utilização em embarcações militares que necessitam de rapidez e desempenho em baixas temperaturas (Oceano Ártico, por exemplo).

2.5– Terminais de Distribuição de Combustíveis (Óleo Diesel e Gasolina) no Brasil

O setor de distribuição de combustíveis no Brasil passou por diversas transformações nos últimos anos. A distribuição de combustíveis inicia-se em cada uma das refinarias existentes no país. Os produtos são transferidos e armazenados nas bases de distribuição, onde ocorre o suprimento dos caminhões tanque e mistura com produtos próprios da companhia. Da base de distribuição os produtos seguem para os clientes finais da empresa, como postos de abastecimento, grandes consumidores e atacadistas. A Figura 2.4 ilustra o sistema de distribuição de combustíveis partindo das refinarias (RODRIGUES e SALIBY, 1996).

Uma base de distribuição, de uma maneira simplificada, é composta por tanques para armazenagem de combustíveis e baias para o carregamento dos caminhões-tanque. Os caminhões em sua maioria são compartimentalizados, possibilitando desta forma o carregamento e transporte de diversos tipos de combustíveis e quantidades. Em cada baia de atendimento, existem bicos de carregamento para cada tipo de combustível.

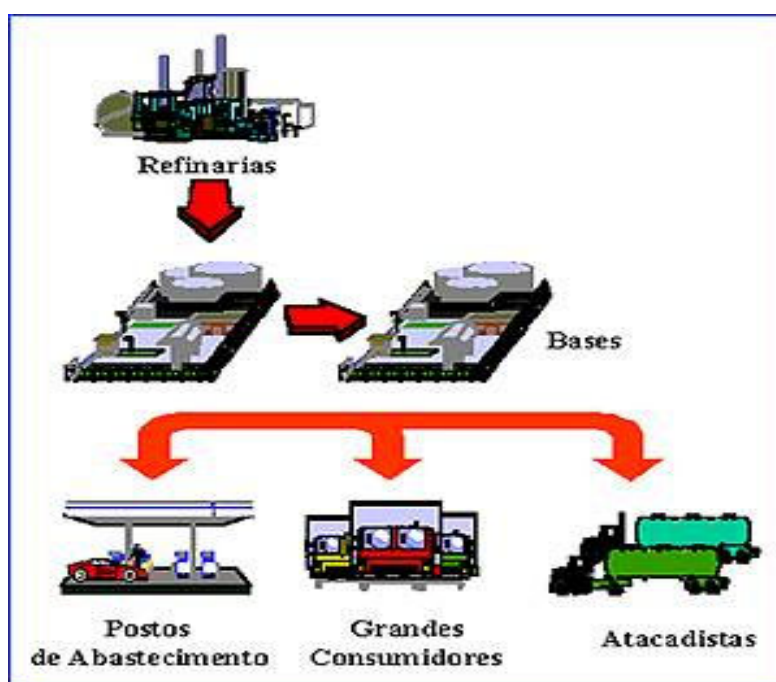


Figura 2.4- Esquema do sistema de distribuição de combustíveis partindo das refinarias.

2.6 – O Gerenciamento de Áreas Contaminadas por Derivados de Petróleo

As informações descritas à seguir foram retiradas dos dados fornecidos pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_07.pdf, 2007).

As ações emergenciais que são adotadas nos acidentes ambientais causados por vazamentos em postos e sistemas de distribuição de combustíveis, bem como as ações pós-emergenciais segundo a CETESB, são medidas técnicas eficientes para eliminar ou diminuir os impactos gerados pela contaminação e os riscos associados a inflamabilidade dos combustíveis automotivos vazados, as quais devem estar previamente determinadas em planos de intervenção, elaborados para tais episódios. Essas ações são desencadeadas e implementadas pelos órgãos públicos envolvidos, nos primeiros momentos do atendimento. A responsabilidade pela realização das medidas necessárias à eliminação dos riscos é imputada ao agente causador da contaminação sob a orientação e coordenação do órgão ambiental e do corpo de bombeiros sempre considerado os seguintes aspectos:

- porte do vazamento;
- produto vazado;
- características do cenário;
- uso e ocupação das áreas afetadas.

Em maio de 2002, a CETESB divulgou pela primeira vez a lista de áreas contaminadas, registrando a existência de 255 áreas contaminadas no Estado de São Paulo. O registro das áreas contaminadas vem sendo constantemente atualizado e, após 7 atualizações (outubro de 2003, novembro de 2004, maio de 2005, novembro de 2005, maio de 2006, novembro de 2006, novembro de 2007), o número de áreas contaminadas totalizou, em novembro de 2007, em 2.272 áreas. A Figura 2.5 apresenta a evolução do número de áreas contaminadas no Estado de São Paulo cadastradas e a evolução da classificação obtida em função do gerenciamento efetuado pela CETESB (contaminada sem proposta de remediação, contaminada com proposta de remediação, remediação em andamento e remediação concluída).

Destaca-se, que essas classificações começaram a ser publicadas a partir de 2004. O aumento no número de áreas contaminadas apresentadas nesta atualização demonstra o esforço na identificação de novas áreas, passando de 1.822 para 2.272 o número das mesmas registradas (aumento de 25%). Além disso, destaca-se o aumento na implementação de medidas de remediação, em que o número de áreas com remediação em andamento, passou de 682 para 884 (aumento de 30%) e o número de remediações concluídas aumentou de 46 para 94 (aumento de 104%).

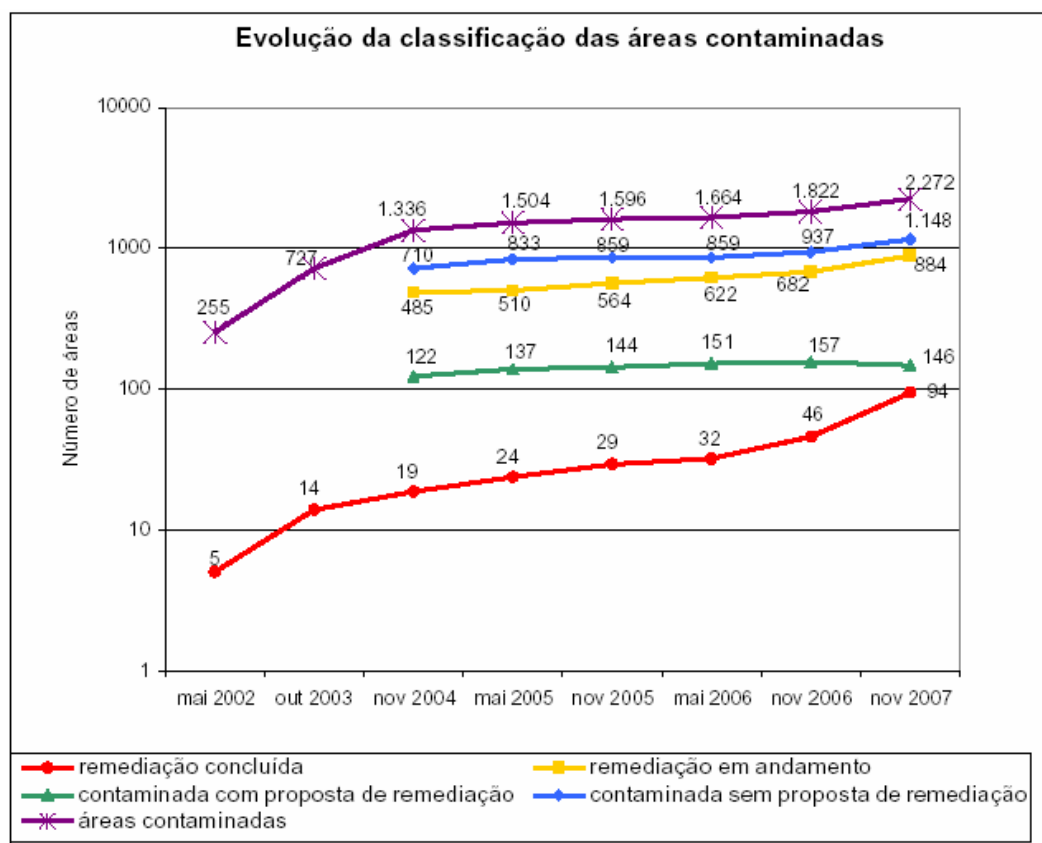


Figura 2.5- Evolução da classificação das áreas contaminadas de maio de 2002 a novembro de 2007, no Estado de São Paulo.

* Fonte: (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_07.pdf, 2007).

A Tabela 2.2 apresenta a distribuição destas áreas contaminadas por regiões no Estado de São Paulo. Para a distribuição destas áreas contaminadas, foram consideradas as seguintes regiões:

- São Paulo: Capital do Estado;
- RMSP - outros: 38 municípios da Região Metropolitana de São Paulo, excluindo-se a Capital;
- Litoral: municípios do Litoral Sul, Baixada Santista, Litoral Norte e Vale do Ribeira;
- Vale do Paraíba: municípios do Vale do Paraíba e da Mantiqueira;
- Interior: Os municípios não relacionados anteriormente.

As Tabelas 2.3 e 2.4 mostram a distribuição das áreas contaminadas nas unidades de gerenciamento de recursos hídricos – UGRHI, por tipo de atividade e por classificação.

Tabela 2.2 – Distribuições das áreas contaminadas no Estado de São Paulo por regiões em 2007.

Região/ Atividade	Comercial	Industrial	Resíduos	Postos de Combustíveis	Acidentes/ Desconhecidas	Total
São Paulo	32	66	22	621	2	743
RMSP- outros	17	87	12	322	4	442
Interior	49	110	23	591	13	786
Litoral	14	32	12	93	2	153
Vale do Paraíba	2	27	0	118	1	148
Total	114	322	69	1745	22	2272

* Fonte: (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_07.pdf, 2007).

Pode-se observar pela Tabela 2.3 e Figura 2.6, que os postos de combustíveis destacam-se na lista de novembro de 2007, com 1.745 registros (77% do total), seguidos das atividades industriais com 322 (14%), das atividades comerciais com 114 (5%), das instalações para destinação de resíduos com 69 (3%) e dos casos de acidentes e fonte de contaminação de origem desconhecida com 22 (1%).

Resta salientar, que o aumento constante do número de áreas contaminadas é devido à ação rotineira de fiscalização e licenciamento sobre os postos de combustíveis, as fontes industriais, comerciais, de tratamento e disposição de resíduos e ao atendimento aos casos de acidentes.

Tabela 2.3- Distribuições das áreas contaminadas nas unidades de gerenciamento de recursos hídricos – UGRHI, por tipo de atividade em 2007, no Estado de São Paulo.

Atividades						
UGRHI	Comercial	Industrial	Resíduos	Postos de Combust.	Acidentes/ Desconhecidas	Total
Mantiqueira	0	0	0	7	1	8
Paraíba do Sul	2	28	1	113	1	145
Litoral Norte	0	0	0	40	2	42
Pardo	1	0	0	18	0	19
Piracicaba/ Capivari/ Jundiaí	24	64	17	244	3	352
Alto Tietê	49	151	33	937	5	1175
Baixada Santista	14	28	12	45	0	99

(continua)

(continuação)

Sapucaí/Grande	0	0	1	19	0	20
Mogi Guaçu	3	3	0	25	1	32
Sorocaba/Médio Tietê	2	21	3	61	5	92
Ribeira de Iguape/Litoral Sul	0	5	0	11	0	16
Baixo Pardo/Grande	0	0	0	25	0	25
Tietê/Jacaré	4	8	1	44	2	59
Alto Paranapanema	1	0	0	13	0	14
Turvo/Grande	6	4	0	58	1	69
Tietê/Batalha	1	3	0	17	0	21
Médio Paranapanema	4	1	0	13	1	19
São José dos Dourados	0	0	0	9	0	9
Baixo Tietê	1	1	0	20	0	22
Aguapeí	0	0	0	7	0	7
Peixe	1	2	0	8	0	11
Pontal do Paranapanema	1	3	1	11	0	16
Total	114	322	69	1745	22	2272

* UGRHI- unidades de gerenciamento de recursos hídricos.

* Fonte: (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_07.pdf, 2007).

A contribuição de 77% do número total de áreas contaminadas registradas atribuídas aos postos de combustíveis é resultado do desenvolvimento do programa de licenciamento ambiental que se iniciou em 2001, com a publicação da Resolução CONAMA N° 273 de 2000. No atendimento à Resolução e contando com o apoio e sugestões da Câmara Ambiental do Comércio de Derivados de Petróleo, fórum que congrega técnicos da CETESB e representantes do setor de combustíveis, da indústria de equipamentos e das empresas de consultoria ambiental, a CETESB desenvolveu e vem conduzindo esse programa, que dentre outras ações, exige a realização de investigação confirmatória, com o objetivo de verificar a situação ambiental do empreendimento a ser licenciado, bem como a realização da troca dos equipamentos com mais de 15 anos de operação.

Os principais grupos de contaminantes encontrados nas áreas contaminadas foram: solventes aromáticos, combustíveis líquidos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), metais e solventes halogenados, conforme pode ser observado na Figura 2.7.

Tabela 2.4 - Distribuições das áreas contaminadas nas unidades de gerenciamento de recursos hídricos – UGRHI, por classificação do estado de remediação em 2007, no Estado de São Paulo.

Classificação					
UGRHI	Remediação Concluída	Remediação em Andamento	Contaminada com Proposta de Remediação	Contaminada sem Proposta de Remediação	Total
Mantiqueira	0	2	0	6	8
Paraíba do Sul	5	49	6	85	145
Litoral Norte	3	19	1	19	42
Pardo	3	5	1	10	19
Piracicaba/ Capivari/ Jundiaí	8	98	27	219	352
Alto Tietê	46	523	77	529	1175
Baixada Santista	6	53	10	30	99
Sapucaí/ Grande	0	5	1	14	20
Mogi Guaçu	3	8	5	16	32
Sorocaba/ Médio Tietê	8	29	1	54	92
Ribeira de Iguape/Litoral Sul	0	6	3	7	16
Baixo Pardo/Grande	0	7	0	18	25
Tietê/Jacaré	0	16	6	37	59
Alto Paranapanema	0	3	1	10	14
Turvo/Grande	5	28	2	34	69
Tietê/Batalha	0	3	2	16	21
Médio Paranapanema	4	8	2	5	19
São José dos Dourados	0	2	0	7	9
Baixo Tietê	0	7	0	15	22
Aguapeí	1	0	0	6	7
Peixe	1	3	0	7	11
Pontal do Paranapanema	1	10	1	4	16
Total	94	884	146	1148	2272

* UGRHI- unidades de gerenciamento de recursos hídricos.

* Fonte: (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_07.pdf, 2007).

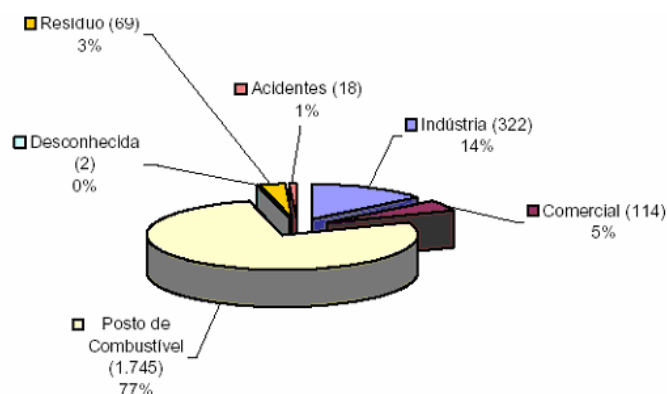


Figura 2.6- Distribuições de registros de contaminações por atividades em novembro de 2007.

* Fonte: (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_07.pdf, 2007).

A Figura 2.8 mostra a distribuição destas áreas quanto ao estágio de remediação para todas as atividades listadas anteriormente.

Com intuito de intensificar o gerenciamento de áreas contaminadas e agilizar a implementação das medidas de intervenção foi criado um grupo de trabalho com o objetivo de revisar e introduzir novas linhas de atuação. O novo procedimento foi consolidado pela diretoria da CETESB por meio da Decisão de Diretoria 103/C/E de 22 de julho de 2007. Após estas determinações foi observado um aumento considerável na implementação de medidas de remediação no ano de 2007 em relação a 2006, como pode ser observado na Figura 2.9.

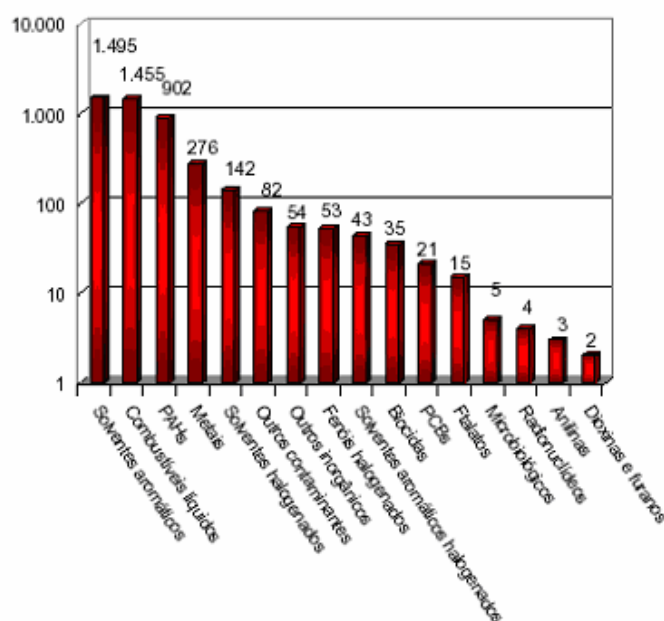


Figura 2.7- Constatações de grupos de contaminantes verificados nos locais contaminados em novembro 2007.

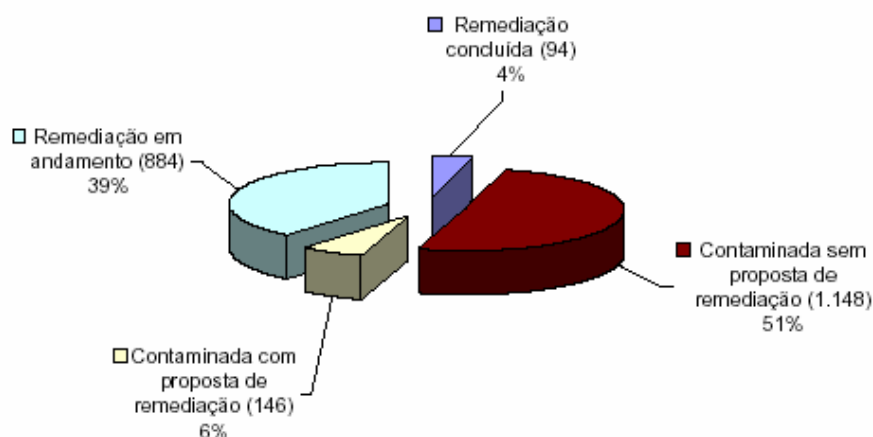


Figura 2.8- Percentuais de distribuições de áreas contaminadas, quanto ao estágio de remediação em novembro de 2007.

* Fonte: (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_07.pdf, 2007).

Nas áreas que se encontram em remediação ou em que a remediação foi finalizada, verifica-se que o bombeamento e tratamento, a recuperação de fase livre e extração multifásica foram às técnicas mais empregadas no tratamento das águas subterrâneas, enquanto que a extração de vapores e a remoção de solo/resíduo, destacam-se como as técnicas mais utilizadas para os solos. As demais técnicas empregadas podem ser visualizadas na Figura 2.10.

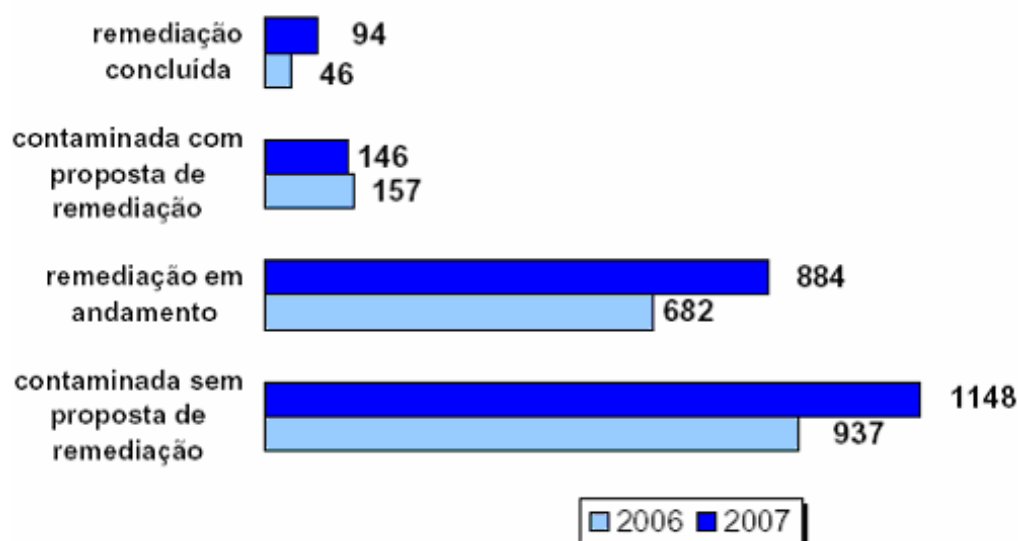


Figura 2.9- Comparação entre os percentuais de distribuição de áreas contaminadas quanto ao estágio de remediação nos anos de 2006 e 2007.

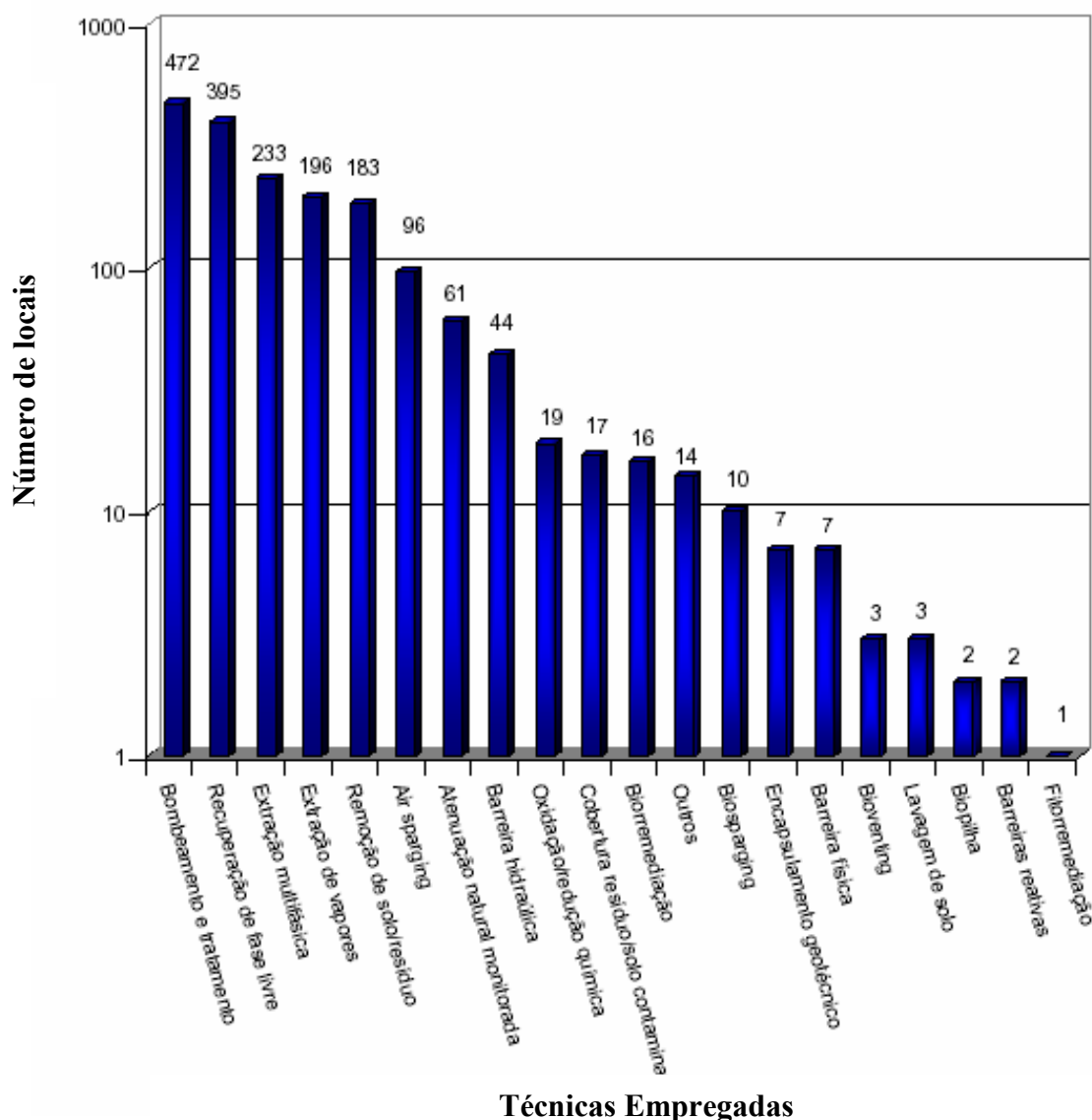


Figura 2.10- Técnicas mais empregadas nas remediações implantadas nas áreas contaminadas em novembro de 2007.

* Fonte: (http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_07.pdf, 2007).

2.7 – Algumas Técnicas de Tratamento de Áreas Contaminadas

Métodos de Descontaminações

Inúmeras técnicas para remediação de áreas contaminadas, vêm sendo utilizadas para diferentes tipos de contaminantes. Para solos contaminados por hidrocarbonetos aplicam-se principalmente as seguintes técnicas: extração de vapor do solo - soil vapor extraction (SVE), biorremediação, bioventing, biosparging, biopilhas, atenuação natural, multiphase extraction (MP). Em relação aos aquíferos contaminados empregam-se geralmente as técnicas: air

sparging, biorremediação, atenuação natural, air stripping. A seguir serão abordadas apenas as definições referentes às técnicas empregadas no tratamento de aquíferos contaminados.

a) Air Sparging:

Princípio do Sistema

A técnica utiliza a injeção de ar na água subterrânea (zona saturada) e sempre devem estar associadas a uma extração de vapores, com objetivo de evitar que o aumento do fluxo de ar na zona saturada gere a migração de vapores para ambientes acima do solo.

O *air sparging* introduz ar no aquífero contaminado produzindo borbulhamento da água subterrânea e volatilização. O *biosparging* injeta ar em menor quantidade, produzindo a volatilização dos compostos em menor escala. O principal objetivo é aumentar a biodegradação dos hidrocarbonetos dissolvidos na água subterrânea pelo incremento da população de microorganismos aeróbios que resulta do aumento da concentração de oxigênio dissolvido (MOERI *et al.*, 2004).

b) Biorremediação:

A biorremediação tem sido relatada em ser uma remediação alternativa economicamente atrativa para águas subterrâneas contaminadas por hidrocarbonetos e também é aplicada no tratamento de solos. A biodegradação implica na quebra de orgânicos solúveis e biodegradáveis por microrganismos naturais na presença de nutrientes e aceptores de elétrons disponíveis. Neste processo, os orgânicos dissolvidos atuam como substrato enquanto a energia derivada da atividade bioquímica é usada pelos microrganismos para sobrevivência (KALUARACHCHI *et al.*, 2000).

Os microrganismos podem ingerir e digerir as substâncias orgânicas transformando-as principalmente em dióxido de carbono e água quando há conversão total do contaminante. O desenvolvimento desses microrganismos e consequentemente a eficiência do sistema são função da temperatura, quantidade e qualidade de nutrientes e oxigênio. Diferentes microrganismos podem degradar diferentes substâncias.

A biorremediação pode ser classificada em duas grandes categorias: *in situ* e *ex situ*. Nas remediações *in situ*, o tratamento do solo ou da água subterrânea contaminada é feito no próprio local. São mais eficazes em solos permeáveis, como os arenosos. As medidas biocorretivas *ex situ* consistem em escavar o solo contaminado ou extrair a água subterrânea

por bomba para aplicar o tratamento em outro local. Apresentam uma maior versatilidade para o tratamento de grande número de contaminantes e tipos de solo (http://www.tecnohidro.com.br/tecnologia_02.htm, 2005).

c) Atenuação Natural:

No processo de atenuação natural, processos de subsuperfície como diluição, volatilização, biodegradação, adsorção e reações químicas com os materiais presentes em subsuperfície, permitem reduzir a concentração dos contaminantes a níveis aceitáveis de maneira natural. A atenuação natural não é uma tecnologia que age sozinha, sem monitoramento ou acompanhamento. Suas considerações requerem modelagem da evolução dos contaminantes, taxas de degradação e refinamento dos modelos de exposição.

O princípio é demonstrar que os processos naturais podem degradar os contaminantes, reduzindo suas concentrações a níveis aceitáveis. Amostragens e análises químicas devem ser realizadas durante o processo, para se confirmar se a taxa de degradação está condizente com as metas de remediação.

A atenuação natural não é uma “não ação”, embora seja freqüentemente encarada como se fosse. Esta é largamente utilizada em outros países; deve ser utilizada para se determinar concentrações e tempos de remediação. É necessária uma extensa caracterização da área.

São informações necessárias os dados de solo e água subterrânea; distribuição tri-dimensional da fase livre e residual dos contaminantes, que pode ser usada para definir a extensão da pluma dissolvida; dados geoquímicos do solo e água subterrânea e as características químicas dos contaminantes (http://www.tecnohidro.com.br/tecnologia_02.htm, 2005).

d) Air Stripping:

Air Stripping é um processo físico de transferência de massa considerado como uma boa tecnologia disponível para tratar muitos compostos orgânicos voláteis (VOC's) presentes na água subterrânea contaminada. O sistema utiliza ar relativamente limpo para remover VOC's dissolvidos na água transferindo-os para a fase gasosa. Uma configuração convencional de *Air Stripping* utilizado no tratamento de água subterrânea é a coluna de *stripping*. Nesta configuração a água subterrânea contaminada é bombeada para o topo de uma coluna e, simultaneamente, ar limpo é soprado na base da mesma. O fluxo de ar locado na base da

coluna sobe por anéis que promovem o *stripping* no interior da coluna (http://www.tecnohidro.com.br/tecnologia_02.htm, 2005).

Resta salientar, que poucos processos abióticos mineralizam compostos orgânicos complexos, entretanto, transformações físico-químicas podem ocorrer sinergeticamente com as transformações bioquímicas aumentando desta maneira as taxas de degradação.

2.8- Microrganismos Envolvidos no Processo de Biodegradação

A capacidade microbiana em degradar alguns compostos orgânicos também ocorre em locais contaminados, mesmo que os componentes sejam completamente xenobióticos (difícil degradação) e nenhuma rota metabólica de degradação natural exista. Existem, pelo menos, duas rotas naturais principais que resultam em microrganismos capazes de degradar um ou mais compostos orgânicos em um determinado local (ROMANTSCHUK *et al.*, 2002):

1) A microbiota nativa se expõe ao contaminante xenobiótico por um longo período, suficiente para a evolução genética criar a rota metabólica de degradação do composto. Este tipo de evolução acontece constantemente, porém, é relativamente lenta. Como consequência, a degradação pode ser ineficiente por causa do baixo número celular ou pelo baixo nível de atividade microbiana inicial;

2) A microbiota nativa, a qual está adaptada às condições locais, é exposta ao contaminante xenobiótico. Esta população adquire genes e rotas de degradação de microrganismos advindos de outro local. Nestes casos, pode ocorrer a transferência de material genético por conjugação, transdução ou transformação. Todos estes processos ocorrem nos ambientes naturais, porém também são relativamente lentos.

2.8.1 - Microrganismos Degradadores de Hidrocarbonetos

Desde 1895 tem sido relatada a degradação microbiana de hidrocarbonetos, quando Miyoshi mostrou que ocorria a assimilação de parafinas por microrganismos. Em 1905, Shongen e Kaserer detectaram quase simultaneamente, que ocorria o consumo de metano por seres microscópicos (BROWN, 1987; PRINCE e SAMBASIVAM, 1993).

Em solo e em água contaminados por hidrocarbonetos são encontrados muitos microrganismos hábeis na degradação destes compostos, sendo na maioria dos casos, os grandes responsáveis pelo desaparecimento destes nos sítios contaminados (BIELICKA *et al.*,

2002; PIEDADE *et al.*, 2000; LAKHA *et al.*, 2005; TOWNSEND *et al.*, 2004; GOGOI *et al.*, 2003; GRISHCHENKOV *et al.*, 2000; GRUIZ e KRISTON, 1996).

Apesar das bactérias serem provavelmente as maiores responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos no ambiente, os fungos filamentosos e as leveduras (OUDOT *et al.*, 1987; MACGILLIVARY e SHIARIS, 1993), as cianobactérias, as algas e mesmo os protozoários também apresentam capacidade de degradação (CERNIGLIA e GIBSON, 1979).

Venkateswaram e Harayama (1995), pelo enriquecimento de culturas, isolaram uma população bacteriana capaz de degradar petróleo bruto verificando, que 28-51% da fração saturada e 0-18% da fração aromática presentes foram biodegradadas por uma cultura mista. Contudo, quando as culturas foram colocadas puras, nenhuma delas apresentaram melhor degradação do que quando estavam consorciadas. As espécies isoladas foram *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas vesicularis*, *Pseudomonas diminuta*, *Moraxella sp.*, *Sphingobacterium sp.* e *Ochrobactrum sp.*.

A fração denominada de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), que é considerada um dos grandes problemas de contaminação advindos da gasolina, é relatado na literatura como compostos capazes de serem consumidos por microrganismos desde 1908, quando Stormer isolou a bactéria *Bacillus hexabovorum* por sua capacidade de crescimento em condições aeróbias na presença de tolueno e xileno (MOERI *et al.*, 2004).

Lehtomaki e Niemela (1975) avaliaram a biodegradação de hidrocarbonetos no solo proveniente de um derramamento accidental, pela adição de bactérias e leveduras, e demonstraram que as leveduras, em diferentes estágios de atividade, proporcionaram nutrientes para a cometabolização de óleo no solo.

Zobell em seu estudo relacionou mais de 100 espécies representativas de 30 gêneros de bactérias, fungos filamentosos e leveduras capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo (ATLAS, 1981).

Segundo Leahy e Colwell (1990), os hidrocarbonetos no ambiente são degradados primeiramente pela comunidade de bactérias e fungos. Em ambiente marinho, as bactérias são os microrganismos de maior capacidade degradativa. Neste ambiente, os fungos são menos abundantes, aumentando sua população em regiões próximas à costa, praias e pântanos.

Os fungos são considerados, por vezes, mais eficientes na degradação de hidrocarbonetos, em condições extremas de pH, deficiência de água e limitação de nutrientes, características freqüentemente encontradas em solos. Estudos demonstraram que os gêneros isolados mais comuns são *Penicillium* e *Verticillium* (ATLAS, 1984).

Segundo Davies e Westlake (1978), a degradação de vários hidrocarbonetos se torna possível com a utilização de culturas mistas, sugerindo a cooperação de bactérias e leveduras na degradação do óleo cru.

Para Leblanc e Fitzgerald (1990), as bactérias executam melhor a degradação de hidrocarbonetos quando se encontram em culturas mistas. O consórcio proporciona ou promove a degradação e até mesmo a mineralização de substâncias compostas de uma grande variedade de hidrocarbonetos, o que segundo Robinson *et al.* (1990), não seria possível com a utilização de uma cultura pura.

Em uma cultura mista, o produto metabólico pode ser degradado por uma outra espécie e o ataque de outros microrganismos pode levar a uma completa degradação do produto, mesmo que dentro da comunidade não exista um microrganismo capaz de degradá-lo totalmente (KATAOKA, 2001).

Deste modo, estudos realizados com cultura mista possuem vantagens sobre estudos realizados com cultura pura. A primeira e mais importante é que a capacidade biodegradativa de uma comunidade é muito maior quantitativa e qualitativamente. Segundo, a resistência da comunidade as substâncias tóxicas pode ser muito maior porque há uma maior probabilidade de que um organismo que possa detoxificá-las esteja presente, e finalmente, o fato de que a mineralização de compostos xenobióticos algumas vezes requer a união da atividade de múltiplas enzimas (GRADY, 1985).

A Tabela 2.5 apresenta os principais gêneros microbianos potencialmente degradadores de hidrocarbonetos.

Tabela 2.5 - Gêneros microbianos hábeis na degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

Bactérias		Fungos		
		Filamentosos		Leveduras
<i>Achromobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Lulworthia</i>	<i>Candida</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Shingomonas</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Mortierella</i>	<i>Debaryomyces</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Spirillum</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Beauveria</i>	<i>Oxyuris</i>	<i>Sporobolomyces</i>
<i>Arthobacter</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Paecilomyces</i>	
<i>Bacillus</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Ceriporiopsis</i>	<i>Penicilium</i>	
<i>Brevibacterium</i>		<i>Chrysosporium</i>	<i>Phialophora</i>	
<i>Burkholderia</i>		<i>Cladosporium</i>	<i>Phoma</i>	
<i>Chromobacterium</i>		<i>Cochliobolus</i>	<i>Pleurotus</i>	
<i>Comamonas</i>		<i>Colorospora</i>	<i>Rhizopus</i>	
<i>Corynebacterium</i>		<i>Coniothyrium</i>	<i>Scolecobasidium</i>	
<i>Cytophaga</i>		<i>Corioliopsis</i>	<i>Scopulariopsis</i>	

(continua)

(continuação)

<i>Flavobacterium</i>		<i>Cryphonectria</i>	<i>Spicaria</i>	
<i>Gluconobacter</i>		<i>Cylindrocarpon</i>	<i>Sprotrichum</i>	
<i>Micrococcus</i>		<i>Dendryphiella</i>	<i>Tolypocladium</i>	
<i>Mycobacterium</i>		<i>Drechslera</i>	<i>Trametes</i>	
<i>Nocardia</i>		<i>Fusarium</i>	<i>Trichoderma</i>	
<i>Pasteurekka</i>		<i>Geotrichum</i>	<i>Varicosporina</i>	
<i>Proteus</i>		<i>Glicocladium</i>	<i>Verticillium</i>	
<i>Pseudomonas</i>		<i>Gongronella</i>		
<i>Rhodococcus</i>		<i>Graphium</i>		
<i>Sarcina</i>		<i>Humicola</i>		

Fonte: TRINDADE (2002), DEL'ARCO e DE FRANÇA (1999) e CRAVO JR. (1998).

2.8.2 – Produção de Biosurfactantes

O crescimento celular na presença de hidrocarbonetos é frequentemente acompanhado pela emulsificação da fonte insolúvel de carbono na fase aquosa (REDDY *et al.*, 1982). Em alguns casos, isto é devido à indução da síntese de agentes emulsionantes extracelulares destinados à quebra dos hidrocarbonetos (ILORI *et al.*, 2005). Estes agentes emulsionantes são denominados de biosurfactantes.

Os biosurfactantes, surfactantes microbianos são moléculas anfipáticas, produzidas por ampla variedade de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Tem como principal propriedade a capacidade de diminuir a tensão superficial e promover a emulsificação de líquidos imiscíveis. Os microrganismos com tal capacidade produzem as moléculas de biosurfactantes utilizando vários substratos incluindo açúcares, hidrocarbonetos e resíduos agroindustriais (NITSCHKE e PASTORE, 2002; MESQUITA, 2004).

A emulsão de compostos como água e óleo, que normalmente não acontece, devido à alta tensão de superfície da água é facilitada pela molécula do biosurfactante apresentar duas partes, uma com afinidade por água e outra por óleo, e a superfície da bactéria se altera com a produção dessa substância, facilitando a aderência ao hidrocarboneto sem danificar a membrana. Além disto, o biosurfactante tem a capacidade de estabilizar a gota de óleo emulsificada, aumentando a área exposta a este. Uma vez aderidas ao óleo através do biosurfactante, as bactérias podem formar emulsões muito pequenas na membrana externa ou consumir o poluente. Além do emprego para a recuperação ambiental, os biosurfactantes são utilizados na retirada de metais pesados do ambiente, na perfuração e a exploração de poços de petróleo, na manipulação e transporte de combustíveis e em várias indústrias (alimentos, medicamentos, cosméticos, materiais de construção e outras) para formação e estabilização de

emulsão e como detergente, dispersante, umectante, espumante e antiespumantes (KREPSKY *et al.*, 2006).

2.9- Fatores que Afetam o Processo de Biodegradação

Para que as condições ambientais favoreçam a atuação dos microrganismos, deve existir uma boa interação do contaminante com a biomassa e para que possa haver uma maior taxa de degradação destes contaminantes as limitações metabólicas devem ser mínimas. A seguir serão descritos os principais fatores que afetam o processo de biodegradação de hidrocarbonetos em ambientes contaminados.

2.9.1- Condições de Processo

Para a sobrevivência e crescimento microbiano as condições de processo são de fundamental importância. Se as condições de temperatura, adaptação à fonte de carbono, concentração celular do inóculo, pH, nutrientes, oxigênio e concentração de hidrocarbonetos/solubilidade não são adequadas, o crescimento e a sobrevivência microbiana serão afetados de modo adverso. Consequentemente, a biodegradação pode não ocorrer em taxa ótima.

a) Temperatura

A temperatura tem uma grande influência no crescimento dos microrganismos, uma vez que todos os processos de crescimento são dependentes de reações químicas que são afetadas pela temperatura. A temperatura no interior da célula de um microrganismo é determinada pelo ambiente externo, pois estes não possuem meios de controle de temperatura interna (ALEXANDER, 1996).

Temperaturas baixas reduzem a fluidez e permeabilidade da membrana celular, o que inibe a assimilação de nutrientes e contaminantes. Temperaturas altas estão associadas a atividades enzimáticas mais altas e a taxas de biodegradação mais rápidas, até um ponto ótimo que é específico de cada espécie (MOERI *et al.*, 2004). Os microrganismos psicrófilos crescem melhor temperaturas de 15 a 25 °C, embora possam crescer em temperaturas mais baixas. Os mesófilos, que são a maioria dos microrganismos, crescem melhor em

temperaturas que variam de 25 a 40 °C. Os termófilos crescem a temperaturas em torno de 40 a 85 °C, mas eles crescem melhor entre 50 e 60 °C (PELCZAR *et al.*, 1996).

No caso da gasolina, altas temperaturas provocam primeiramente, eliminação dos componentes mais voláteis por evaporação. Para o óleo a baixas temperaturas a viscosidade do mesmo aumenta e a volatilização das cadeias curtas de alcanos é reduzida, o que causa retardamento dos processos de biorremediação (ATLAS e BARTHA, 1972).

O fato de as taxas de biodegradação diminuírem com o decréscimo da temperatura é também explicado pelo decréscimo das taxas de atividade enzimática. O aumento da temperatura provoca um aumento das taxas de metabolização dos hidrocarbonetos até o máximo de 30-40°C (BOSSERT e BARTHA, 1984). Acima da temperatura de 41°C as taxas de metabolização de hidrocarbonetos normalmente são diminuídas, o que pode ser causado pela inativação de enzimas envolvidas no processo, além de ocorrer à eliminação dos compostos mais voláteis por evaporação (LAPINSKAS, 1989).

b) Adaptação à fonte de carbono

Está bem estabelecido que a etapa de adaptação contribui significativamente na boa performance de comunidades microbianas em degradar hidrocarbonetos, sendo esta etapa extremamente importante nos processos de biodegradação (VIEIRA *et al.*, 2007).

Os três mecanismos pelo qual a adaptação pode ocorrer são: (1) indução e/ou repressão de enzimas específicas do processo, (2) alterações genéticas que resultam em novas capacidades metabólicas e (3) enriquecimento seletivo de microrganismos com capacidade de transformar os compostos de interesse (SPAIN e VAN VELD, 1983).

c) Concentração celular do inóculo

A quantidade de microrganismos ativos iniciais que participam do processo também é um fator que influencia as taxas de biodegradação. Microrganismos que são capazes rapidamente de estocar e consumir substrato, na forma mais balanceada tem uma forte vantagem competitiva sobre outros microrganismos, que não apresentam esta capacidade e podem acelerar o processo de biodegradação (LUCAS *et al.*, 2005).

Em processos fermentativos o volume de inóculo introduzido no fermentador de produção está comumente ao redor de 1/3 de sua capacidade útil. No entanto, pode variar de 0,5 a 50 %, como assinala Borzani (2001).

d) pH

Para maioria dos microrganismos envolvidos nos processos de biorremediação, a faixa de pH mais favorável para seu crescimento está entre 6,0-8,0 com valor ótimo de 7,0 sendo que os fungos são mais tolerantes às condições ácidas (ATLAS, 1988).

Vários trabalhos constataram que houve aumento da taxa de biodegradação de hidrocarbonetos após a correção do pH, para valores próximos à neutralidade (LEAHY e COLWELL, 1990; DEL'ARCO e DE FRANÇA, 1999).

De acordo com Sohrabi e Mogharei (1999), em ambientes com valores extremos de pH também foi verificado a biodegradação dos contaminantes, mas a faixa ótima mais comum observada para a biodegradação de hidrocarbonetos principalmente em solos está entre 5,5 e 8,5.

e) Nutrientes

Para crescer, todos os microrganismos necessitam de uma variedade de elementos químicos como nutrientes. Estes elementos são necessários tanto para a reprodução como para outras funções dos componentes celulares. Eles existem na natureza em uma grande variedade de compostos, que são orgânicos e inorgânicos. Um dos fatores que devem ser observados é o fornecimento de elementos químicos essenciais.

Os elementos químicos incluem os macronutrientes (carbono, nitrogênio e fósforo) e os micronutrientes (enxofre, cálcio, magnésio e outros) (PELCZAR *et al.*, 1996).

Os macronutrientes são utilizados para sintetizar seus componentes celulares, tais como nitrogênio para os aminoácidos e enzimas, fósforo para o ATP (adenosina trifosfato)- que é extremamente importante para o armazenamento e a transferência de energia e o DNA. Os micronutrientes são empregados para desempenhar certas funções metabólicas, como algumas atividades enzimáticas. Neste caso, o enxofre é utilizado para sintetizar algumas co-enzimas, o cálcio para estabilização da parede celular e o magnésio para a estabilização dos ribossomos (MOERI *et al.*, 2004).

As bactérias são particularmente versáteis na utilização de nitrogênio. Ao contrário das células eucarióticas, algumas bactérias podem utilizar nitrogênio gasoso ou atmosférico para a síntese celular por meio de um processo chamado fixação de nitrogênio. Outras utilizam compostos nitrogenados inorgânicos tais como nitratos, nitritos ou sais de amônia, enquanto

algumas utilizam compostos de nitrogênio orgânico tais como aminoácido ou peptídeos (PELCZAR, 1996).

Em concentrações muito baixas de nutrientes, a biodegradação é efetuada, porém, muito lentamente, provavelmente em consequência da reposição de nutrientes devido ao reciclo natural, formação de nutrientes inorgânicos pela lise celular (ALEXANDER, 1994).

Pelo fato, dos sistemas contaminados apresentarem elevada concentração de carbono e baixíssimas concentrações de nitrogênio e fósforo, torna-se necessário à adição destes macronutrientes para favorecer o crescimento microbiano e como consequência a degradação dos contaminantes (LIEBERG e CUTRIGHT, 1999).

Por este motivo, nos processos de biorremediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos é grande a preocupação em relação à proporção carbono: nitrogênio (C:N), pois geralmente quando ocorre um derrame de petróleo e seus derivados altas relações C:N são constatadas. Geralmente, as relações obtidas após tais eventos são inadequadas ao bom andamento da biodegradação de hidrocarbonetos, sendo então requerida à adição de nutrientes.

Segundo Paul e Clark (1989), uma razão de C:N:P de 30:5:1 é geralmente suficiente para assegurar o crescimento microbiano em aquíferos.

Os valores ótimos da relação C:N:P tem sido amplamente discutida e proposta na literatura. Porém tem-se observado que cada sistema em particular, tem sua própria relação ótima, pois esta depende do tipo, da concentração e da disponibilidade do contaminante e da habilidade dos microrganismos utilizados em degradá-lo (MARIANO, 2006).

Segundo Jaminson *et al.* (1975), a adição de nitrogênio e fósforo a amostras de água subterrânea contaminada com gasolina estimulou o crescimento de bactérias. Oliveira (2001) avaliou a relação carbono/nitrogênio em solo arenoso contaminado com óleo árabe e empregou as seguintes relações C:N: 100:01, 100:02, 100:05 e 100:10. A melhor relação C:N estudada foi a 100:10, que promoveu a maior percentagem de remoção da fração de óleo remanescente. Observou-se uma degradação 100% de hidrocarbonetos lineares compreendidos entre 10 e 20 átomos de carbono, e de 94,5 a 98% para os demais hidrocarbonetos compreendidos entre o n -C₂₁ e n -C₃₀. Em média foi obtido 30% de biodegradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: 1-metil-nafaleno, 2-metil-nafaleno, fluoreno, pireno, criseno, fenantreno, benzo(a) antraceno e benzo(b) fluoretano, presentes no óleo cru.

No trabalho de Sousa *et al.* (2007) foi estudado o bioprocessamento de degradação do óleo diesel em meio líquido sintético, empregando a bactéria da linhagem *Bacillus cereus* em duas

relações C:N de 50:1 e 100:1. As análises cromatográficas revelaram que os maiores percentuais de degradação dos constituintes do óleo diesel pelo *Bacillus cereus* UFPEDA 805 ocorreram para o meio com a relação C:N de 100:1, ocorrendo uma degradação superior a 60% para todos os hidrocarbonetos alifáticos analisados, sendo que os três constituintes mais biodegradados do óleo diesel foram: nonano (100%), decano (94%) e undecano (80%), após 7 dias de processo.

Villela *et al.* (2007) em seu estudo de bioprocesso de degradação do querosene em meio líquido sintético, empregando a bactéria da linhagem *Bacillus cereus* em duas relações C:N de 50:1 e 100:1, obtiveram como melhor resultado a relação de 50:1. Esta relação proporcionou degradações de 90% de nonano, 41% de decano e 100% de octano, após 7 dias de processo.

Vale salientar, que a presença de nitrogênio e fósforo em concentrações muito elevadas pode causar efeito inibitório de mineralização de hidrocarbonetos, como demonstrado por Morgan e Watkinson (1990) em tratamento de solo contaminado com gasolina. O aumento na concentração destes nutrientes resultou na redução da taxa de degradação, devido a não adaptação dos microrganismos à grande quantidade de nutrientes.

Pode-se observar, que para se obter maiores degradações dos contaminantes em qualquer meio solo ou líquido, deve-se avaliar bem as condições para que o tratamento se torne eficiente.

f) Oxigênio

O dióxido de carbono e o oxigênio são os dois gases principais que afetam o crescimento de células microbianas. No processo de biodegradação o oxigênio é um fator que influencia, pois sua presença é fundamental em processos aeróbios e inibitórios nos processos anaeróbios (PELCZAR *et al.*, 1996). Portanto, a escolha do processo de tratamento (aeróbio ou anaeróbio) vai depender do tipo de microrganismo empregado no tratamento e das condições operacionais.

O oxigênio é usado pelos microrganismos não somente como aceptor final de elétrons na respiração aeróbica, mas também como um substrato nas reações de biodegradação catalisadas por enzimas denominadas oxigenases. É um parâmetro essencial se a via aeróbica for utilizada para a degradação do contaminante (BOOPATHY, 2000; ATLAS, 1991; LEAHY e COLWELL, 1990).

A Figura 2.11 apresenta o esquema simplificado da degradação aeróbia de uma substância orgânica por microrganismos.

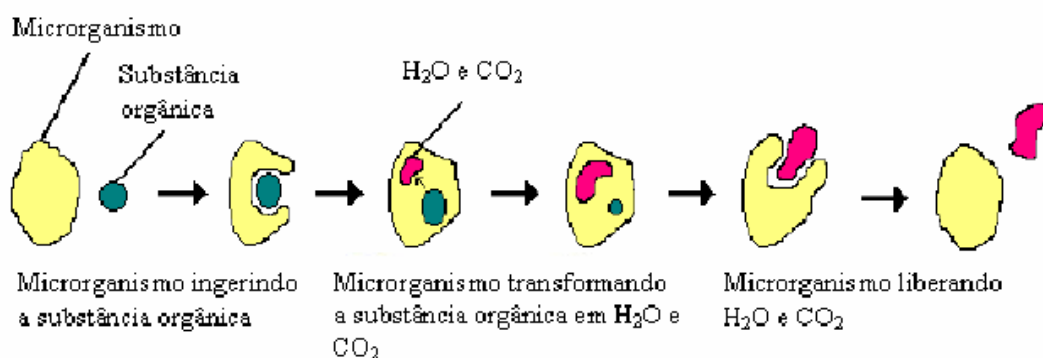


Figura 2.11 - Esquema da degradação de uma substância orgânica por um microrganismo.

Fonte: Mello, (2007).

Os hidrocarbonetos saturados e os hidrocarbonetos aromáticos são compostos que exibem pouca reatividade química e, por muitas décadas, pensava-se que só poderiam ser biodegradados na presença de oxigênio livre. Contudo, durante a última década foi estabelecido que vários microrganismos são capazes de degradar estes hidrocarbonetos sob condições estritamente anóxicas (WIDDEL e RABUS, 2001).

Ainda hoje, muitas das estratégias de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo são baseadas em processos aeróbios, que embora efetivos, apresentam custos elevados por conta do suprimento de oxigênio comparativamente com os processos anaeróbios. A predominância das tecnologias aeróbias está relacionada a observações históricas de que os primeiros passos da biodegradação de hidrocarbonetos por microrganismos envolvem a oxidação do substrato por oxigenases e pelo fato do oxigênio ser um fator limitante em muitos ambientes naturais (BOOPATHY, 2004).

2.9.2 - Limitações Metabólicas

Várias são as barreiras metabólicas que podem vir a limitar a degradação, desde que assumidas as condições ambientais adequadas e que os contaminantes estejam acessíveis (MOERI *et al.*, 2004). A seguir encontra-se descritos as principais barreiras metabólicas.

a) Características estruturais

A inabilidade das enzimas degradativas de metabolizar componentes xenobióticos, devido às características estruturais é uma barreira a biodegradação. Segundo Atlas (1991), a

ordem decrescente de susceptibilidade dos hidrocarbonetos ao ataque microbiano é dada por: alifáticos, ramificados, aromáticos de baixo peso molecular, cíclicos e poliaromáticos.

b) Cometa-bolismo

De acordo com Boopathy (2000), o cometa-bolismo pode ser definido como o metabolismo de um composto que não serve como fonte de carbono e energia, o qual só pode ser alcançado na presença de um substrato primário (indutor enzimático).

Segundo Haws *et al* (2006), no cometa-bolismo normalmente se produz meras modificações das moléculas, o que pode resultar numa diminuição ou num aumento da toxicidade e pode ocorrer uma degradação posterior, mediante a ação combinada de diferentes microrganismos.

Embora o cometa-bolismo aumente a biotransformação de alguns compostos, as taxas de degradação são tipicamente baixas e sujeita a inibição pelo substrato primário. Em adição ao efeito do primeiro substrato sobre a degradação cometa-bólica, os cometa-bólitos podem suprimir a taxa de biodegradação do substrato de crescimento por inibição competitiva e aumentar a taxa de decaimento de biomassa, podendo resultar em efeitos tóxicos dos produtos de transformação cometa-bólica (HAWS *et al.*, 2006).

c) Inibição do metabolismo

A presença de petróleo e seus derivados em níveis tóxicos para os microrganismos é vastamente relatada na literatura (DEL'ARCO e de FRANÇA, 2001; BOOPATHY, 2000; DAVIS e MADSEN,1996; LEAHY e COLWELL, 1990).

Durante o metabolismo do contaminante pode ocorrer a produção de componentes tóxicos que inibem a degradação. Alguns destes produtos podem ser produtos da degradação parcial que acumulam e se tornam mais tóxicos do que o próprio contaminante. Estes compostos tóxicos podem ser letais tanto para os microrganismos degradadores como também para outros microrganismos (DORN e SALANITRO, 2000).

Muitos resíduos industriais e locais poluídos contêm misturas de diferentes componentes químicos orgânicos e inorgânicos. Contaminantes diferentes, quando juntos, podem interagir e afetar a biodegradação. A presença de diferentes componentes orgânicos tóxicos em um único meio pode vir a inibir a biodegradação, embora quando individualmente, cada um possa ser degradado (PROVIDENT *et al.*, 1993).

Ururahy *et al.* (1999) no estudo de tratamento de borras de óleo geradas na indústria de petróleo, quando empregada uma concentração de 10% (v/v) de borra de óleo (com microrganismos nativos - cultura mista) apresentou uma baixa eficiência quando comparada a condição empregada de 5% (v/v) de borra de óleo.

Outro fator que afeta o processo de biodegradação e que pode ocasionar a inibição do metabolismo é a presença de múltiplos substratos. Isto geralmente reduz as taxas de biodegradação intrínseca dos componentes individuais. Esta possível inibição resulta de mais moléculas de substrato concorrendo pelos sítios ativos. Para substratos homólogos (compostos com rotas metabólicas similares) a inibição é tipicamente competitiva, isto é, um substrato liga a uma enzima para formar um complexo enzima-substrato, que bloqueia outros substratos impedindo a formação de um complexo com a enzima, mas a inibição não competitiva (*noncompetitive*) ou sem competição (*uncompetitive*) são também possíveis. A inibição não competitiva ocorre quando dois compostos independentes ligam-se a mesma enzima, diminuindo a taxa de consumo total. Inibição sem competição é semelhante à não competitiva exceto, que o segundo substrato (o inibidor) pode ligar a uma enzima complexada com o primeiro substrato, mas não em uma enzima livre (COPELAND, 1996; REARDON *et al.*, 2002; ALVAREZ-COHEN e SPEITEL, 2001).

2.10- Metabolismo de Degradação de Hidrocarbonetos

Estudos metabólicos foram implementados sobre as rotas metabólicas de biodegradação aeróbica para alcanos, cicloalcanos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) (JUHASZ e NAIDU, 2000; CERNIGLIA, 1997; SUTHERLAND, 1992) e mais recentemente, os mecanismos do catabolismo anaeróbico dos hidrocarbonetos (SPORMANN e WIDDEL, 2000; LOVELY, 2000; WIDDEL e RABUS, 2001).

De acordo com Van Hamme *et al.* (2003), mais significativamente, através do desenvolvimento e aplicações de técnicas moleculares, o estudo dos processos de catabolismo tem avançado substancialmente, e muitos mecanismos catalíticos novos estão sendo caracterizados. A abordagem molecular tem também contribuído para a caracterização mais detalhada da estrutura da membrana da bactéria.

Por via aeróbia, a primeira etapa de biodegradação consiste na oxidação do hidrocarboneto, que é promovida por enzimas oxigenases. Nesta via o oxigênio é utilizado como acceptor final de elétrons e os produtos finais são, principalmente, CO₂ e H₂O. Na

respiração anaeróbia substratos inorgânicos desempenham a função de aceptores finais de elétrons, sendo que o CO_2 é reduzido a metano, sulfato a sulfeto, nitrato a nitrogênio molecular ou íon amônio (URURAHY, 1999 *apud* ENGLER e KENZIE).

A seguir, serão apresentados os principais aspectos bioquímicos envolvidos na biodegradação dos hidrocarbonetos específicos, segundo Van Hamme *et al.* (2003).

Substâncias orgânicas são degradadas no ambiente por meio de diversas transformações bem caracterizadas. A molécula orgânica é transformada (degradada) por enzimas que residem dentro da parede celular da bactéria. Cada transformação é realizada por uma enzima específica, muitas vezes associada com um microrganismo específico. O processo envolve a adsorção da molécula orgânica dentro do sítio ativo da enzima, que então adere sobre a molécula, cataliticamente adicionando ou removendo átomos de hidrogênio e oxigênio para o substrato orgânico.

O volume e a forma dos substratos orgânicos determinam se a molécula ajustará ou não dentro do sítio ativo da enzima. Entretanto, ligeiras modificações na estrutura molecular irão alterar fortemente a habilidade para transformar as moléculas orgânicas.

O processo interação enzima/substrato transforma as moléculas orgânicas. Embora haja muitas substâncias químicas orgânicas, há basicamente duas rotas de degradação.

O aspecto comum de ambas as rotas de degradação é a adição de uma função $-\text{OH}$ (grupo hidroxila) à molécula. O primeiro passo na quebra das substâncias orgânicas é adicionar o $-\text{OH}$ à molécula. O passo que se segue à adição da hidroxila depende se a molécula é aromática ou se é uma série de hidrocarbonetos alifáticos.

A Figura 2.12 mostra o esquema da rota metabólica de hidrocarbonetos alifáticos. Pode-se observar por esta figura, que o primeiro passo na degradação de uma série de hidrocarbonetos alifáticos é a inserção de um grupo de hidroxila sobre um terminal do carbono metil. Isto pode ser considerado a inserção de um átomo de oxigênio dentro de uma ligação carbono-hidrogênio. Este produto resultante é denominado de álcool. O segundo passo envolve a perda de dois átomos de hidrogênio, formando um aldeído. O terceiro passo envolve a oxidação do carbono terminal, nesta hora passa de um aldeído a um ácido carboxílico. Na β oxidação, o ácido carboxílico é reduzido em comprimento por dois átomos de carbono formando um novo, uma série mais curta de ácido carboxílico e duas moléculas de CO_2 .

A molécula mais simples nesta classe de compostos é o benzeno. Ao benzeno adiciona-se oxigênio em uma das ligações de duplas, carbono-carbono para a forma epóxido (nome comercial de matéria plástica). O epóxido então reage com a água para formar uma molécula

chamada 3,5 ciclohexadieno-1, 2-diol. Em alguns microrganismos, o intermediário diol pode ser formado diretamente sem produzir o composto epóxido. Uma vez formado, o intermediário ciclohexadieno é convertido a uma molécula aromática contendo dois grupos de hidroxila adjacentes (catecol). O catecol é degradado pela rota a ácidos acéticos e succínico, como mostra na Figura 2.13.

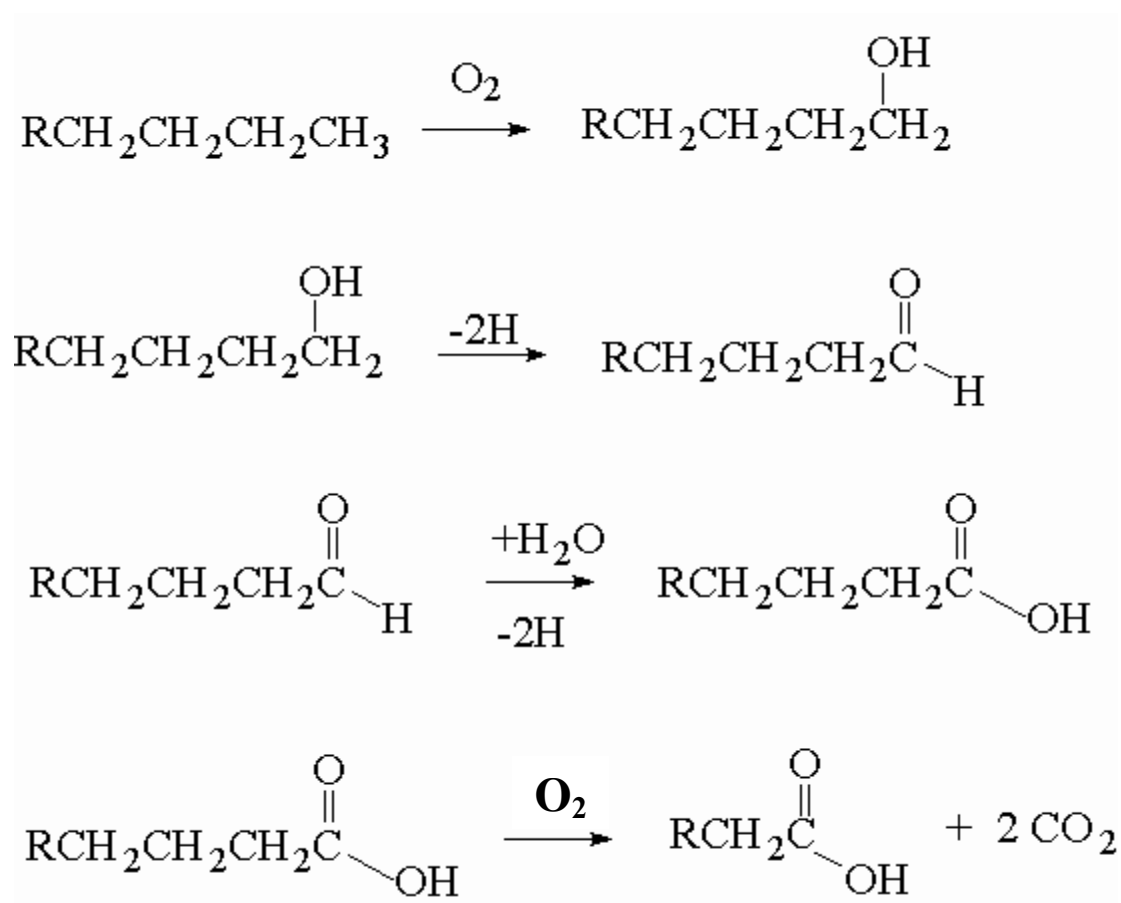


Figura 2.12- Rota de degradação de hidrocarbonetos alifáticos.

Compostos que contenham componentes ambos alifáticos e aromáticos são degradados sequencialmente, com a porção alifática sendo degradada primeiro. A porção alifática será quebrada com dois carbonos ao mesmo tempo (pelo processo de β -oxidação) até ser removido. O produto final antes de o anel aromático ser degradado é um ácido carboxílico. O ácido carboxílico é então transformado a 3,5 ciclohexadieno- 1,2- diol, antes de ser convertido a catecol. A degradação do catecol é realizada pela rota mostrada na Figura 2.14.

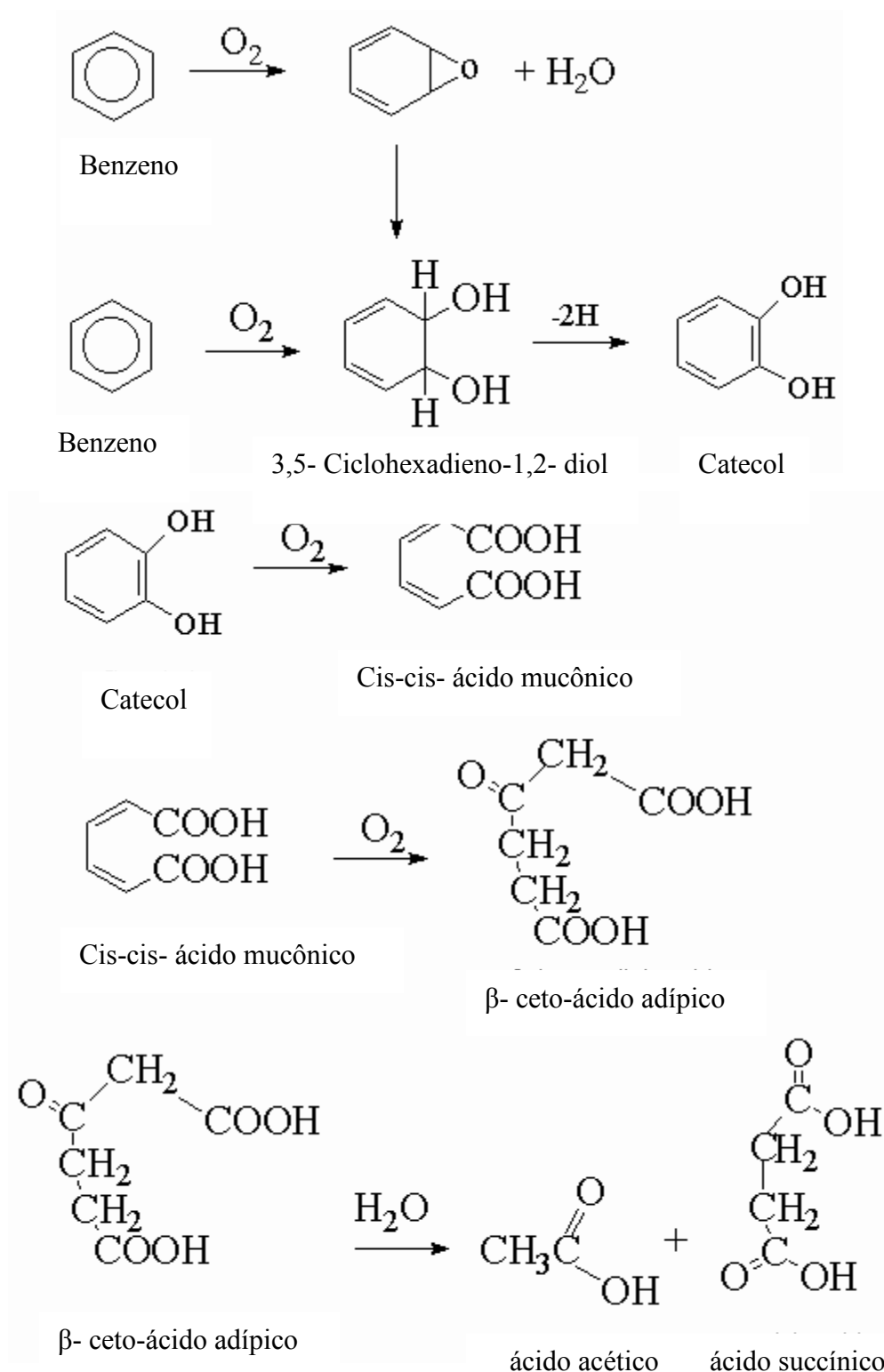


Figura 2.13- Rota metabólica de composto aromático: benzeno.

O tolueno (metilbenzeno) é a molécula mais simples que ilustra os compostos que contêm componentes ambos alifáticos e aromáticos. A Figura 2.14 mostra a rota metabólica deste tipo de composto.

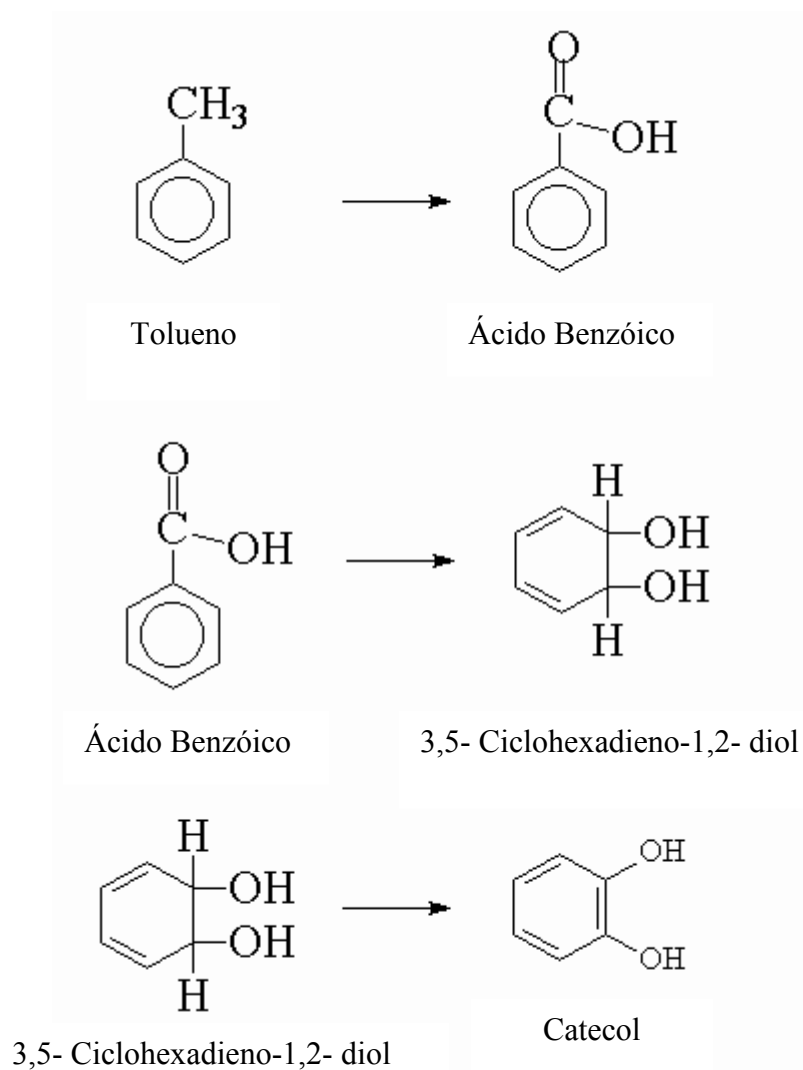


Figura 2.14- Rota metabólica de composto aromático: tolueno.

O naftaleno é o hidrocarboneto poliaromático mais simples. A degradação do naftaleno ocorre em um anel, formando uma substância que é análoga a 3,5-ciclohexadieno-1,2- diol. Esta substância é dihidroxinaftaleno, 1,2- dihidroxinaftaleno, sendo então transformado a ácido salicílico que é então modificado a catecol. O catecol então segue a sua rota proporcionando produtos finais de degradação tais como ácido acético e succínico. A Figura 2.15 apresenta a rota de degradação do naftaleno.

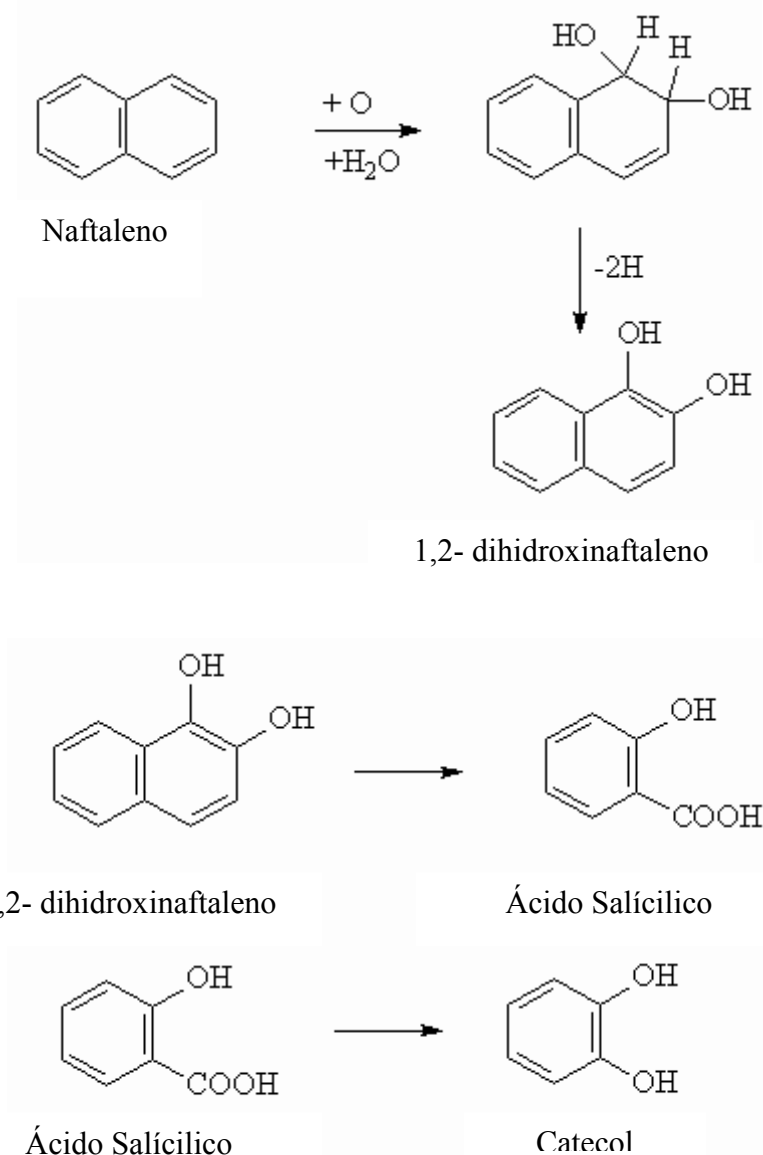


Figura 2.15- Rota metabólica de hidrocarbonetos poliaromáticos: naftaleno.

2.11 – Planejamentos Experimentais

O planejamento experimental é, por definição, a especificação detalhada das operações experimentais que devem ser realizadas. Constitui uma ferramenta estatística que pode ser utilizada para otimizar as grandezas de interesse, determinar as variáveis influentes sobre essas grandezas, eventualmente das suas interações e minimizar os efeitos da variabilidade sobre o desempenho de um processo. Este planejamento permite ao experimentador diminuir o número de ensaios, estudar um número considerável de fatores, detectar as interações entre as variáveis estudadas, detectar os valores ótimos destas variáveis, melhorar a precisão dos resultados e otimizar os resultados (MONTGOMERY, 1999).

2.11.1 – Planejamento Experimental Composto Central

Para a realização de todos os estudos desenvolvido neste trabalho, foi adotado o planejamento composto central (PCC).

Planejamentos compostos centrais são planejamentos fatoriais de 1ª ordem aumentados por pontos adicionais para permitir a estimação dos parâmetros de uma superfície de 2ª ordem.

Este planejamento é composto de um planejamento fatorial 2^k ou fatorial fracionário (níveis codificados -1 e +1) aumentado pelos seguintes pontos:

X_1	X_2	X_3	X_k
0	0	0	0
$-\alpha$	0	0	0
$+\alpha$	0	0	0
0	$-\alpha$	0	0
0	$+\alpha$	0	0
0	0	$-\alpha$	0
0	0	$+\alpha$	0
0	0	0	$-\alpha$
0	0	0	$+\alpha$

A representação matemática é dada da seguinte forma:

$$2^k + n_2 + 2 \cdot k \quad (2.1)$$

Sendo:

k- número de variáveis de estudo

n_2 - número de réplicas no ponto central.

Para o caso da aplicação de um planejamento composto central com 3 variáveis de estudo, a fórmula anterior (1) dará $2^3 + 2 + 2 \cdot 3 = 16$, 16 experimentos a serem realizados ao adotar duas réplicas no ponto central.

Para a realização destes experimentos foi seguido o seguinte esquema do planejamento, de acordo com a Figura 2.16, ao ser definido os níveis -1, +1, 0, $+\alpha$ e $-\alpha$ das variáveis estudadas.

+1	-1	-1	}	Planejamento Fatorial 2^k
-1	-1	+1		
-1	+1	-1		
-1	+1	+1		
+1	-1	-1		
+1	-1	+1		
+1	+1	-1		
+1	+1	+1		
$-\alpha$	0	0	}	Pontos Axiais 2.K
$+\alpha$	0	0		
0	$-\alpha$	0		
0	$+\alpha$	0		
0	0	$-\alpha$		
0	0	$+\alpha$		
0	0	0	}	Pontos Centrais
0	0	0		

Figura 2.16 – Esquema do planejamento composto central.

2.11.2 – Padrão da Análise Estatística de Respostas PCC

A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o programa *Statistica 7.0*, no qual foi realizada uma análise de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados, para cada uma das respostas, tendo como parâmetros, os termos isolados, de interação e quadráticos das três variáveis estudadas. A equação empírica de 2ª ordem proposta para representar cada uma das respostas segue a seguinte forma:

$$Y = \beta_0 + aX_1 + bX_2 + cX_3 + eX_1X_2 + fX_1X_3 + gX_2X_3 + hX_1^2 + iX_2^2 + jX_3^2 \quad (2.2)$$

Sendo:

Y = resposta estudada;

β_0 = valor médio da resposta;

$a, b, c, \dots, j$ = constantes ou parâmetros da equação;

X_1 = variável estudada 1;

X_2 = variável estudada 2;

X_3 = variável estudada 3.

A esta equação são aplicados os resultados obtidos e feita uma avaliação estatística da estimação dos parâmetros por meio dos valores de t de Student para cada um, sendo

eliminados aqueles com nível de significância (p) superior a 10%, ou seja, as variáveis relacionadas a estes são consideradas não relevantes quando p superior a 10%. Os parâmetros não significativos são eliminados, obtendo-se assim, uma equação que representa os efeitos das variáveis na biodegradação do efluente e que determina qual das variáveis mais afeta a resposta. O valor do R^2 e a comparação entre F calculado e F tabelado são utilizados para constatação da significância ou não do modelo (FELIPE, 1999).

Com o objetivo de verificar o comportamento da resposta estudada, isto é, se ela apresenta ponto de máximo, de mínimo ou não apresenta nem ponto de máximo e nem de mínimo (ponto de sela) é necessário descobrir o ponto estacionário.

Os pontos estacionários são obtidos pela derivada da equação da resposta Y pela variável X_k , isto é:

$$\partial Y / \partial X_1 = \partial Y / \partial X_2 = \dots = \partial Y / \partial X_k = 0 \quad (2.3)$$

sendo, $Y = b_0 + x'b + x'Bx$

$$\partial Y / \partial X = \partial / \partial X [b_0 + x'b + x'Bx] = b + 2Bx = 0 \quad (2.4)$$

sendo, b_0 o termo independente;

$x'b$ são os termos de 1ª ordem na função de resposta;

$x'Bx$ é a contribuição quadrática.

Desta maneira, o ponto estacionário será dado por: $X_0 = - (1/2) B^{-1}b$, em que B é a matriz (k x k) na qual a diagonal é composta pelos coeficientes dos termos quadráticos da equação e os termos fora da diagonal são correspondentes aos coeficientes das interações divididos por 2 (ex: a_{12} e a_{21} correspondem ao coeficiente da interação X_1X_2). A matriz b é uma matriz coluna composta pelos coeficientes associados as variáveis isoladas (variáveis lineares).

O ponto estacionário (X_0) pode ser:

- * Um ponto onde a superfície atinge um máximo;
- * Um ponto onde a superfície atinge um mínimo, ou
- * Um ponto nem de máximo, nem de mínimo $\Rightarrow$ Ponto de sela (*saddle point*).

Porém, podem existir problemas relacionados a estes pontos estacionários:

- * Pode existir uma região de máximo e não um ponto de máximo;
- * Pode ser que o ponto estacionário esteja fora da região experimental.

Para determinar a natureza desse ponto estacionário é necessário fazer uma análise canônica, que considera uma translação da superfície de resposta da origem $(X_1, X_2, \dots, X_k) = (0, 0, \dots, 0)$ para o ponto estacionário X_0 (Figura 2.17). Daí a função de resposta é formulada em termos de novas variáveis, $w_1, w_2, \dots, w_k$.

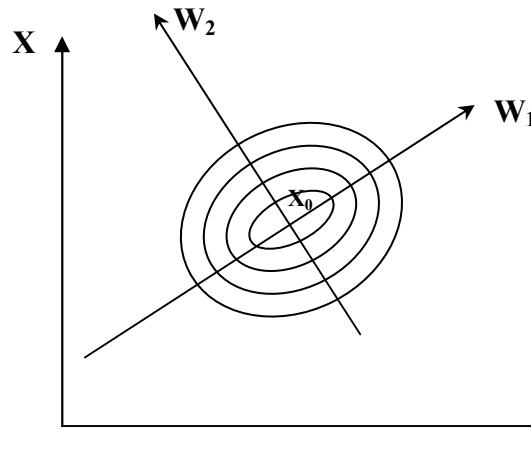


Figura 2.17 – Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.

Então, obtêm-se a função de resposta em termos das novas variáveis:

$$Y = y_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2, \quad (2.5)$$

Sendo:

y_0 : é a resposta estimada no ponto estacionário e, $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ são constantes.

Os sinais dos λ 's e a grandeza dos λ 's ajudam a determinar a natureza do ponto estacionário e, a relação entre os w 's e os x 's também são importantes, pois indicam ao pesquisador regiões úteis para exploração.

Quando $\lambda_i < 0$, sendo $i = 1, 2, \dots, k$, movimentados em qualquer direção a partir do ponto estacionário, proporcionaria um decréscimo de Y , isto é, o ponto estacionário x_0 é um ponto de resposta máxima da superfície ajustada. Se $\lambda_i > 0$, o ponto estacionário x_0 é um ponto de mínimo para a superfície ajustada e, se os λ 's têm sinais diferentes, o ponto estacionário x_0 não é nem ponto de máximo, nem de mínimo.

A obtenção dos pontos estacionários e a análise canônica dos dados para cálculo dos pontos de maximização das respostas são realizados utilizando um algoritmo no *software Maple V Release 4*.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1– Matéria-Prima: Efluente Contaminado

O efluente contaminado empregado neste estudo foi gerado em terminais de distribuição de combustíveis (óleo diesel e gasolina) como resultado de lavagens dos pátios e da parte externa dos caminhões responsáveis pelo transporte destes combustíveis.

O efluente foi coletado periodicamente em uma lagoa situada nos fundos do terminal, conforme mostra a Figura 3.1, e armazenado em galões de 50 litros, sob refrigeração a 4°C.

As amostras deste efluente foram coletadas de acordo com a norma da ABNT/NBR 9898 (1987)- Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores.



Figura 3.1 - Lagoa mostrando a canaleta e o bocal de descarga do efluente na mesma.

3.2– Fonte dos Microrganismos Empregados

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas quatro culturas, sendo, uma cultura mista (C₁) e três linhagens de espécies conhecidas, sendo elas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Pseudomonas aeruginosa* PATC.

A cultura mista denominada de C₁ foi isolada do solo contaminado de uma lagoa, que recebe como efluente gerado a água de lavagem do pátio do terminal de combustível, onde há derrames eventuais de gasolina e óleo diesel, conforme mostra a Figura 3.2 (VIEIRA *et al.*, 2007). A cultura *Pseudomonas aeruginosa* PATC foi isolada do mesmo solo da lagoa citada anteriormente. As culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 foram obtidas de um banco de cultura gentilmente cedido pela Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ).

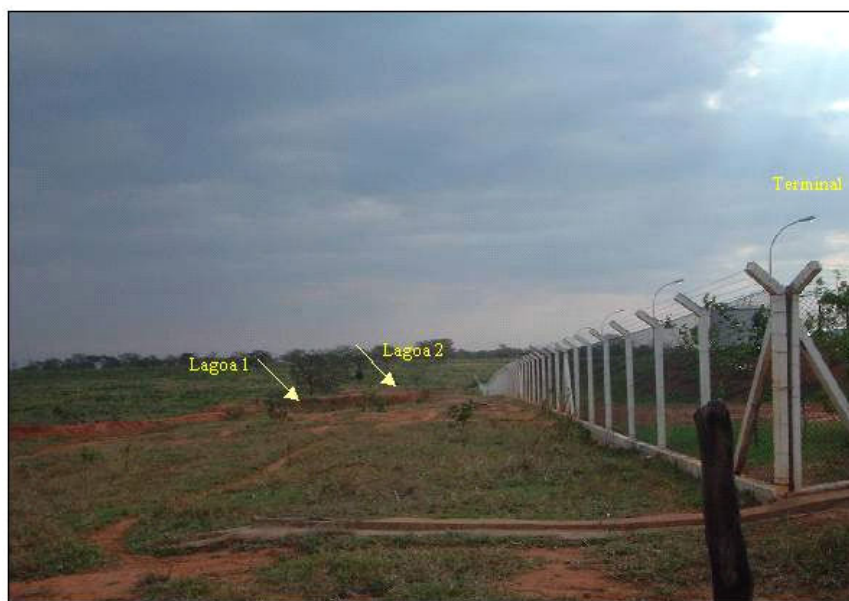


Figura 3.2 – Localização das lagoas de efluente do terminal de combustível na Fazenda Rio das Pedras, de onde foram obtidas as amostras dos solos.

3.3 – Adaptação das Culturas ao Efluente Sintético – Prévia Adaptação

3.3.1 – Efluente Sintético para Prévia Adaptação

Como a cultura C₁ já havia passado por uma pré-adaptação utilizando efluente sintético (VIEIRA, 2004), iniciou-se neste trabalho a adaptação prévia das culturas puras empregando o mesmo procedimento descrito por Vieira (2004).

As culturas puras foram cultivadas em meio inorgânico adicionado de extrato de levedo para fortalecimento das mesmas, cuja composição está listada na Tabela 3.1. Para formação do efluente sintético foram adicionados a este meio (Tabela 3.1) as concentrações de combustíveis, gasolina e óleo diesel, na proporção de 1:1 em v/v.

A densidade microbiana foi aumentada, devido a cultivos sucessivos em concentrações crescentes de combustíveis realizados a cada 48 horas durante 12 dias a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e 150 rpm. A concentração máxima de combustível suportada pelas culturas em efluente sintético foi de 2% de gasolina e 2% de óleo diesel (volume/volume). Vale salientar, que foi denominado de efluente sintético o meio mineral com o extrato de levedo adicionado das concentrações da mistura óleo diesel e gasolina. Antes da adição da mistura de combustíveis o pH do meio foi ajustado na faixa 7-7,2 com solução de NaOH e HCl a 0,1 N e posteriormente esterilizado a 110°C durante 20 min.

Tabela 3.1 - Composição do meio inorgânico (M₁) adicionado de extrato de levedo para adaptação prévia.

Componentes (M ₁)	Concentração (g/L)
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,4
NH ₄ NO ₃	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
MnSO ₄ . H ₂ O	0,03
Extrato de levedo	2,0

3.3.2 – Manutenção das Culturas Puras e Mista Após Adaptação

As culturas foram mantidas à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ no efluente sintético a 2% de combustíveis, após crescimento à temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.

3.3.3 – Meio de Cultura Utilizado no Isolamento dos Microrganismos Presentes na Cultura Mista

O isolamento das culturas bacterianas presentes na cultura mista foi realizado de acordo com o método descrito por Cunha e Leite (2000), sendo modificado para as condições deste estudo. A composição do meio (M₂) empregado para o isolamento está listada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Meio de cultivo utilizado no isolamento dos microrganismos.

Componentes M ₂	Concentração g/L
NaCl	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
KNO ₃	3,0
Agar - Ágar	20

Após a adaptação da cultura C₁ ao efluente sintético descrito no Item 3.3.1 foi realizado um plaqueamento utilizando o método de espalhamento do inóculo na superfície da gelose. O inóculo foi adicionado em placas contendo o meio mineral M₂ e a mistura de combustível (óleo diesel e gasolina -como única fonte de carbono), em papel de filtro localizado na parte interna da tampa da placa. A incubação foi feita por 7 dias a 30 ± 2°C.

Foram isolados os principais microrganismos capazes de crescer na presença da mistura de combustíveis como fonte de carbono.

3.3.3.1 – Identificação dos Microrganismos

Os microrganismos isolados foram identificados pelo Laboratório de Enterobactérias da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) por meio de Bioquímica Clássica.

3.4 – Caracterização do Efluente

As seguintes análises foram realizadas para a caracterização do efluente de acordo com a *Standard Methods* (1998): a demanda química de oxigênio (DQO) foi realizada segundo a metodologia de refluxo fechado pelo método titulométrico; demanda biológica de oxigênio (DBO); nitrogênio total pelo método *Kjeldahl* e fósforo total pelo método colorimétrico por

redução com ácido ascórbico. A caracterização em relação ao carbono orgânico total (TOC) foi realizada pela técnica de combustão catalítica a alta temperatura, empregando o aparelho Rosemount Analytical Dohrmann Division, modelo DC-190.

A análise de óleos ou graxas pelo método gravimétrico modificado (Macedo, 2003). E a dosagem de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) foi realizada segundo metodologia descrita por Vieira *et al.* (2007).

3.5 – Adaptação das Culturas ao Efluente *in natura*

Após uma pré-adaptação das culturas estudadas (puras e mista) em efluente sintético, 10 mL destas culturas crescidas neste meio foram adicionadas em erlenmeyers de 500 mL, tampados com rolhas de borracha (rolhas adaptadas) contendo 100 mL de efluente contaminado. A este sistema (cultura + efluente contaminado) foi adicionado as seguintes substâncias em g/L: 1,2 fertilizante nitrato de amônio (0,396 g/L de N- marca Bunge); 5,0 fertilizante superfosfato simples (0,393 g/L de P - marca Bunge) e 2 de extrato de levedo (marca Merck). Os fertilizantes citados anteriormente foram empregados como fontes de nitrogênio e fósforo.

O pH foi ajustado para 7,0 e a densidade microbiana foi aumentada por cultivos sucessivos a cada 96 horas durante 24 dias, empregando as mesmas condições descritas anteriormente. Nesta etapa, foi acompanhado o crescimento de biomassa das culturas estudadas.

As condições experimentais adotadas foram temperatura ambiente de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e agitação de 150 rpm em mesa oscilatória. Em intervalo de 48 horas foi realizada a aeração do meio no fluxo laminar pela retirada da tampa de borracha e ligeira agitação manual por 3 minutos.

Os microrganismos mais abundantes presentes na cultura C₁ depois de adaptada ao efluente foram devidamente isolados e identificados, conforme descrito anteriormente (item 3.3.3).

3.6 – Padronização dos Inóculos Utilizados nos Reatores para o Estudo da Cinética de Biodegradação do Efluente Contaminado

As padronizações dos inóculos foram realizadas, após 96 h de biodegradação, conduzidos nas mesmas condições operacionais mencionadas no item 3.5. Para isto, alíquotas de 50 mL foram centrifugadas à 12500 rpm (corresponde a um campo centrífugo relativo de 18900 g) para remoção das células.

Estas células removidas foram separadas do sobrenadante e pesadas antes e após a secagem da biomassa. Desta forma foi realizada uma relação entre massa seca e massa úmida de célula de forma a manter a concentração inicial de biomassa de $0,3 \pm 0,09$ g/L em massa seca. Esta padronização foi empregada nos estudos de determinação da cinética e na substituição de extrato de levedo por levedura cervejeira autolizada (LCA). Para a realização do planejamento composto central (PCC), a relação citada anteriormente foi utilizada como referência, visando obter a concentração de inóculo adotada para cada experimento.

3.7 – Estudo da Cinética de Crescimento Celular e Biodegradação de Efluente Contaminado (Efluente *in natura* adicionado de fertilizantes) Empregando Culturas Puras e Mista

Os experimentos foram realizados em erlenmeyer de 500 mL, tampados com rolha de borracha, para evitar a perda dos hidrocarbonetos mais leves. Aos reatores contendo 100 mL de efluente foi adicionado os fertilizantes e o extrato de levedo nas mesmas concentrações mencionadas no Item 3.5 e foram inoculados com uma concentração de inóculo em peso úmido correspondente a aproximadamente $0,3 \pm 0,09$ g/L de massa seca (item 3.6).

O sistema foi incubado durante 42 dias nas mesmas condições operacionais adotadas na etapa de adaptação (item 3.5).

Para determinar o potencial de biodegradação dos contaminantes foram realizadas análises de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) e crescimento de biomassa. As amostras dos reatores foram retiradas diariamente até o 7º dia e após este tempo a cada 7 dias de processo para as respectivas análises.

Para cada condição estudada foram utilizados reatores em triplicata e a cada dia de operação um reator era sacrificado para realização das análises de TPH e crescimento celular. Para todos os ensaios foram realizados testes controle (sem adição de microrganismo) visando determinar as perdas abióticas.

3.7.1- Modelagem Matemática

Balanços de massa para o crescimento celular e consumo de substrato foram realizados nos reatores em sistema batelada para estabelecer a formulação matemática. Para a cinética do crescimento celular foi empregado o modelo logístico não estruturado descrito por Bailey (1986) *apud* Verhulst-Pearl, (Eq. 3.1). E para a degradação dos combustíveis, a equação proposta utilizou como referência a equação desenvolvida por Luedeking Piret (1959) levando em consideração apenas o termo referente ao consumo de substrato para crescimento celular, desprezando assim o termo referente à manutenção por se tratar de um sistema em batelada, o que não pode ser realizado em sistemas contínuos (Eq. 3.2).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \left(1 - \frac{X}{X^*} \right) \quad (3.1)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \quad (3.2)$$

Sendo:

μ_{max} – Velocidade específica máxima de crescimento (T^{-1})

X^* - Parâmetro de crescimento celular estacionário (ML^{-3})

S – Concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo – TPH – (ML^{-3})

X - Concentração de biomassa (ML^{-3})

$Y_{x/s}$ - Rendimento do crescimento celular em relação a degradação de TPH ($M_x \cdot M_s^{-1}$)

Os valores dos parâmetros (μ_{max} , X^* e $Y_{x/s}$) foram calculados a partir dos resultados experimentais de ensaios efetuados sob condições controladas. Utilizou-se a técnica de regressão não-linear, empregando o algoritmo de resposta múltipla (MARQUARDT, 1963). A integração do conjunto de equações diferenciais para o cálculo dos parâmetros (por ajuste dos dados experimentais) foi realizada com auxílio do método de Runge-Kutta de quarta-ordem. A identificação paramétrica foi ilustrada pela correlação, entre os valores experimentais e os fornecidos pelo modelo.

3.8 – Estudo da Substituição da Adição de Extrato de Levedo por Levedura Cervejeira Autolizada (LCA) Empregando as Culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e Mista C₁

Esta etapa do estudo foi realizada após a cinética de biodegradação (Item 3.7) e teve como finalidade a substituição da adição de extrato de levedo por levedura cervejeira autolizada (LCA), visando à redução dos custos do processo.

Neste estudo foram empregadas as culturas que apresentassem maiores valores de remoção de TPH (consumo de hidrocarbonetos) ao final do processo.

Os experimentos foram conduzidos em erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 mL do efluente após a adição dos fertilizantes, nas mesmas concentrações utilizadas no Item 3.5. E as concentrações de levedura cervejeira autolizada (LCA) adicionadas em cada reator foram em g/L: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0. O sistema foi inoculado com $0,3 \pm 0,09$ g/L das respectivas culturas em cada reator.

O tempo de operação adotado foi de 14 dias, sob as mesmas condições experimentais já mencionadas anteriormente (item 3.5).

As amostras foram coletadas nos reatores para a realização das análises de TPH e crescimento celular. Para as análises de TPH foram retiradas amostras em 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 14 dias de processo. Para cada dia de amostragem um reator foi sacrificado, ou seja, durante os 14 dias foram sacrificados 9 reatores e suas réplicas.

Em relação ao crescimento celular, foi realizada a técnica de massa seca no início e no final do processo. Neste caso, os reatores dos quais se retiraram às amostras também foram sacrificados.

Resta salientar, que a técnica de massa seca consistiu na retirada de uma amostra do meio, a qual foi centrifugada. As células precipitadas foram lavadas e secas em estufa a 90°C até peso constante.

Para todos os ensaios foram realizados teste controle (sem adição de microrganismo) visando determinar as perdas abióticas.

3.9 – Planejamentos Experimentais

3.9.1 – Desenvolvimento dos Experimentos

Para o desenvolvimento destes experimentos foi construído um reator com uma configuração específica para este estudo, conforme mostra a Figura 3.3. Por esta figura, pode-se observar que o reator possuía 5 conexões na parte superior para acoplar o agitador mecânico-2, o medidor de oxigênio dissolvido-3, o sistema de fornecimento de aeração-4, o sistema de saída de gás-5 e o sistema de coleta de amostras-6.

Para aumentar a homogeneização do sistema o reator era composto por um sistema com 4 chicanas também feita em acrílico. Estas chicanas foram ajustadas ao reator por meio do conjunto de porcas e parafusos de modo a permanecerem fortemente presas sem possibilidade de desprendimento.

Foram adotadas as seguintes condições operacionais: vazão de ar 150 L/h – medida por rotâmetro (Figura 3.4) e controlada por uma válvula acoplada a linha, agitação de 150 rpm, aeração de 5 minutos em intervalos de 48 horas e volume útil de 5 L.

A Figura 3.5 mostra os desenhos esquemáticos das tubulações de distribuição de ar dentro do reator e de coleta de amostras. Vale salientar, que estas tubulações e a pá do agitador mecânico eram feitos em aço inox.

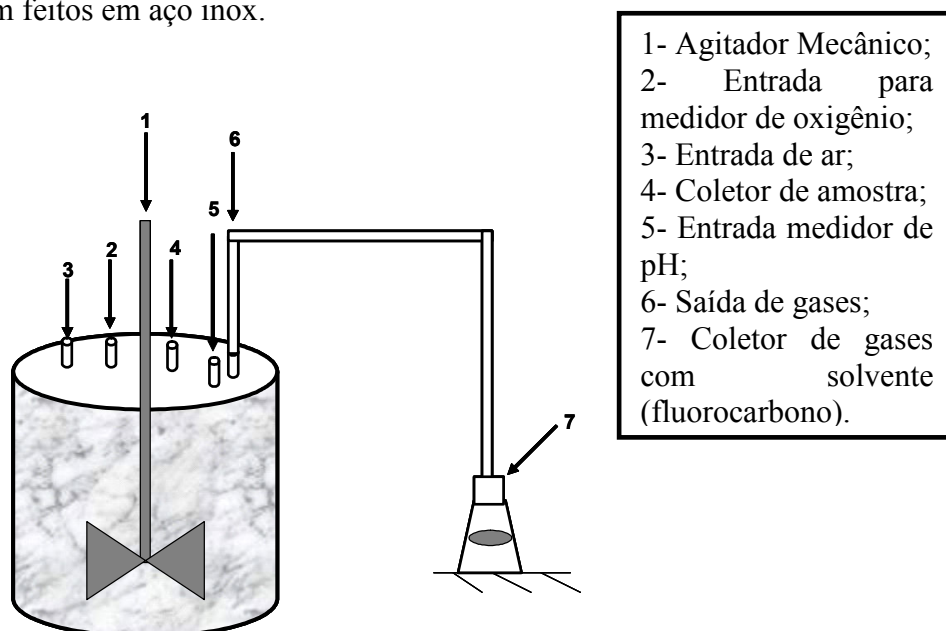


Figura 3.3- Esquema da unidade experimental empregada nos ensaios de planejamento composto central.



Figura 3.4- Rotâmetro.

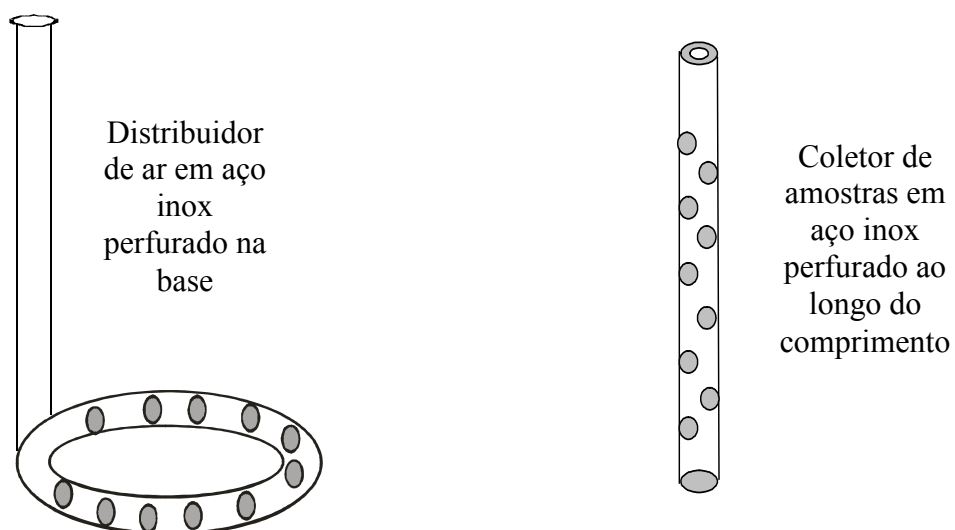


Figura 3.5- Desenho esquemático das tubulações de distribuição de ar e de coleta de amostras.

Os experimentos visando a otimização das condições operacionais foram realizados por 2 planejamentos experimentais do tipo composto central, cujos objetivos são descritos a seguir:

1º Planejamento: Definição da melhor relação nutricional (concentração de nitrogênio e fósforo) e tamanho do inóculo (concentração de inóculo);

Este tipo de planejamento foi escolhido a fim de verificar a influência das três variáveis no processo de biodegradação de efluente contaminado por óleo diesel e gasolina, empregando a cultura mista C_1 .

As variáveis independentes deste processo foram:

X_1 – Concentração de nitrogênio;

X_2 – Concentração de fósforo e,

X_3 – Concentração de inóculo.

No planejamento foram adotadas como respostas (variáveis dependentes) os resultados de remoção de TPH e quantificações de biomassa (peso seco). Além disto, foi realizado o acompanhamento do pH ao longo do processo e ao final foi realizada a cromatografia gasosa para identificar os principais hidrocarbonetos biodegradados no processo.

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando a seguinte equação de codificação:

$$\text{Equação geral: } X_n = \frac{X - X_0}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (3.3)$$

Sendo: X_n é o valor da variável na forma codificada.

X é o valor real da variável a ser calculado;

X_0 é o valor da variável no ponto central;

X_{+1} é o valor da variável no nível superior;

X_{-1} é o valor da variável no nível inferior;

$$\text{- Concentração de Nitrogênio: } X_n = \left(\frac{CN(g/L) - 0,380(g/L)}{0,245(g/L)} \right) \quad (3.4)$$

$$\text{- Concentração de Fósforo: } X_n = \left(\frac{CP(g/L) - 0,104(g/L)}{0,071(g/L)} \right) \quad (3.5)$$

$$\text{- Concentração de Inóculo: } X_n = \left(\frac{CI(g/L) - 2,47(g/L)}{1,53(g/L)} \right) \quad (3.6)$$

O valor de α empregado neste estudo foi de 1,287, para que o PCC fosse ortogonal, isto é, um planejamento onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não estão correlacionados entre si (BOX *et al.*, 1978).

O valor de α , foi calculado pela seguinte equação:

$$\alpha = \left(\frac{QG}{4} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (3.7)$$

$$\text{sendo, } Q = \left((G + T)^{\frac{1}{2}} - G^{\frac{1}{2}} \right)^2 \quad (3.8)$$

G = número de pontos fatoriais ($G = 2^k$, se completo);

T = número de pontos adicionais no PCC; $T = 2k + \text{número de réplicas centrais}$.

Na Tabela 3.3, estão relacionadas as variáveis do processo e seus respectivos valores, de acordo com os níveis inferiores, centrais e superiores adotados.

Vale salientar, que os mesmos fertilizantes descritos anteriormente (item 3.5), foram empregados neste estudo, sendo utilizados como fontes de nitrogênio e fósforo. Além disto, a todos os experimentos foram adicionados de levedura cervejeira autolizada (LCA).

Tabela 3.3- Variáveis de processo estudadas no planejamento e os valores de seus respectivos níveis.

Variáveis		Níveis				
		- α	-1	0	+1	+ α
X ₁	Concentração de Nitrogênio (g/L)	0,065	0,135	0,380	0,625	0,695
X ₂	Concentração de Fósforo (g/L)	0,008	0,033	0,104	0,175	0,195
X ₃	Concentração de Inóculo (g/L)	0,500	0,94	2,47	4,0	4,4

As concentrações de nitrogênio e fósforo adotados para os níveis listados na Tabela 3.3, correspondem as seguintes relações de C:N:P: nível (-1)- 100:5,4:1,33; nível (+1)- 100:25:7,0; nível (0)- 100:15,2:4,16; nível (+ α)- 100:27,8:7,8 e nível (- α)- 100:2,6:0,33. Para a utilização destes valores (cada nível classificado), foi necessário fixar duas concentrações para cada variável e as demais concentrações foram decorrentes do emprego das equações 3.4 a 3.6.

Para a concentração de nitrogênio, fixou-se os seguintes níveis: - α igual a 65 mg/L (100:2,6) – referente a relação mínima obtida, quando adicionado ao efluente apenas a

levedura cervejeira autolizada, e +1 igual a 625 mg/L (100:25) – esta relação também foi estudada por Pereira e Lemos (2004) e se mostrou como a melhor relação no estudo de ampliação de escala da biodegradação de petróleo em solo por *Aspergillus Versicolor*.

Para os níveis relacionados à concentração de fósforo foram fixados: – α = 8,25 mg/L (100:0,33) –referente ao efluente sem correção na concentração de fósforo e +1 = 175 mg/L – referente a relação 100:7,0 utilizada no trabalho Vieira *et al.* (2007), que realizou o estudo da biodegradação de efluente sintético de terminais de distribuição de combustíveis.

Em relação aos níveis obtidos para a concentração de inóculo foi estabelecido (fixado) os seguintes níveis: – α = 0,5 g/L – referente a uma concentração pouco maior em relação a utilizada para inocular os reatores na etapa da cinética de biodegradação (item 3.7), e +1 = 4,0 g/L – referente a concentração próxima da máxima obtida para a maioria das culturas ao final dos 42 dias de operação na cinética de biodegradação (item 3.7).

Na Tabela 3.4 está apresentada a matriz do planejamento com os valores codificados e reais das variáveis estudadas.

Tabela 3.4 – Matriz do planejamento experimental 1.

Experimentos	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais		
	(X ₁) CN	(X ₂) CP	(X ₃) CI	(X ₁) CN (g/L)	(X ₂) CP (g/L)	(X ₃) CI (g/L)
1	-1	-1	-1	0,135	0,033	0,940
2	-1	-1	+1	0,135	0,033	4,000
3	-1	+1	-1	0,135	0,175	0,940
4	-1	+1	+1	0,135	0,175	4,000
5	+1	-1	-1	0,625	0,033	0,940
6	+1	-1	+1	0,625	0,033	4,000
7	+1	+1	-1	0,625	0,175	0,940
8	+1	+1	+1	0,625	0,175	4,000
9	- α	0	0	0,065	0,104	2,470
10	+ α	0	0	0,695	0,104	2,470
11	0	- α	0	0,380	0,008	2,470
12	0	+ α	0	0,380	0,195	2,470
13	0	0	- α	0,380	0,104	0,500
14	0	0	+ α	0,380	0,104	4,400
15	0	0	0	0,380	0,104	2,470
16	0	0	0	0,380	0,104	2,470

Legenda: Concentração de Nitrogênio (CN); Concentração de Fósforo (CP); Concentração de Inóculo (CI)

2° Planejamento: Definição da velocidade de agitação e intervalo de aeração (aeração intermitente) empregando o PCC.

Após a definição das concentrações otimizadas de nitrogênio, fósforo e inóculo (1° planejamento) foram verificadas as influências das variáveis: intervalo de aeração e nível de agitação no processo de biodegradação do efluente contaminado, empregando a mesma cultura mista. As variáveis deste processo foram:

X_1 – Intervalo de aeração (IA_e);

X_2 – Velocidade de Agitação (VA_g).

As respostas acompanhadas durante o processo de biodegradação foram: remoção de TPH, quantificações celulares (peso seco) e pH. Além destas análises, ao final do processo, foi realizada uma análise cromatográfica para identificar a biodegradação de alguns componentes presentes na mistura de combustíveis.

Os valores das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando as seguintes equações de codificação:

$$\text{- Intervalo de Aeração: } X_1 = \left(\frac{IA_e(h) - 30(h)}{18(h)} \right) \quad (3.9)$$

$$\text{- Velocidade de Agitação: } X_2 = \left(\frac{VA_g(rpm) - 120(rpm)}{60(rpm)} \right) \quad (3.10)$$

O valor de α foi de 1,147 para que o PCC fosse ortogonal, empregando três réplicas centrais. O valor de α , foi calculado pela mesma equação citada anteriormente (eq.3.7 e 3.8).

Na Tabela 3.5, estão relacionadas às variáveis do processo e seus respectivos valores, de acordo com seus níveis inferiores, centrais e superiores adotados.

Tabela 3.5- Variáveis de processo e os valores dos seus respectivos níveis.

Variáveis		Níveis				
	Descrição	- α	-1	0	+1	+ α
X_1	Intervalo de Aeração (h)	9	12	30	48	51
X_2	Velocidade de Agitação (rpm)	50	60	120	180	189

Para o desenvolvimento deste planejamento, os valores de intervalo de aeração (IA_e) fixados foram: nível superior (+1) de 48 horas, selecionado de acordo com o trabalho desenvolvido por Vieira *et al.* (2007), no tratamento de efluente sintético contendo óleo diesel e gasolina empregando culturas mistas. O nível inferior (-1) de 12 horas foi adotado, utilizando como referência testes preliminares ao empregar erlenmeyers de 500 mL com volume de efluente de 100 mL. Como nestes reatores a coluna de oxigênio era maior do que a do reator batelada, empregado neste planejamento, optou-se pelo estudo neste menor tempo de intervalo de aeração.

Para a velocidade de agitação (VA_g) foi adotado como nível superior (+1) o valor de 180 rpm. Em estudos preliminares foi verificado, que para valores acima deste ocorreu à formação elevada de espuma, o que provavelmente dificultou a transferência de massa no reator resultando em baixas concentrações de biomassa e remoção de TPH. Para o nível inferior foi adotado o valor (-1) de 60 rpm, pois foi verificado experimentalmente que para valores inferiores a este, a mistura combustível e água foi comprometida, não ocorrendo a homogeneização suficiente da mesma.

A Tabela 3.6 apresenta a matriz do planejamento com os valores codificados e reais das variáveis estudadas X_1 e X_2 .

Tabela 3.6 – Matriz do planejamento experimental 2.

Experimentos	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
	IA_e (h)	VA_g (rpm)	IA_e (h)	VA_g (rpm)
1	-1	-1	12	60
2	-1	+1	12	180
3	+1	-1	48	60
4	+1	+1	48	180
5	- α	0	9	120
6	+ α	0	51	120
7	0	- α	30	50
8	0	+ α	30	189
9 (C)	0	0	30	120
10 (C)	0	0	30	120
11 (C)	0	0	30	120

Obs* IA_e – Intervalo de aeração; VA_g – velocidade de agitação.

3.10 - Estudo Comparativo do Processo de Biodegradação do Efluente Contaminado sob as Condições com Aeração Constante (AC), sem Aeração (SA) e com Aeração Intermitente (AI)

Este estudo foi conduzido para medir o potencial de biodegradação da cultura mista, quando submetida às condições extremas de operação, ou seja, com aeração contínua e sem aeração. Vale salientar, que o reator empregado neste estudo foi o mesmo descrito no item 3.10.1.

As mesmas condições operacionais de agitação (110 rpm), concentrações de nutrientes, (0,509 g/L de nitrogênio e 0,068 g/L de fósforo), inóculo (1,32 g/L) e LCA (2 g/L) foram empregadas nas duas condições, com e sem aeração. A única particularidade apresentada foi na condição aerada na qual foi empregada uma vazão de ar constante de 30 L/h.

3.11 - Análises Quantitativas

3.11.1 - Demanda Química de Oxigênio – DQO

A análise de Demanda Química de Oxigênio (DQO) foi realizada pelo método de oxidação por dicromato de potássio em meio ácido, empregando o procedimento descrito no *Standard Methods* (1998).

3.11.2 – Demanda Bioquímica de Oxigênio – DBO

Para a determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) foi utilizado o Método de incubação a 20°C em cinco dias, descrito no *Standard Methods* (1998).

3.11.3 – Determinação de Fósforo Total

O fósforo foi determinado pelo Método colorimétrico por redução com ácido ascórbico (*STANDARD METHODS*, 1998), usado para determinação de formas específicas de compostos fosforados, em águas e efluentes aquosos. O método é usado numa faixa de 0,01 mg/L a 0,5 mg/L de fósforo. Esta faixa aplica-se a medidas fotométricas efetuadas a 880 nm em células de 20 mm a 25 mm. Maiores concentrações também podem ser

determinadas desde que às amostras sejam convenientemente diluídas ou pela medição da cor em 625 nm a 650 nm.

O método tem como princípio a formação de um complexo de antimônio-fosfato-molibdato, pela reação do molibdato de amônio e do tartarato de potássio e antimônio com o ortofosfato. Este complexo é reduzido pelo ácido ascórbico para formar uma coloração azul característica do complexo de molibdênio. A intensidade da cor é proporcional à concentração de fósforo.

3.11.4 – Determinação de Nitrogênio Total - Método *Kjeldahl*

O método *Kjeldahl* foi usado na quantificação de nitrogênio total, que consiste na determinação da soma do nitrogênio orgânico e nitrogênio amoniacal. O método aplica-se em amostras de água de abastecimento público, águas residuárias e efluentes domésticos, conforme descrito no *Standard Methods* (1998).

Esta metodologia de análise consistiu em três etapas para determinação do nitrogênio total de amostras líquidas. Na primeira etapa do processo foi realizada a digestão da amostra em ácido sulfúrico concentrado na presença da mistura catalisadora (sulfato de cobre/sulfato de potássio- 1/1). A digestão da amostra foi realizada até a obtenção de coloração incolor ou azul clara (digestão de aproximadamente 3 horas).

Na segunda etapa foi realizado o processo de destilação da amostra (após a digestão) na presença da solução de hidróxido de sódio a 60%. A fração da amostra destilada obtida foi recolhida em frascos de erlenmyer de 250 mL, contendo solução de ácido ascórbico a 2%, com 3 gotas de mistura de indicadores (vermelho de metila e verde de bromocresol – 0,1% alcoólica). A destilação foi processada até a virada do indicador de róseo para azul esverdeado. Após a virada foi prorrogado o processo de destilação por mais 15 minutos.

A última etapa consistiu da titulação da amostra destilada com ácido clorídrico a 0,04 N. O ponto de viragem observado foi de azul (esverdeado) para incolor.

A concentração de nitrogênio foi obtida pelas seguintes equações:

$$\text{Nitrogênio (g / L)} = \frac{(V_A - V_B) \times 560}{V_{\text{amostra}} (\text{mL})} \quad (3.11)$$

$$\% \text{Nitrogênio (g / L)} = \frac{N_{\text{ácido clorídrico}} \times (V_A - V_B) \times 100}{V_{\text{amostra}} (\text{mL})} \quad (3.12)$$

Sendo: V_A = Ácido clorídrico gasto na mistura da amostra;

V_B = Ácido clorídrico gasto na titulação do branco;

$V_{amostra}$ = Volume de amostra utilizado;

$N_{ácido\ clorídrico}$ = Normalidade do ácido clorídrico.

3.11.5 – Carbono Orgânico Total

A metodologia e as condições operacionais empregadas na análise de carbono orgânico total (TOC) estão de acordo com a *Standard Methods* (1998), gentilmente realizada pela empresa Cargil Agrícola S/A Uberlândia-MG. Esta análise foi realizada pela técnica de combustão catalítica a alta temperatura, empregando o aparelho *Rosemount Analytical Dohrmann Division*, modelo DC-190.

3.11.6 – Determinação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH)

A dosagem de TPH foi realizada em um espectrofotômetro de infravermelho (equipamento OCMA-350) da marca Horiba, após a extração da fase orgânica da amostra empregando o solvente S-316 (fluorocarbono).

O S-316 é um solvente de propriedade da Horiba usado para a extração de hidrocarbonetos de petróleo em amostras de solo e líquido.

Essa metodologia é adequada para medir hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, independente de sua faixa de carbono. A luz emitida na faixa do infravermelho é usada para irradiar o extrato e medir a concentração de TPH. A análise de infravermelho utilizada para medir TPH envolve medidas de absorbância, visto que as ligações carbono-hidrogênio nos hidrocarbonetos absorvem luz na faixa do infravermelho.

Durante a análise, absorbâncias associadas com as configurações CH, CH₂ e CH₃ são medidas em um comprimento de onda próximo de 3,4 μm. O equipamento opera numa faixa de comprimento de onda de 3,8 a 3,5 μm, sendo capaz de medir as configurações CH (3,8 μm), CH₂ (3,42 μm) e CH₃ (3,50 μm) e possui o *software* para converter as medições em teor total de hidrocarboneto (U. S. EPA, 2001).

Para as análises foram utilizados 10 mL de amostra de efluente e adicionado ácido clorídrico para levar o pH para valor igual ou inferior a 2,0. Posteriormente, os hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) foram extraídos utilizando o solvente S-316. A

leitura foi feita no equipamento OCMA-350 da Horiba devidamente calibrado com a solução *span* - solução preparada a partir de uma concentração conhecida do óleo de calibração (óleo padrão tipo B, fornecido pelo fabricante do instrumento) dissolvida no solvente do teste (S-316).

3.11.7- Quantificação do Crescimento de Biomassa

O crescimento celular das culturas estudadas ao longo do processo foi avaliado pela técnica de massa seca. Após a retirada de 20 mL de amostra do reator, esta foi centrifugada a 12500 rpm por 20 minutos, as células precipitadas foram separadas do sobrenadante e lavadas. Após 3 lavagens consecutivas, a biomassa foi transferida para béqueres de 50 mL e levados à estufa a 90°C, mantidas até peso constante.

3.11.8 - Análise Cromatográfica

Ao final dos experimentos foram realizadas análises de cromatografia gasosa com o intuito de identificar alguns hidrocarbonetos constituintes da mistura de combustíveis e avaliar o potencial de biodegradação da cultura sobre estes compostos.

Antes de cada análise foram feitas extrações da mistura com o solvente *n*-hexano P.A., usando funil de separação de 100 mL de capacidade. Essa extração consistiu na mistura de 50 mL do cultivo com 10 mL de solvente e após a separação das fases, uma alíquota da fase orgânica foi retirada por pipeta volumétrica e alocada em frasco vedado para posterior análise.

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo à gás modelo GC17A equipado com a coluna capilar VARIAN CP-PoraBOND (50m x 0,32 mm) e com dois detectores em série: detector de condutividade Térmica (TCD) seguido pelo Detector de Ionização de Chama (FID). A Tabela 3.7, apresenta as colunas capilares e as condições cromatográficas utilizadas nas calibrações e nas análises de compostos leves (coluna VARIAN CP-PoraBOND Q) e de compostos com mais de 5 carbonos na cadeia (coluna J e W Scientific DB-1).

Os cromatogramas obtidos foram identificados e quantificados usando o tempo de retenção e fatores de resposta destes compostos, relacionando áreas cromatográficas com quantidades molares, obtidos após injeções de padrões contido no kit PIANO da SUPELCO. O kit PIANO é composto de padrão de compostos parafínicos, isoparafínicos, aromáticos, naftênicos e olefinícos.

Tabela 3.7 – Colunas e condições da cromatografia.

Condições	Colunas	
	VARIAN CP-PoraBOND Q	J & Scientific DB-1
Dimensão (L x D)	50m x 0,32 mm	60 m x 0,25 mm
Gás de Arraste e Vazão na Coluna	He, 3 mL/min	He, 1 mL/min
Temperatura do Detector	TCD ³ e FID ² em série a 250°C	FID: 340°C
Temperatura do Injetor	250°C	275°C
Razão de Split	Análises= 1:5 Calibração= 1:5, 1:10, 1:20	1:100
Programa de Temperatura	T _{initial} : 30°C-16 min Rampa 1: 60°C/min até 150°C 150°C por 14 min Rampa 2: 25°C/min até 200°C 200°C por 16 min	T _{initial} : 30°C-10 min Rampa 1: 3°C/min até 325°C 325°C por 142 min
Volume de Amostra Injetada	V _{loop} = 0,30 mL	Análises: V _{loop} = 0,30 mL Calibração: V _{seringa} = 0,10; 0,20 e 0,30 µL Amostras para análises= 1,0 µL

1: L= comprimento da Coluna, D= Diâmetro da Coluna; 2: FID= Chama do Detector de Ionização; 3: TCD= Detector de condutividade Térmica

O método de normalização interna foi empregado para quantificação e consiste na análise preliminar de uma amostra padrão contendo todos os compostos de interesse. Fez-se a relação das áreas obtidas com suas respectivas massas e obteve-se um fator de correção para cada componente (DEBBRECHT, 1985).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Caracterização do Efluente

4.1.1 – Características Gerais do Efluente

Os resultados de caracterização do efluente antes e após a correção das concentrações de nutrientes (nitrogênio e fósforo) estão apresentados na Tabela 4.1. Esta correção foi feita nos estudos de adaptação da cultura C_1 , da cinética de biodegradação e da substituição de extrato de levedo por levedura cervejeira autolizada (LCA). Nesta tabela, pode-se observar, que o efluente apresentou valores elevados de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) e de demanda química de oxigênio (DQO), indicando a elevada carga orgânica. Além disto, podem ser constatadas, as baixas concentrações de nitrogênio e fósforo no efluente do terminal, sendo necessária a adição de nutrientes para possibilitar o processo de biodegradação. A quantidade de nutrientes adicionadas foi baseada na concentração de nutrientes em efluente sintético contendo óleo diesel e gasolina, utilizado por Vieira *et al.* (2007).

Tabela 4.1 - Caracterização do efluente antes e após a correção nas concentrações de nutrientes (adicionado de fertilizantes e extrato de levedo).

Variáveis Medidas	Resultados Antes da Correção de Nutrientes (valor min – valor max)	Resultados Após a Correção de Nutrientes (valor min – valor max)
*TPH (mg/L)	2000 – 2950	2100 – 3050
*DBO _{solúvel} (mg/L)	390 – 500	500 – 700
Óleos ou Graxas (mg/L)	2800 – 4300	2900 – 4400
*DQO _{solúvel} (mg/L)	2500 – 3800	3000 – 4300
Nitrogênio total (mg L ⁻¹)	15 – 35	125 – 192
Fósforo total (mg L ⁻¹)	5 – 15	125 – 140
*TOC (mg L ⁻¹)	2000 – 2950	2100 – 3050
pH	6,5 – 6,8	6,7 – 6,8

*TPH - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo, *DQO - Demanda Química de Oxigênio; *DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio, TOC - Carbono Orgânico Total.

Além disto, verifica-se que após a adição dos fertilizantes e do extrato de levedo ocorreu significativo aumento nas faixas de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e

Demanda Química de Oxigênio (DQO). Tais aumentos podem ser decorrentes da utilização destes componentes, que não apresentavam grau de pureza e seus interferentes (possíveis contaminantes) acabaram aumentando os valores finais de DBO e DQO do efluente.

4.1.2 – Caracterização Cromatográfica do Efluente

Utilizando-se da técnica da cromatografia gasosa identificou-se os seguintes compostos: parafínicos (nC_5 - nC_{13}), isoparafínicos, olefínicos, aromáticos e naftênicos. A Tabela 4.2 apresenta os 30 hidrocarbonetos identificados.

Tabela 4.2- Relação dos principais hidrocarbonetos, identificados pela cromatografia, presentes no efluente contaminado.

Compostos	Identificados	Compostos	Identificados
1	benzeno	16	2,2- dimetilpentano
2	tolueno	17	3- metil hexano
3	etilbenzeno	18	2- metil, nonano
4	<i>m</i> -xileno	19	ciclohexano
5	<i>o</i> - xileno	20	metilciclopentano
6	isopropilbenzeno	21	etilciclopentano
7	<i>n</i> -pentano (nC_5)	22	<i>trans</i> 1,3 dimetil ciclopentano
8	<i>n</i> -hexano (nC_6)	23	isopropil- ciclopentano
9	<i>n</i> -heptano (nC_7)	24	hepteno
10	<i>n</i> -octano (nC_8)	25	3- metil, buteno-1
11	<i>n</i> -decano (nC_{10})	26	1 octeno
12	<i>n</i> -undecano (nC_{11})	27	1 deceno
13	<i>n</i> -dodecano (nC_{12})	28	1 noneno
14	isopentano	29	4- metil, penteno-1
15	2-metil, heptano	30	3- metil, octano

Dentre os aromáticos foram identificados os chamados BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), os quais são relatados em vários estudos científicos como alguns dos contaminantes mais comuns encontrados em solo e em água (BOLDÚ *et al.*, 2002, CUNHA e LEITE 2000, SOLANO-SERENA *et al.*, 1999).

Os BTEX são tóxicos para humanos, e sua remoção de ambiente poluído é de interesse especial, principalmente em água, pelo fato de sua relativa solubilidade neste meio (MEHLMAN, 1990).

4.2 – Adaptação de Culturas Puras e Mista ao Efluente

A Figura 4.1 apresenta os resultados de crescimento de biomassa das culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* PATC e Mista C₁ em efluente contaminado por óleo diesel e gasolina, após a correção nas concentrações de nitrogênio, fósforo e suplementação por extrato de levedo, conforme descrito no item 3.5.

Neste caso, a adaptação ou aclimação foi obtida por intermédio de uma pré-exposição dos microrganismos ao efluente, dando-lhe tempo e condições que pudesse permitir o seu rearranjo enzimático ou, no caso de culturas mistas, atingirem a proporção ideal entre as várias populações presentes. Segundo Spain e Van Veld (1983), os efeitos da adaptação podem ser bem pronunciados quando há a pré-exposição dos microrganismos envolvidos no processo de biorremediação.

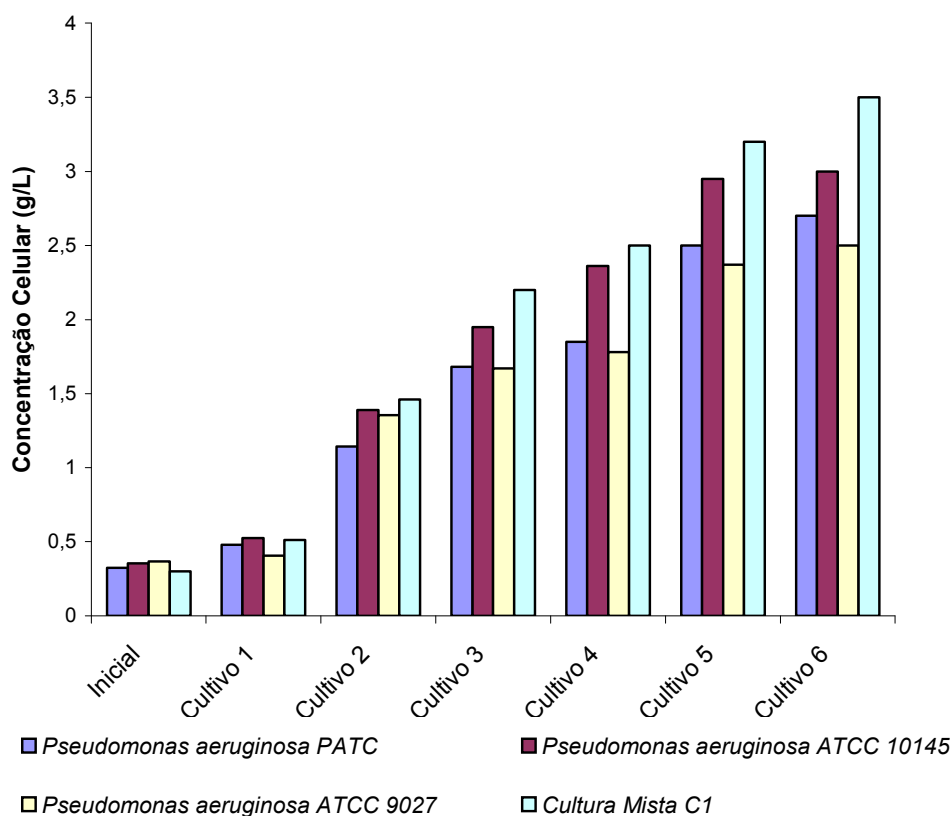


Figura 4.1- Adaptação das 4 culturas estudadas ao efluente após adição de fertilizantes e extrato de levedo.

Pode-se observar pela Figura 4.1, que o procedimento de cultivo sucessivo adotado neste estudo, possibilitou a adaptação das culturas mencionadas ao efluente. Pois, foi observado a cada cultivo sucessivo um aumento na concentração de biomassa das culturas mencionadas.

Na literatura existem vários trabalhos científicos relatando a comparação entre a capacidade de culturas isoladas e mistas no processo de biodegradação de contaminantes derivados de petróleo em solo e em meio líquido (GUO *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2005; OKERENTUGBA e EZERONYE, 2003; YUAN *et al.*, 2000). Nestes trabalhos são relatados os maiores potenciais das culturas mistas, advindas de locais contaminados, em biodegradar os contaminantes derivados de petróleo. Esta capacidade, segundo os autores, está associada a pré-adaptação que as culturas mistas sofreram em seu próprio habitat antes de serem conduzidas nos estudos.

4.3 – Identificação da Cultura Mista C₁

Foi realizada a identificação da cultura C₁, tendo em vista que a mesma apresentou maior potencialidade na degradação do óleo diesel e gasolina. Foram isolados 6 membros pertencentes a esta cultura, dos seis membros isolados 4 foram identificados, sendo eles: *Pseudomonas sp.*, *Serratia sp.*, *Klebsiella* e *Bacillus sp.*

Os gêneros *Pseudomonas*, *Serratia* e *Bacillus* são enumerados na literatura como potenciais produtores de biosurfactantes (moléculas anfipáticas que reduzem a tensão superficial do meio, facilitando a biodisponibilidade dos compostos às bactérias) e segundo relatado por Pruthi e Cameotra (1997), esta característica seria a explicação para a boa performance destas culturas na biodegradação de hidrocarbonetos.

As *Pseudomonas* encontram-se em destaque na literatura pelos freqüentes isolamentos em locais contaminados por petróleo e derivados (GHAZALI *et al.*, 2004; BENTO e GAYLARD, 2001; YUAN, *et al.*, 2000; RICHARD e VOGEL, 1999; FOGHT, *et al.*, 1999). A literatura relata também vários experimentos de degradação de petróleo e derivados utilizando-se espécies de *Serratia*, com excelentes rendimentos (CUNHA *et al.* 2004; WILSON *et al.*, 1999; BENKACOKER e EKUNDAYO, 1997; AMADI, 1992).

O gênero *Bacillus* tem sido frequentemente reportado na literatura como potencial degradador de hidrocarbonetos (GHAZALI *et al.*, 2004; HUN *et al.* 2003; OKERENTUGBA E EZERONYE, 2003; BENKACOKER e EKUNDAYO, 1997; DIAZ *et al.*, 2000).

Em relação a *Klebsiella* são poucos os registros em estudos científicos sobre o seu potencial em biodegradar hidrocarbonetos (Okerentugba e Ezeronye, 2003).

No estudo de Ghazali *et al.*, (2004) foram isolados de solos contaminados por hidrocarbonetos os gêneros *Bacillus sp.* e *Pseudomona sp.* para o estudo do potencial destes em biodegradar óleo cru, benzeno, etilbenzeno, *o*-xileno, *n*-tetradecano, octanol e decanol.

Okerentugba e Ezeronye (2003), isolaram os gêneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* de rios contaminados por hidrocarbonetos e de efluente de refinaria para o estudo do potencial de degradação de petróleo por estes microrganismos.

4.4 – Cinética de Culturas Puras e Mista

Esta etapa foi realizada com o objetivo de determinar o tempo a ser empregado no estudo da substituição de extrato de levedo por levedura cervejeira autolizada (LCA) e na otimização das variáveis selecionadas utilizando planejamento composto central.

Os experimentos foram monitorados ao longo de 42 dias, pois esse tempo foi suficiente para verificar um longo período em que a biodegradação manteve-se constante. Esta etapa foi importante para selecionar a cultura que apresentasse maior consumo de hidrocarbonetos, portanto maiores remoções de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) para estudos posteriores.

4.4.1 – Cinética de Crescimento Celular

A Figura 4.2 mostra os resultados de crescimento celular dos microrganismos estudados *Pseudomonas aeruginosa* PATC (isolada), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e cultura mista C₁, ao longo dos 42 dias de processo.

Por meio da Figura 4.2, pode-se observar, que nenhuma das quatro culturas estudadas apresentou fase lag no início do processo ou mesmo fase endógena (fase de morte). Como as culturas já haviam passado por uma pré-adaptação, isto pode justificar a ausência da fase lag.

Segundo SWINNEN *et al.* (2004), a fase lag é tipicamente um fenômeno observado como um atraso na resposta da população a uma mudança no ambiente. Sendo, um período de ajuste durante o qual, as células das bactérias se modificam para iniciar o crescimento exponencial.

Além disto, verifica-se que até o sétimo dia de processo ocorre a fase exponencial, para todas as culturas. Após este período o crescimento é praticamente estabilizado até o final do processo para as culturas mista e a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e até o trigésimo quinto dia, para as culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Pseudomonas aeruginosa* PATC. Para as culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Pseudomonas aeruginosa* PATC, foi observado um ligeiro aumento na concentração de biomassa após o trigésimo quinto dia.

Esta longa fase de estabilização (a partir do sétimo dia) observada em todas as condições estudadas sugere a ocorrência de uma nova etapa de adaptação decorrente de mudanças nas características do meio, após a degradação inicial dos contaminantes. Ou mesmo, relacionado ao início da fase de desativação dos sistemas metabólicos dos microrganismos, comprometendo seu crescimento.

Comparando os resultados de concentração de biomassa das culturas estudadas, pode-se verificar, que a maior capacidade de crescimento no efluente foi observado em relação às culturas: mista (C_1) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, nesta ordem. As demais culturas apresentaram crescimento inferior ao longo do processo. Porém, os perfis de comportamento das concentrações celulares em função do tempo foram semelhantes para todas as culturas estudadas, apresentando pequenas variações quantitativas até o quadragésimo segundo dia de processo.

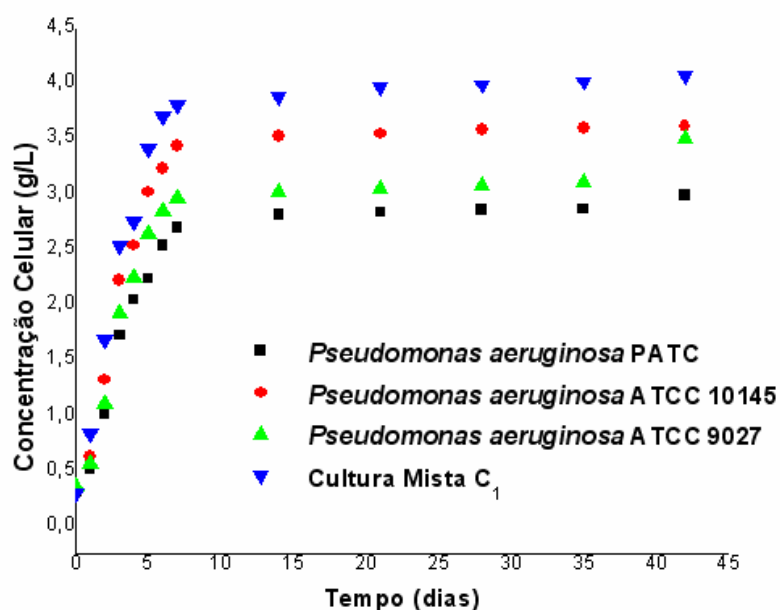


Figura 4.2- Crescimento de biomassa das 4 culturas estudadas durante os 42 dias de processo.

4.4.2 – Cinética de Biodegradação

Os resultados obtidos de concentrações e remoções de TPH estão apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4 ao longo dos 42 dias de processo.

De acordo com as Figuras 4.3 e 4.4, verifica-se pelas curvas de concentrações e remoções de TPH, que o maior consumo de hidrocarbonetos foi obtido nos primeiros 7 dias de processo, para todas as culturas estudadas.

Os valores de percentuais de remoções referentes a este período (7dias) foram: 66; 69,8; 74,6 e 76,3, para as culturas *Pseudomonas aeruginosa* PATC, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e mista C₁, respectivamente. A partir deste período foi observada uma sensível queda nas concentrações de hidrocarbonetos até o final do processo. O mesmo comportamento foi verificado em relação à concentração de biomassa (Figura 4.2).

Após os 42 dias de operação as remoções em porcentagem foram: 71,5; 77,8; 77,8 e 80,4, para as mesmas culturas listadas na ordem anteriormente mencionada.

Destes resultados verifica-se, que das culturas estudadas as *Pseudomonas aeruginosa* PATC foram as que menos degradaram os hidrocarbonetos, durante todo o processo.

No estudo desenvolvido por Richard e Vogel (1999), a cinética de biodegradação do óleo diesel proporcionou os seguintes resultados de remoção de TPH (%): 64,1 para a cultura isolada *Acromobactéria anthropi* e 90 para um consórcio (obtido do solo de um local contaminado por hidrocarbonetos) ao final de 50 dias de processo, utilizando um meio mineral com uma concentração inicial de óleo diesel de aproximadamente 1% v/v. Além destes resultados, foram também obtidos baixos valores de remoção de TPH, empregando microrganismos isolados como *Pseudomonas fluorescense* denominadas de P₂ e P₂₅, os quais apresentaram remoções de TPH inferiores a 20%, ao final dos 50 dias.

Se compararmos os melhores resultados obtidos por estes autores com os resultados obtidos no presente trabalho (Figura 4.4), pode-se observar que as culturas C₁ e a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 apresentaram valores de remoções de TPH superiores aos valores obtidos no estudo de Richard e Vogel. Este fato mostra, a importância da escolha das culturas com capacidade metabólica em biodegradar os contaminantes.

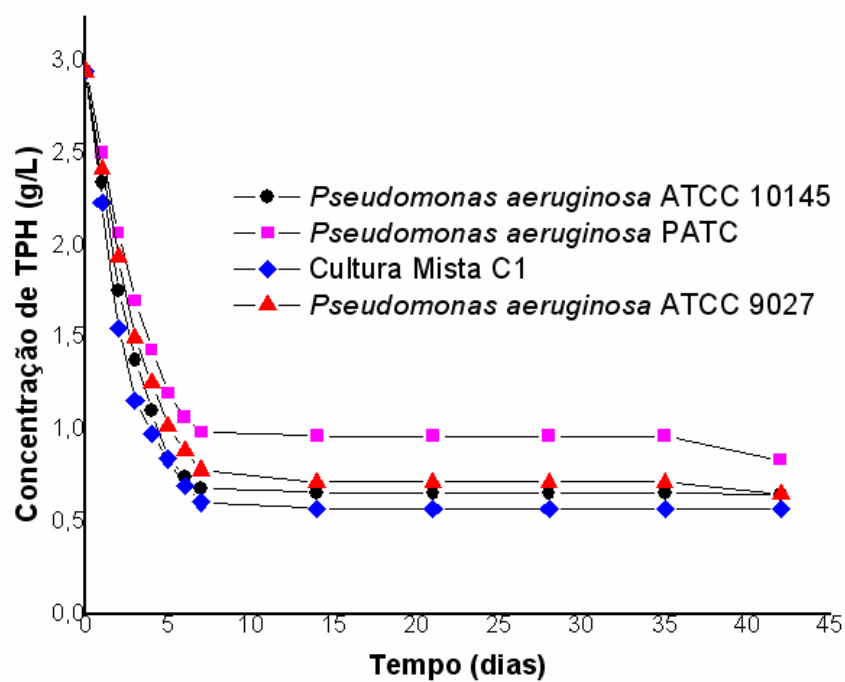


Figura 4.3- Concentrações de TPH ao longo dos 42 dias de processo, empregando as 4 culturas estudadas.

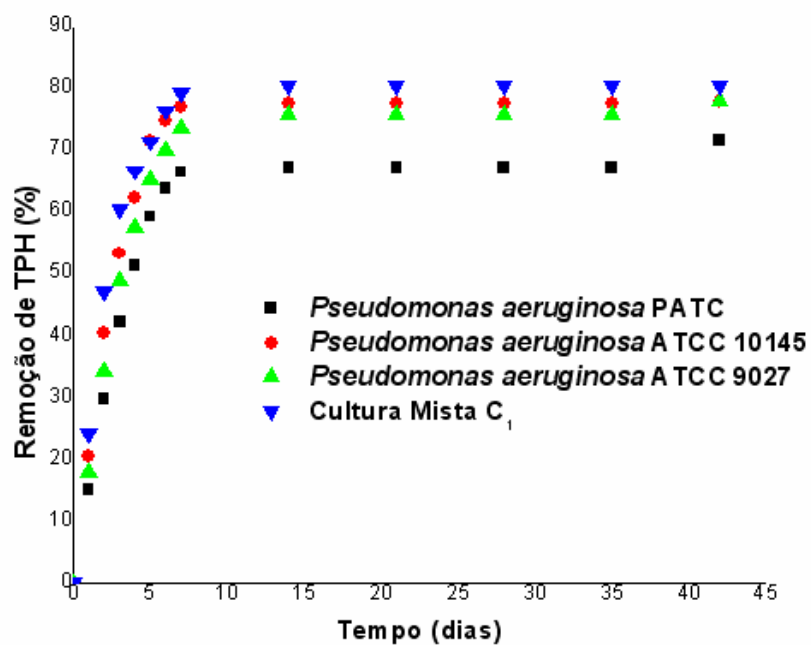


Figura 4.4- Remoções de TPH ao longo dos 42 dias de processo, empregando as 4 culturas estudadas.

4.4.3 – Modelagem da Cinética de Crescimento Celular e de Biodegradação

As Figuras 4.5 e 4.6 mostram, os resultados dos ajustes dos parâmetros dos modelos adotados aos dados experimentais de crescimento de biomassa e biodegradação, ao longo dos 42 dias de processo.

A Figura 4.5 mostra os ajustes do modelo logístico não estruturado descrito Verhulst-Pearl aos dados experimentais de crescimento de biomassa, para todas as culturas estudadas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* PATC e mista C₁). As linhas cheias e tracejadas desta figura mostram os resultados do modelo citado, juntamente aos dados experimentais (representados por símbolos). Ao analisar este conjunto de dados, pode-se verificar, que houve um bom ajuste entre o modelo e os dados experimentais pela proximidade entre os valores obtidos.

Da mesma forma, o ajuste do modelo proposto para a biodegradação (aproximação do modelo de Luedeking Piret) aos dados experimentais, mostraram-se bem ajustados conforme apresentado na Figura 4.6.

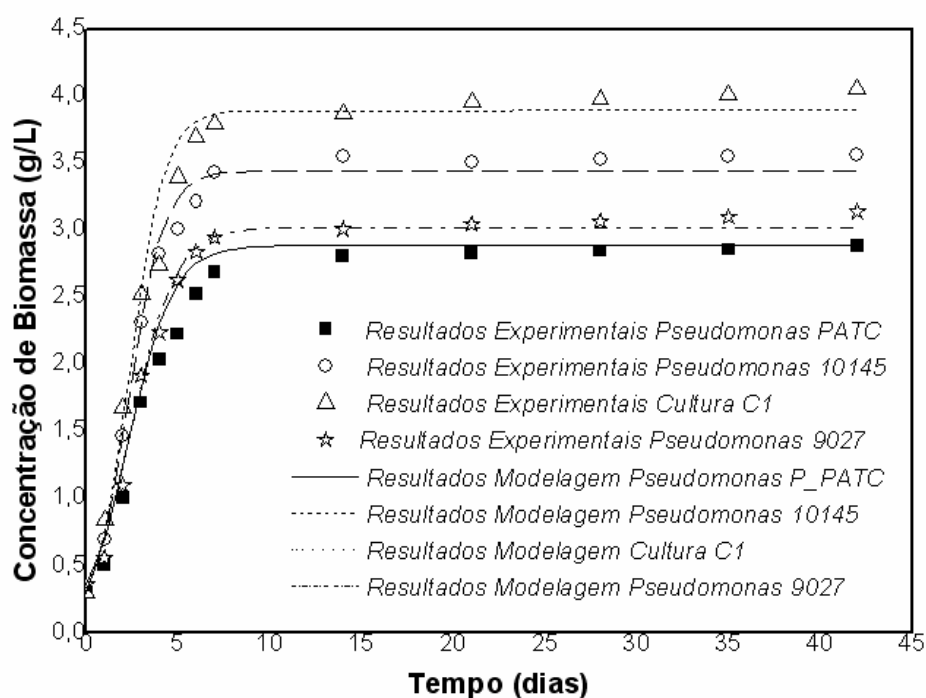


Figura 4.5 – Resultados da modelagem da cinética de crescimento celular ao longo dos 42 dias de processo, para as 4 culturas estudadas.

Como resultado destes ajustes a Tabela 4.3, mostra os valores dos parâmetros ajustados para o crescimento como μ_{max} e X^* e biodegradação dos contaminantes como $Y_{x/s}$, para cada cultura empregada.

Tabela 4.3- Valores dos parâmetros ajustados para cada cultura empregada, segundo os modelos adotados.

Parâmetros Ajustados			
Culturas	$\mu_{max} \pm \text{desvio}$ (d ⁻¹)	$X^* \pm \text{desvio}$ (g/L)	$Y_{x/s} \pm \text{desvio}$ (gX/gS)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PATC	0,82 ± 0,02	3,02 ± 0,04	1,18 ± 0,18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	1,02 ± 0,03	3,45 ± 0,05	1,37 ± 0,02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0,82 ± 0,02	3,02 ± 0,04	1,18 ± 0,02
Cultura Mista C ₁	1,05 ± 0,05	3,90 ± 0,08	1,48 ± 0,02

A Tabela 4.3 mostra, que a cultura C₁ e a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 apresentaram maiores valores de μ_{max} de aproximadamente 1,0 d⁻¹ e as demais culturas, apresentaram valores de μ_{max} estatisticamente iguais de aproximadamente 0,8 d⁻¹.

Em relação à degradação dos contaminantes, verifica-se que o valor $Y_{x/s}$ foi maior para a cultura mista e para a cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Estes resultados comprovam as discussões anteriores (itens 4.4.1 e 4.4.2), em relação ao maior desempenho de biodegradação dos contaminantes e aumento do crescimento observados em relação às culturas C₁ e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.

Yerushalmi e Guiot (1998), estudaram a cinética de biodegradação aeróbia de gasolina, empregando uma cultura microbiológica isolada de amostras de solo contaminado por óleo. Para a cinética de biodegradação da gasolina eles obtiveram um μ_{max} variando de 0,72 a 5,04 d⁻¹, enquanto o rendimento de biomassa sobre a gasolina degradada $Y_{x/s}$ variou de 0,43 a 0,69 mg/mg. A grande faixa de valores de μ_{max} obtidas por estes autores, pode ser justificada, pelo fato do processo ter sido conduzido sob aeração constante. Geralmente, este tipo de processo proporciona maiores valores de μ_{max} , quando comparados aos processos anaeróbios.

Comparando os resultados obtidos pelos autores citados anteriormente, com os resultados obtidos no presente estudo (Tabela 4.3), pode-se verificar, que os valores de μ_{max} mostraram-se dentro da faixa obtida por Yerushalmi e Guiot (1998). E o rendimento ($Y_{x/s}$) apresentou-se com maiores valores do que o encontrado por estes autores. Isto mostra, que as culturas estudadas estavam capacitadas em crescer no meio com presença da mistura de combustíveis (óleo diesel e gasolina) e sob aeração intermitente.

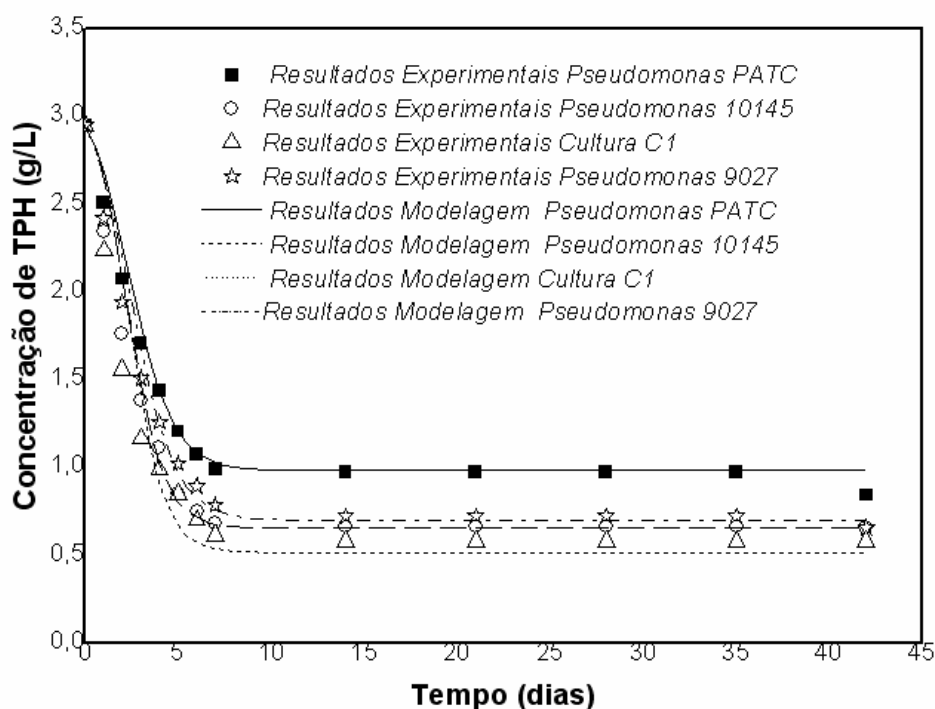


Figura 4.6 – Resultados da modelagem da cinética da concentração de TPH durante 42 dias de processo, para as 4 culturas estudadas.

4.5 – Estudo da Substituição de Extrato de Levedo no Meio por Resíduo de Levedura Cervejeira Autolizada (LCA)

Este estudo pesquisou a substituição do extrato de levedo por levedura cervejeira autolizada (LCA) no efluente, visando diminuir os custos de processo. Pois, o valor agregado do extrato de levedo elevaria os custos finais do tratamento.

Para o desenvolvimento desta etapa foram realizados dois estudos em paralelo, empregando as culturas mista C₁ e as *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, que apresentaram melhores resultados de redução de TPH, na etapa da cinética de biodegradação (item 4.4). Além disto, foram adotadas várias concentrações de LCA, para a escolha da concentração que proporcionasse maiores remoções de TPH, portanto maior biodegradação dos contaminantes.

As concentrações de LCA adotadas foram realizadas com base em concentrações superiores e inferiores ao valor utilizado de extrato de levedo (2 g/L). Vale salientar, que para a seleção da melhor concentração de LCA foi utilizado como parâmetro de comparação os

resultados obtidos de crescimento celular e remoção de TPH, empregando o extrato de levedo a 2 g/L, no mesmo período de tempo adotado (itens 4.4.1 e 4.4.2).

O tempo de operação adotado de 14 dias de processo foi estipulado com base nos resultados obtidos na etapa da cinética de biodegradação estudada no item 4.4. Pois, durante este último estudo foi observado, que após o décimo quarto (14º) dia até o final dos 42 dias de operação, praticamente não ocorreu aumento nas remoções de TPH para as culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e mista. Por isso, não haveria necessidade de prolongar o tempo de processo, além dos 14 dias.

4.5.1 – Crescimento Celular

A Tabela 4.4 mostra os resultados de crescimento de biomassa das culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e mista C₁ ao final de 14 dias de processo, nas várias concentrações de LCA. A fim de facilitar a comparação entre o crescimento dos microrganismos na presença de concentrações de LCA e extrato de levedo, esta tabela apresenta os resultados de ambos os casos.

Tabela 4.4- Crescimento celular para as culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e mista C₁ empregando LCA em várias concentrações e extrato de levedo a 2g/L.

Culturas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145			Cultura Mista C ₁	
Concentração Celular (g/L)			Concentração Celular (g/L)	
Concentração de Levedura Cervejeira Autolizada (g/L)	0 dias	14 dias	0 dias	14 dias
0,5	0,36 ± 0,09	2,32 ± 0,14	0,32 ± 0,11	2,71 ± 0,08
1,0	0,33 ± 0,11	2,64 ± 0,10	0,30 ± 0,09	3,02 ± 0,13
2,0	0,32 ± 0,08	3,21 ± 0,21	0,29 ± 0,05	3,61 ± 0,18
3,0	0,29 ± 0,13	3,01 ± 0,15	0,33 ± 0,07	3,43 ± 0,15
4,0	0,34 ± 0,09	2,87 ± 0,12	0,36 ± 0,05	3,17 ± 0,11
Extrato de Levedo (2g/L)	0,30 ± 0,06	3,52 ± 0,32	0,30 ± 0,07	3,87 ± 0,22

De acordo com a Tabela 4.4 pode-se observar, que houve crescimento de biomassa de todas as culturas estudadas nas várias concentrações de LCA, não sendo observado nenhum efeito de inibição pelo emprego destas concentrações. Porém, observa-se que até a concentração de LCA de 2g/L foi verificada uma relação direta entre o aumento de LCA e a concentração de biomassa. Após tal valor, o aumento na concentração de LCA ocasionou

diminuições nas concentrações de biomassa, para ambas as culturas. Este comportamento sugere, algumas possíveis causas para este comportamento, sendo elas:

- 1) Por se tratar de um resíduo de cervejaria, a LCA pode conter em sua composição componente (s) que cause inibição no crescimento das culturas, quando presentes em maiores concentrações;
- 2) A presença de elevada concentração de subproduto (s) inibidor do crescimento decorrente do metabolismo, quando empregadas maiores concentrações de LCA;
- 3) Os microrganismos podem estar dando preferência ao consumo de LCA, mais facilmente biodegradável, em relação aos hidrocarbonetos presentes, e a presença destes hidrocarbonetos pode gerar efeito inibitório do crescimento dos microrganismos.

Além disto, verifica-se pela Tabela 4.4, que a substituição do extrato de levedo por LCA na concentração de 2 g/L, proporcionou concentração de biomassa próxima ao obtido empregando extrato de levedo a 2g/L.

Segundo Yamada *et al.* (2003), as leveduras inativas nas formas íntegras, autolizadas ou como extrato apresentam elevado teor em proteína (30 a 70%), vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina), minerais, macro e microelementos. O que diferencia estas formas de obtenção do tipo de levedura é o processo de obtenção de cada uma e os seus teores percentuais em relação a cada componente presente. Isto sugere, o bom desempenho de crescimento das culturas após a substituição do extrato de levedo por LCA.

4.5.2 – Biodegradação

As Figuras 4.7 e 4.8 apresentam as porcentagens de remoções de TPH para cada experimento nas concentrações de LCA estudadas, empregando as culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e C₁, considerando as perdas abióticas.

Por meio da Figura 4.7, pode-se observar que as concentrações de LCA empregadas de 0,5 a 4,0 g/L, promoveram remoções de TPH que variaram de 54 a 77,2%, ao empregar a cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Em relação à cultura C₁ as remoções observadas variaram de 59 a 79,5% (Figura 4.8). Ao comparar estes resultados verifica-se, que a cultura C₁ apresentou maior potencialidade em biodegradar os contaminantes, pois

apresentou nas várias concentrações de LCA (ao final de 14 dias de processo) valores de remoções de TPH superiores ao obtido empregando a cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.

Ao analisar os efeitos das concentrações de LCA na remoção de TPH, empregando ambas as culturas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e C₁), verifica-se que o aumento na concentração de LCA de 0,5 para 4,0 g/L, ocasionou um aumento na remoção de TPH até a concentração de 2 g/L. A partir desta concentração foi verificada uma ligeira queda na remoção de TPH, ao longo do processo. Tal fato pode ser verificado pelos perfis de remoção obtidos nas Figuras 4.7 e 4.8. Este mesmo comportamento foi observado em relação ao crescimento de biomassa (item 4.5.2), sugerindo que a diminuição na concentração de biomassa promoveu diretamente uma diminuição na remoção de TPH. Em relação a cultura mista, este fato pode estar relacionado a diminuição dos microrganismos potencialmente degradadores de hidrocarbonetos, justificando a queda na remoção de TPH.

Comparando os resultados das Figuras 4.7 e 4.8, verifica-se que a concentração de LCA de 2 g/L apresentou o melhor resultado de remoção de TPH durante todo o processo, para ambas as culturas. Ao final dos 14 dias de processo, nesta melhor concentração, os resultados de remoções de TPH foram 77,2 e 79,5% para as culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e C₁, respectivamente. Valores que foram muito próximos ao obtido ao empregar extrato de levedo na concentração de 2 g/L, que proporcionou remoções de 77,5 e 80,4 %. Desta forma, pode-se afirmar que foi possível substituir o extrato de levedo por LCA sem comprometer o processo de biodegradação.

Como a cultura C₁ apresentou maior potencialidade em degradar os contaminantes presentes no efluente, esta foi escolhida para os estudos subseqüentes. Vale salientar, que apesar da cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 também apresentar potencial para tratar efluentes contaminados por derivados de petróleo, a escolha pela cultura mista levou em consideração a maior praticidade de manipulação e conservação da cultura mista C₁. Além disto, como esta cultura tem apresentando uma melhor resposta de biodegradabilidade a cada estudo de otimização das condições operacionais realizadas, desde a sua adaptação em efluente sintético (VIEIRA, 2004), estes resultados vêm comprovar a sua potencialidade em biodegradar contaminantes derivados de petróleo.

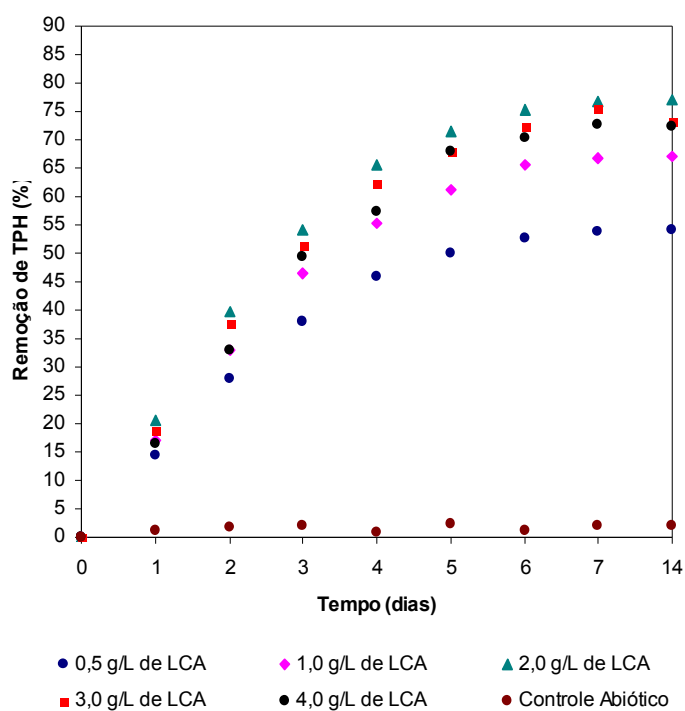


Figura 4.7 – Remoção de TPH para cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, ao longo dos 14 dias de processo.

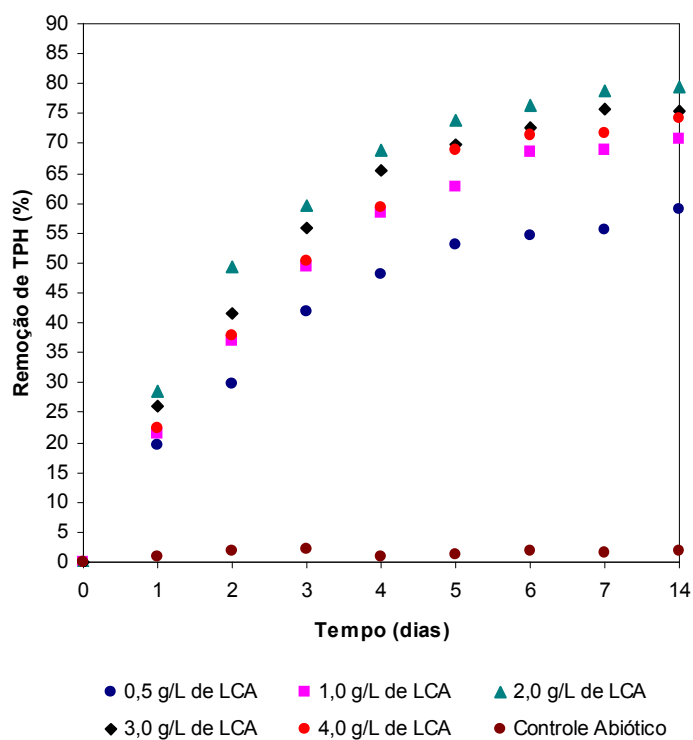


Figura 4.8 – Remoção de TPH para cultura C₁, ao longo dos 14 dias de processo.

4.6 - 1º Planejamento Experimental – Otimização das Concentrações de Nutrientes e da Concentração de Inóculo

Os resultados médios de remoção de TPH e biomassa obtidos no planejamento composto central (PCC), a partir das variáveis estudadas: concentração de nitrogênio (CN), concentração de fósforo (CP) e concentração de inóculo (CI), empregando a cultura mista C₁ encontram-se na Tabela 4.5.

Para as respostas de remoções de TPH apresentadas já foram subtraídas as perdas abióticas, para cada experimento. Vale salientar, que os resultados relacionados às concentrações de biomassa apresentados nesta tabela, relacionam a variação na concentração de biomassa (ΔC_{bm} – aumento na biomassa) verificada ao final de cada experimento após 3 dias de processo. Isto se tornou necessário, pois como a concentração de inóculo é uma variável independente do planejamento, esta apresentou valores diferenciados no início do processo.

Tabela 4.5- Resultados de remoções de TPH e crescimento celular, em diferentes condições experimentais de acordo com a matriz do planejamento composto central.

Exp.	CN (g/L)	CP (g/L)	Relação C:N:P	CI (g/L)	Remoção de TPH (%)	ΔC_{bm} (g/L)
1	0,135	0,033	100 : 5,4 : 1,3	0,940	55,1 ± 1,0	1,12 ± 0,09
2	0,135	0,033	100 : 5,4 : 1,3	4,000	47,7 ± 2,0	0,77 ± 0,05
3	0,135	0,175	100 : 5,4 : 7,0	0,940	45,5 ± 2,0	0,67 ± 0,12
4	0,135	0,175	100 : 5,4 : 7,0	4,000	35,4 ± 1,0	0,25 ± 0,03
5	0,625	0,033	100 : 25,0 : 1,3	0,940	68,8 ± 2,0	1,48 ± 0,15
6	0,625	0,033	100 : 25,0 : 1,3	4,000	50,9 ± 1,0	0,85 ± 0,06
7	0,625	0,175	100 : 25,0 : 7,0	0,940	54,7 ± 3,0	0,95 ± 0,11
8	0,625	0,175	100 : 25,0 : 7,0	4,000	43,1 ± 2,0	0,60 ± 0,04
9	0,065	0,104	100 : 2,6 : 4,1	2,470	44,4 ± 1,0	0,64 ± 0,01
10	0,695	0,104	100 : 27,8 : 4,1	2,470	65,9 ± 1,0	1,27 ± 0,17
11	0,380	0,008	100 : 15,2 : 0,3	2,470	66,5 ± 2,0	1,22 ± 0,09
12	0,380	0,195	100 : 15,2 : 7,8	2,470	40,9 ± 3,0	0,34 ± 0,02
13	0,380	0,104	100 : 15,2 : 4,1	0,500	68,4 ± 1,0	1,41 ± 0,12
14	0,380	0,104	100 : 15,2 : 4,1	4,400	45,9 ± 2,0	0,68 ± 0,35
15 (C)	0,380	0,104	100 : 15,2 : 4,1	2,470	71,0 ± 1,0	1,58 ± 0,08
16 (C)	0,380	0,104	100 : 15,2 : 4,1	2,470	69,8 ± 2,0	1,63 ± 0,15

Obs* CN – concentração de nitrogênio; CP – concentração de fósforo; CI – concentração de inóculo e TPH – hidrocarbonetos totais de petróleo, ΔC_{bm} – variação da concentração de biomassa.

Neste planejamento foram adotados 3 dias de biodegradação, pois desejava-se otimizar uma condição de processo em menor tempo de operação. Por outro lado, o planejamento poderia tornar-se experimentalmente inviável para tempos muito longos de processo. Além disto, para tempos maiores poderia ocorrer que alguns experimentos do planejamento não apresentassem diferenças significativas de remoção o que poderia comprometer a realização da otimização.

Observa-se nesta tabela, que os resultados de remoção de TPH e concentração de biomassa variaram entre 35,4 (ensaio 4) a 71% (ensaio 15), e 0,250 a 1,630 g/L, respectivamente, após 3 dias de biodegradação. Verifica-se também, que os melhores resultados, de todas as respostas avaliadas, foram obtidos nos experimentos localizados no ponto central (experimentos 15 e 16).

4.6.1 - Análise de Regressão dos Resultados Obtidos para a Remoção de TPH a partir das Variáveis Estudadas

Com os resultados obtidos na Tabela 4.5 foi possível analisar estatisticamente o comportamento de remoção de TPH. Para isto, determinaram-se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa *Statistic 7*.

Os resultados obtidos desta análise estão apresentados na Tabela 4.6 e na Equação 4.1, nos quais são mostrados os parâmetros significativos e não significativos, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

Tabela 4.6- Resultados da regressão múltipla para remoção de TPH, com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante (β_0)	+67,55	0,0000
X_1 (CN)	+5,43	0,0133
X_2 (CP)	-6,78	0,0049
X_3 (CI)	-6,71	0,0051
X_1^2 (CN ²)	-6,20	0,0328
X_2^2 (CP ²)	-7,08	0,0198
X_3^2 (CI ²)	-4,99	0,0679
$X_1 X_2$ (CN/CP)	+0,03	1,0000
$X_1 X_3$ (CN/CI)	-1,5	0,4511
$X_2 X_3$ (CP/CI)	+0,45	0,8170
$R^2 = 0,923$		

Após a eliminação dos parâmetros não significativos com $p > 0,10$, foi obtida as seguintes relações apresentadas na Tabela 4.7. E a equação resultante deste ajuste está apresentada na Equação 4.2.

$$\text{Remoção de TPH (\%)} = 67,55 + 5,43X_1 - 6,20X_1^2 - 6,78 X_2 - 7,08 X_2^2 - 6,71 X_3 - 4,99 X_3^2 - 0,03 X_1 X_2 - 1,5 X_1 X_3 + 0,45 X_2 X_3 \quad (4.1)$$

Os parâmetros não significativos desprezados foram relacionados apenas aos termos das interações: concentração de nitrogênio/concentração de inóculo (X_1X_3); concentração de fósforo/concentração de inóculo (X_2X_3) e concentração de nitrogênio/concentração de fósforo (X_1X_2), respectivamente.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,91 indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 91% da variabilidade dos dados (Eq. 4.2).

Observa-se pela Equação 4.2, que a remoção de TPH foi influenciada somente pelas variáveis isoladas X_1 (concentração de nitrogênio), X_2 (concentração de fósforo) e X_3 (concentração de inóculo). Os sinais negativos dos coeficientes das variáveis X_2 e X_3 nesta equação, indicam que nas condições de maiores concentrações de fósforo e inóculo, menores são os valores de remoções de TPH obtidos, ou seja, os aumentos destas variáveis ocasionam uma diminuição no valor deste atributo.

Este comportamento pode ser verificado pela Tabela 4.5, de acordo com os experimentos 11 e 12, e 13 e 14, os quais apresentam nesta ordem, os níveis mínimos e máximos adotados para estas variáveis, respectivamente.

Tabela 4.7- Resultados da regressão múltipla para remoção de TPH, apresentando apenas as variáveis significantes com seus respectivos parâmetros e níveis de significância.

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante (β_0)	+67,55	0,0000
X_1 (CN)	+5,43	0,0030
X_2 (CP)	- 6,78	0,0007
X_3 (CI)	- 6,71	0,0008
X_1^2 (CN ²)	-6,20	0,0109
X_2^2 (CP ²)	-7,08	0,0053
X_3^2 (CI ²)	-4,99	0,0299
$R^2 = 0,91$		

$$\text{Remoção de TPH (\%)} = 67,55 + 5,43X_1 - 6,20X_1^2 - 6,78X_2 - 7,08X_2^2 - 6,71X_3 - 4,99X_3^2 \quad (4.2)$$

Nas condições dos experimentos 11 e 12 verifica-se, que o aumento na concentração de fósforo de 0,008 para 0,195 g/L, mantendo fixas as concentrações de nitrogênio e inóculo em 0,380 e 2,47 g/L, proporcionaram uma diminuição considerável na remoção de TPH que passou de $66,5 \pm 2,0$ para $40,9 \pm 3,0\%$.

O mesmo comportamento foi verificado ao aumentar a concentração de inóculo de 0,50 para 4,4 g/L (experimentos 13 e 14), mantendo as concentrações de nitrogênio e fósforo fixas em 0,380 e 0,104 g/L. Nestas condições foi observado uma queda na remoção de TPH de $68,4 \pm 1,0$ para $45,9 \pm 2,0$, respectivamente.

Ao contrário destes comportamentos, o sinal positivo da variável X_1 , indica que o aumento na resposta remoção está diretamente relacionado ao aumento desta variável. Isto pode ser verificado e conferido pela comparação dos resultados obtidos nos experimentos 9 e 10. Por meio destes experimentos observa-se, que o aumento na concentração de nitrogênio de 0,065 para 0,695 g/L, mantendo fixa as concentrações de fósforo em 0,104 g/L e inóculo em 2,47 g/L, proporcionaram um aumento significativo e positivo na remoção de TPH de $44,4 \pm 1\%$ para $65,9 \pm 1\%$. Nesta situação, as relações C:N foram de 100:2,6 e 100:27,8, respectivamente. Isto mostra, que nas condições empregadas, o aumento da concentração de nitrogênio de quase 10 vezes não provocou efeito inibidor na biodegradação dos contaminantes.

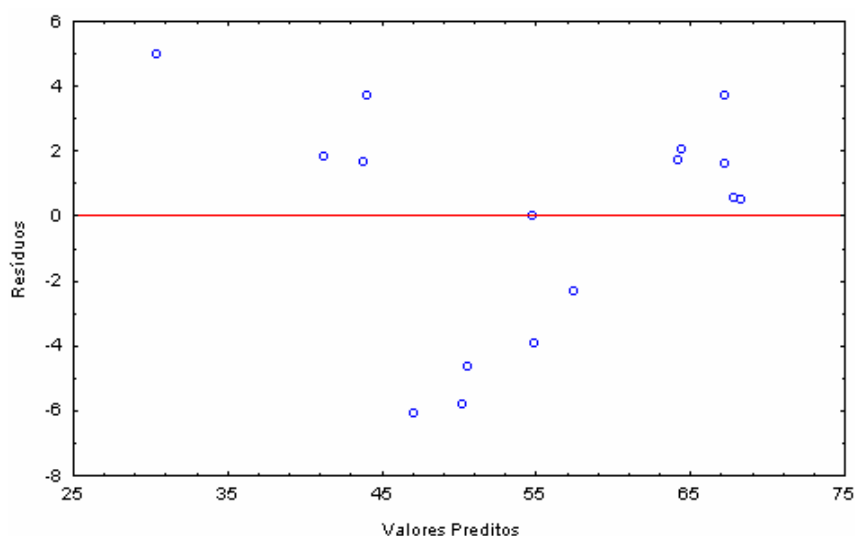


Figura 4.9 – Distribuição dos resíduos relativa à remoção de TPH.

Com os resultados obtidos foi possível verificar os comportamentos de resíduos e dos valores preditos em função dos observados graficamente, de acordo com as Figuras 4.9 e 4.10.

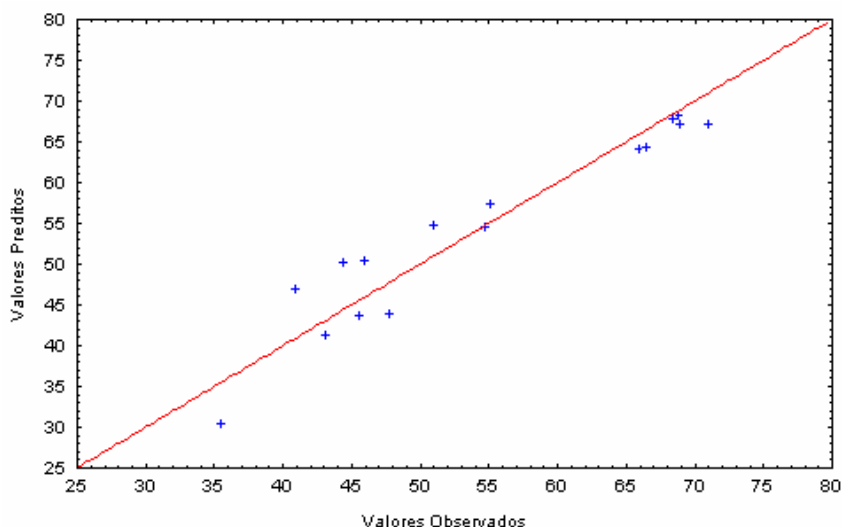


Figura 4.10 – Valores preditos em função dos observados relativos à remoção de TPH.

Observando a Figura 4.9, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência.

Por meio da Figura 4.10 nota-se, que os valores dos resultados experimentais para remoção de TPH apresentaram bem próximos aos valores fornecidos pela equação empírica.

Para ilustrar os efeitos das variáveis na biodegradação dos contaminantes (óleo diesel e gasolina) pela cultura C_1 , estão apresentadas nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 as superfícies de resposta e as curvas de contorno. Estas figuras mostram a região de otimização das variáveis em suas formas codificadas e reais, duas a duas, em relação à resposta remoção de TPH.

Verifica-se, que as regiões de otimização, mostrada nestas figuras, apresentam as seguintes faixas de concentrações de nitrogênio 0,30 a 0,65 g/L, fósforo de 0,02 à 0,12 g/L e inóculo 0,5 a 2,5 g/L.

Com o objetivo de encontrar o ponto estacionário para a remoção de TPH, ou seja, o ponto correspondente de maximização da resposta remoção de TPH dentro da região de otimização foi realizada a implementação de um algoritmo no programa *Maple V release 4*. Este procedimento foi adotado com intuito de definir a condição operacional dentro da região de otimização. Os valores codificados destes pontos foram os seguintes: $X_1= 0,53$; $X_2= -0,50$ e $X_3= -0,77$.

Utilizando as equações de codificação (3.4), (3.5) e (3.6), foi possível calcular os valores das variáveis em sua forma real, resultando em:

$$X_1 = 0,509 \text{ g/L de nitrogênio}$$

$$X_2 = 0,068 \text{ g/L de fósforo}$$

$$X_3 = 1,32 \text{ g/L de inóculo}$$

A partir dos valores codificados das variáveis X_1 , X_2 e X_3 no ponto de máximo determinou-se pela Equação 4.1, que o percentual de remoção de TPH neste ponto foi de 73%, teoricamente. Comparando este valor teórico (73%) com os valores experimentais da Tabela 4.5 verifica-se, que o experimento 15 foi o que mais se aproximou deste valor com 71% de remoção de TPH.

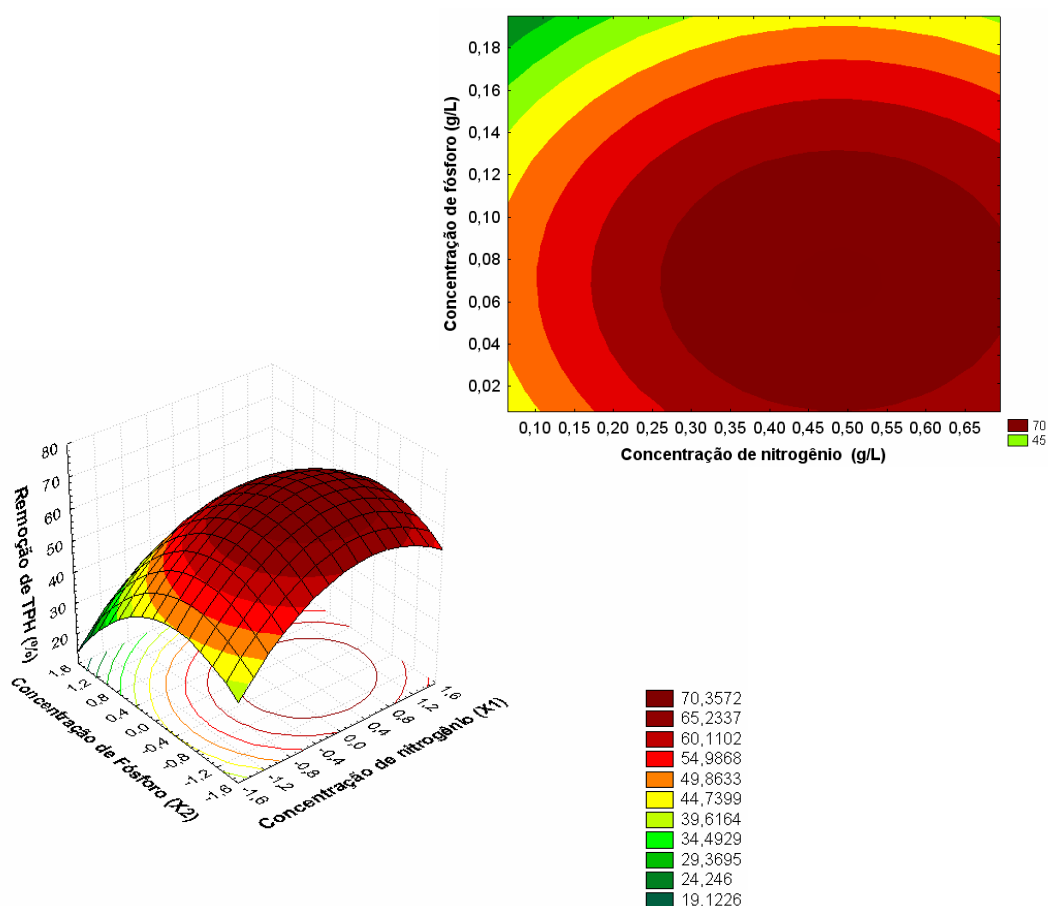


Figura 4.11 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta remoção de TPH em função da concentração de nitrogênio (X_1) e concentração de fósforo (X_2).

Marayyan e Battikhi (2005), em estudo do efeito do tipo de consórcio microbiano empregado e das concentrações de sais (fonte de nitrogênio, fósforo e enxofre) utilizados para tratamento de lodo de petróleo, constataram que as adições conjuntamente destes sais

proporcionaram um aumento na remoção de carbono orgânico total (TOC), de 28% (sem sais) para 43% (com sais), após 10 dias de processo em aerobiose.

Coulon *et al.* (2005), analisando o efeito da temperatura e da adição de fertilizantes no processo de biodegradação de óleo diesel em aerobiose, observaram que para uma mesma temperatura a adição de fertilizante (Inipol- fonte: N, P e K) diminuiu o TPH residual destes óleos após 42 dias de processo passando de aproximadamente 70% (sem fertilizante) para 40% (com fertilizante).

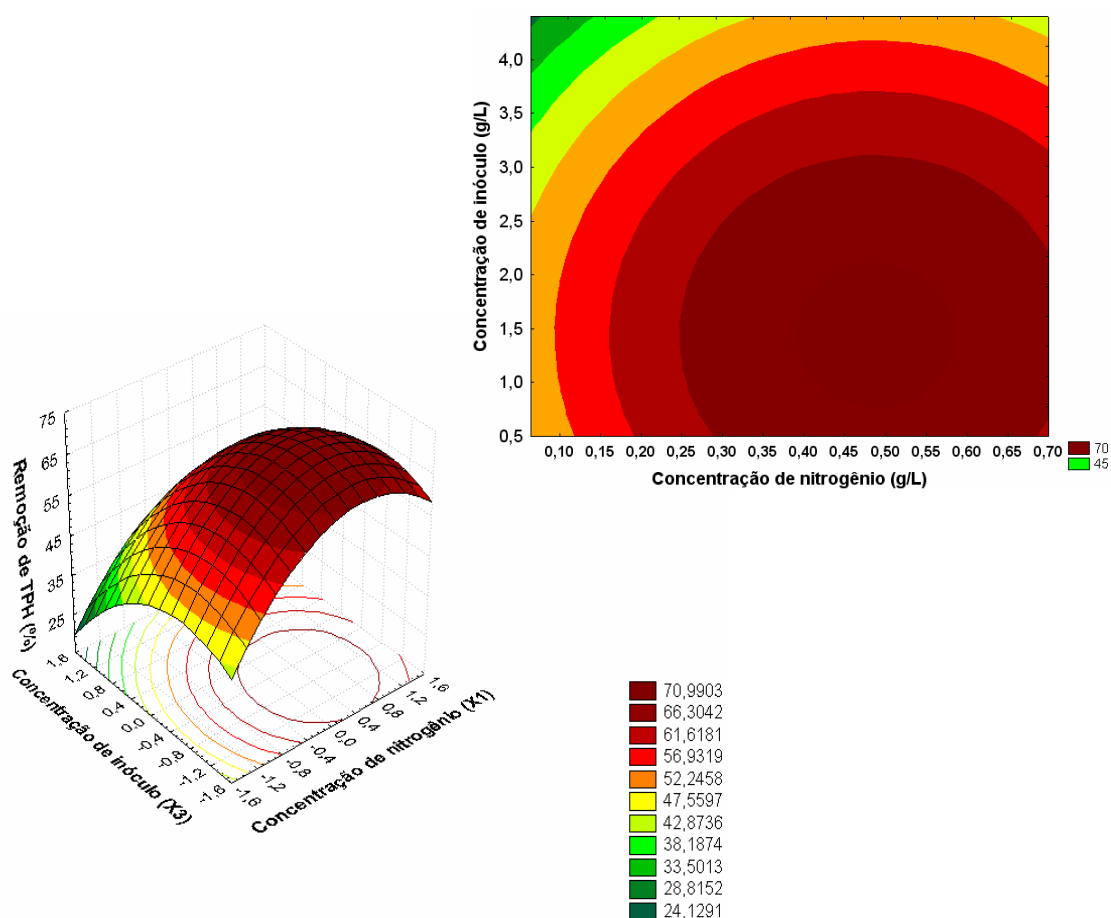


Figura 4.12 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta remoção de TPH em função da concentração de nitrogênio (X_1) e concentração de inóculo (X_3).

Pode-se observar, que o tratamento adotado neste trabalho, apresentou resultados (Tabela 4.5) competitivos com os obtidos pelos autores citados acima, mostrando remoções de TPH em alguns casos superiores a 70%, em 3 dias de processo.

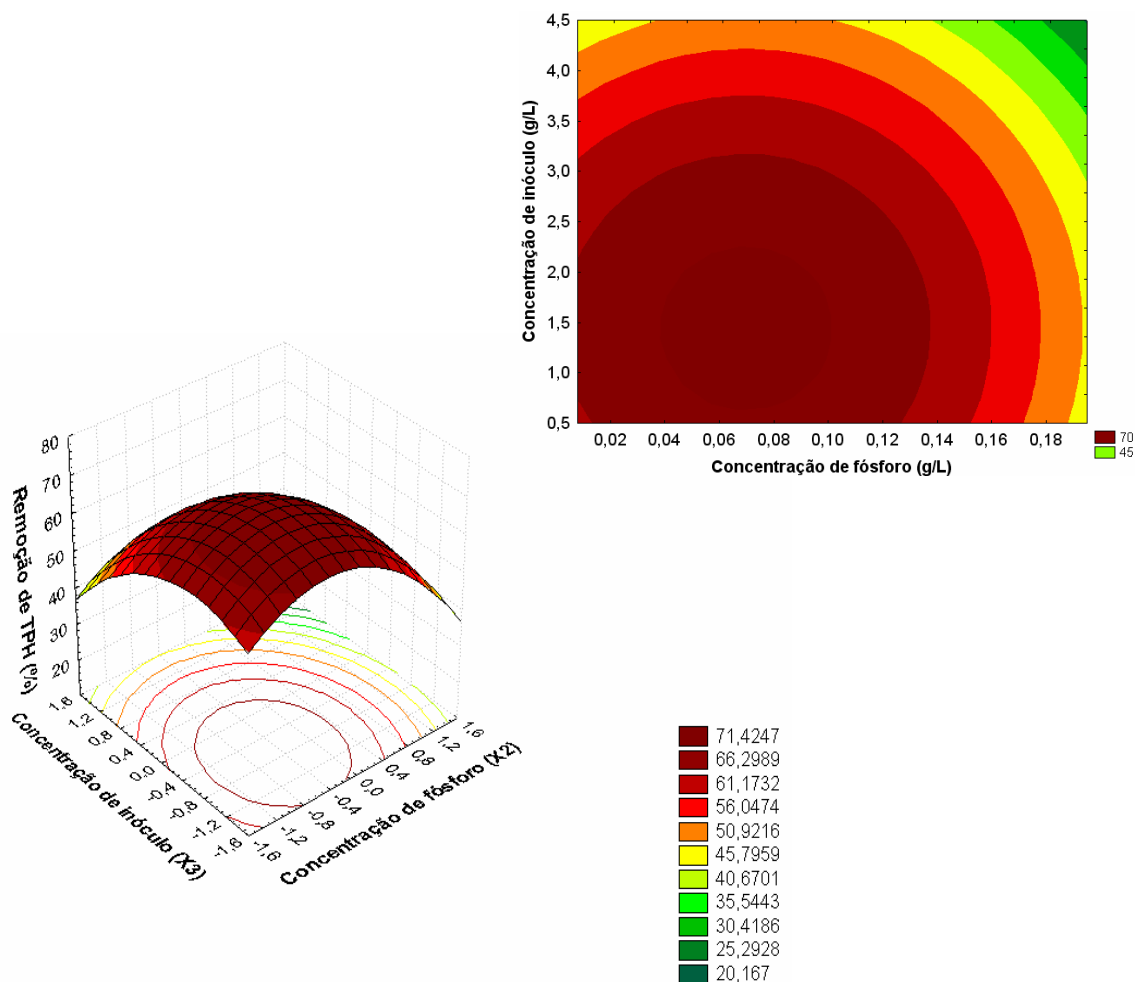


Figura 4.13 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta remoção de TPH em função da concentração de fósforo (X_2) e concentração de inóculo (X_3).

4.6.2 - Análise de Regressão dos Resultados Obtidos para a Concentração de Biomassa a partir das Variáveis Estudadas

Como no caso anterior, após a realização da regressão múltipla e análise estatística dos dados, gerou-se a Tabela 4.8 e a Equação 4.3 apresentando os resultados de regressão. Nestes estão contidos apenas as variáveis significativas com nível de significância inferior a 10% no teste *t de student*. Os parâmetros não significativos eliminados neste caso foram X_1X_2 , X_1X_3 e X_3^2 .

Analisando a Tabela 4.8 verifica-se, que as variáveis concentração de fósforo (X_2) e concentração de inóculo (X_3) influenciaram mais significativamente na variação da concentração de biomassa (ΔC_{bm}). E os sinais negativos dos coeficientes destas variáveis indicam, que o aumento destas concentrações proporcionaram uma diminuição na variação da concentração de biomassa. O que pode ser confirmado ao comparar os resultados dos experimentos 11 e 12 e 13 e 14 da Tabela 4.5.

Tabela 4.8- Resultados da regressão múltipla para aumento na concentração de biomassa (ΔC_{bm}), apenas com as variáveis significantes e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante (β_0)	1,318	0,000
X_1 (CN)	0,166	0,022
X_1^2 (CN ²)	-0,196	0,050
X_2 (CF)	-0,255	0,002
X_2^2 (CF ²)	-0,302	0,006
X_3 (CI)	-0,238	0,003
$R^2 = 0,85$		

$$\Delta C_{bm} = 1,318 + 0,166X_1 - 0,196X_1^2 - 0,255X_2 - 0,302X_2^2 - 0,238X_3 \quad (4.3)$$

Além disto, o sinal positivo da variável X_1 , indica que o aumento deste fator ocasiona o aumento na concentração de biomassa.

As Figuras 4.14 e 4.15 mostram a distribuição dos resíduos em torno do zero e a representação dos valores preditos em função dos observados.

Observando a Figura 4.14, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando qualquer tendência quanto à distribuição. Na Figura 4.15, nota-se que as respostas experimentais para a variação da concentração de biomassa apresentaram a maioria dos valores próximos aos fornecidos pela equação empírica.

Para ilustrar os efeitos das variáveis no crescimento da cultura C_1 , estão apresentadas nas Figuras 4.16 a 4.18 as superfícies de resposta e as curvas de contorno, destacando a região de otimização para as variáveis estudadas.

As variáveis nestas figuras estão representadas em suas formas codificadas e reais, duas a duas, em relação à resposta ΔC_{bm} . Verifica-se, que a região de otimização, mostrada nestas figuras, apresentam as seguintes faixas de concentrações de nitrogênio a 0,35 a 0,65 g/L, fósforo de 0,04 a 0,10 g/L e inóculo 0,5 a 1,2 g/L, respectivamente.

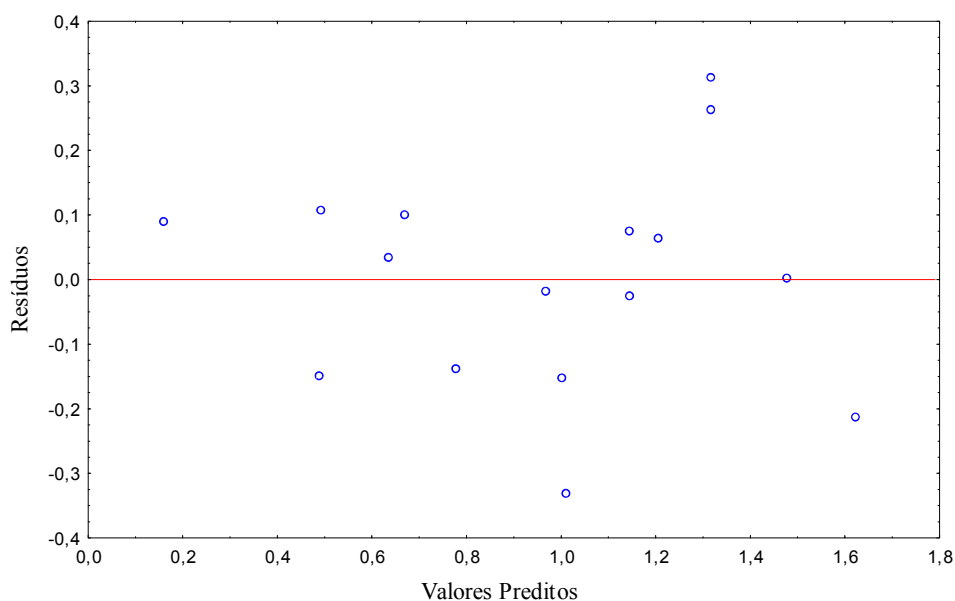


Figura 4.14 – Distribuição dos resíduos relativa à concentração celular.

Da mesma forma apresentada no item 4.6.1, com a equação completa calculou-se o ponto estacionário para o crescimento celular utilizando o programa Maple V release 4. Valores de λ 's referentes ao crescimento de biomassa indicaram que esta resposta possui ponto de máximo, pois os mesmos apresentam sinais iguais e negativos.

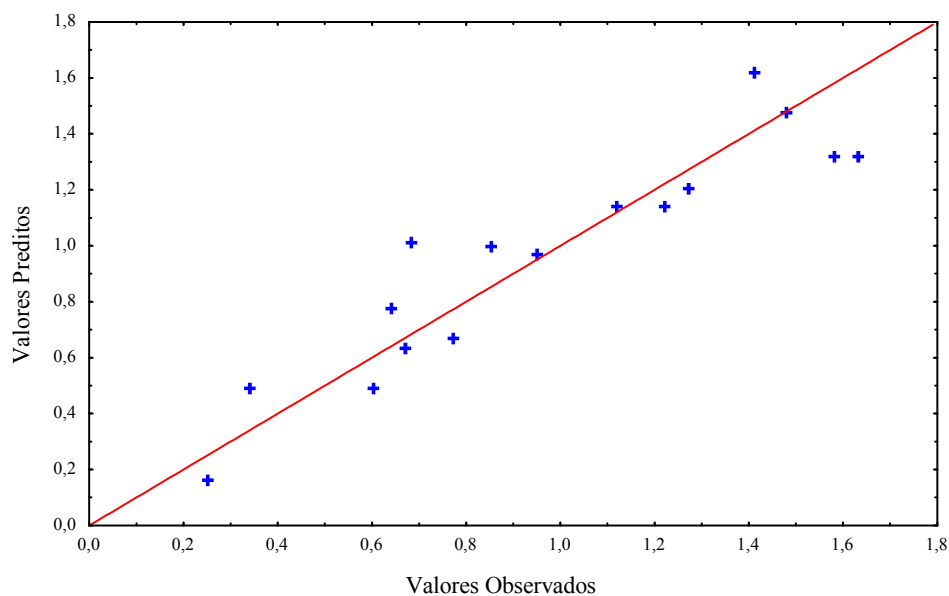


Figura 4.15 – Valores preditos em função dos observados relativos à concentração celular.

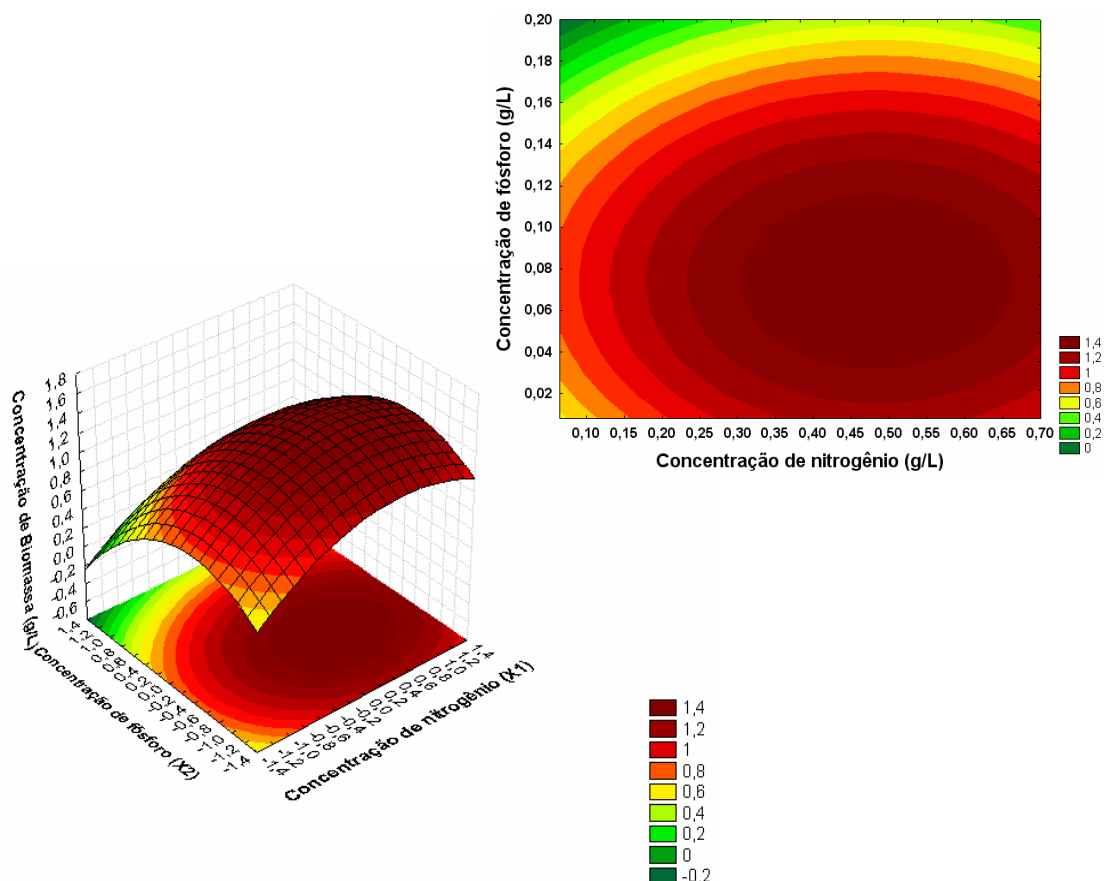


Figura 4.16 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta a variação da concentração de biomassa (ΔC_{bm}) em função da concentração de nitrogênio (X_1) e concentração de fósforo (X_2).

Os valores codificados destes pontos foram os seguintes: $X_1 = 0,47$; $X_2 = -0,46$ e $X_3 = -0,68$. Utilizando as equações de codificação (3.4), (3.5) e (3.6), foi possível calcular os valores das variáveis em sua forma real, resultando em:

$$X_1 = 0,495 \text{ g/L}$$

$$X_2 = 0,071 \text{ g/L}$$

$$X_3 = 1,060 \text{ g/L}$$

Substituindo as variáveis codificadas X_1 , X_2 e X_3 obtidas do ponto de otimização para a variação da concentração de biomassa (ΔC_{bm}), determinou-se pela Equação completa que o aumento na concentração de biomassa para estas condições foi teoricamente de 1,626 g/L. Se compararmos este valor com os valores obtidos experimentalmente (Tabela 4.5), pode-se verificar, que as respostas mais próximas deste valor foi obtida nas condições dos experimentos 15 e 16 (pontos centrais).

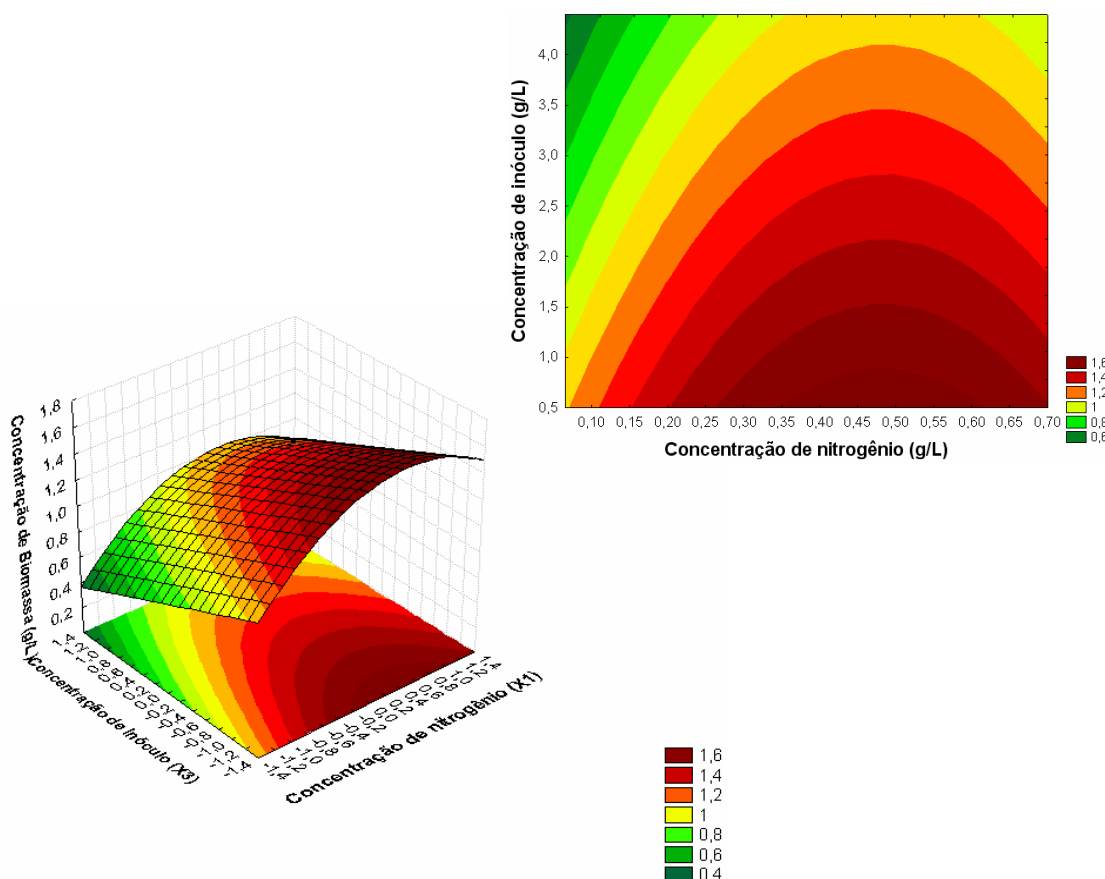


Figura 4.17 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta variação da concentração de biomassa (ΔC_{bm}) em função da concentração de nitrogênio (X_1) e concentração de inóculo (X_3).

A Tabela 4.9 apresenta os resultados obtidos no ponto central do planejamento de experimentos (PCC) e os valores reais das concentrações das variáveis independentes CN, CP e CI nos pontos de maximização para as respostas remoção de TPH e crescimento celular.

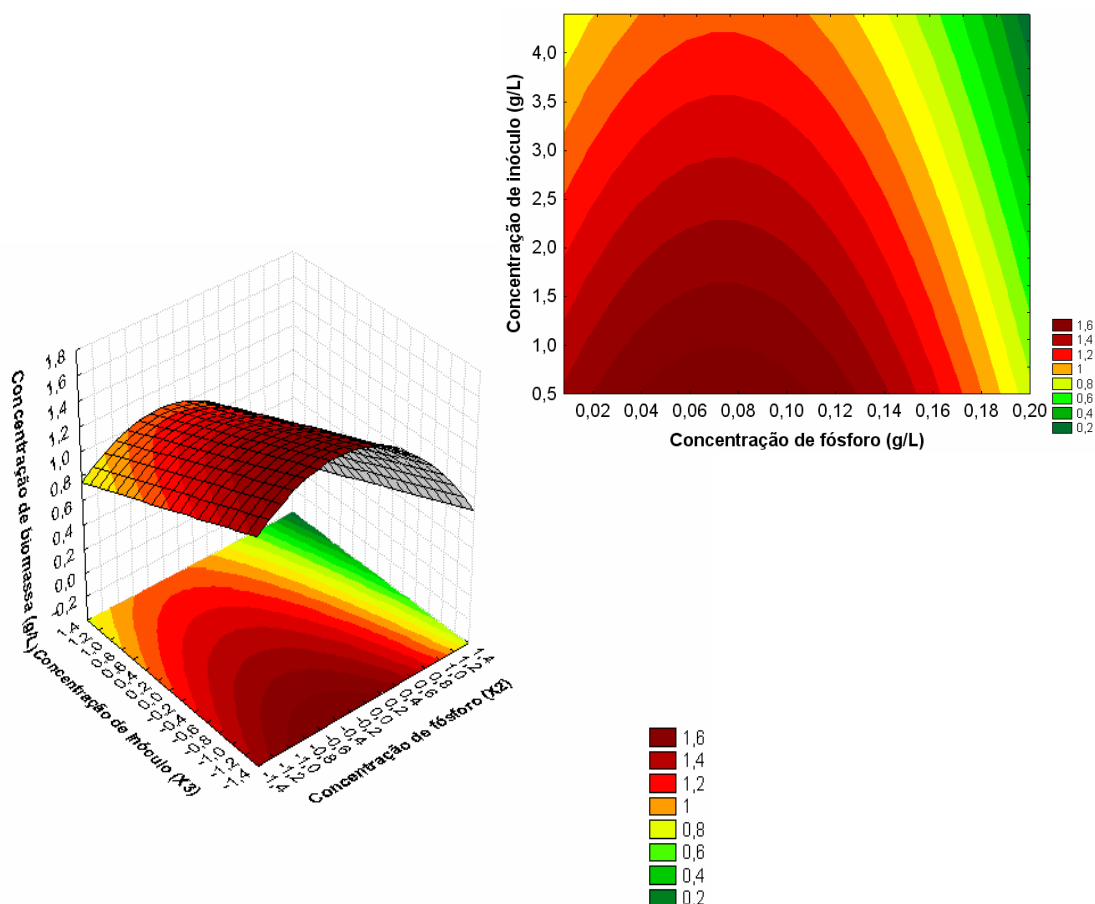


Figura 4.18 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta ΔC_{bm} em função da concentração de fósforo (X_2) e concentração de inóculo (X_3).

Como todas as variáveis estudadas são de baixo custo econômico, foi de interesse adotar como melhor condição de processo para próximos estudos as concentrações obtidas no ponto de otimização, encontrado ao analisar a resposta remoção de TPH, aplicando o algoritmo desenvolvido no *Maple V release 4* (nitrogênio -0,509 g/L, fósforo – 0,068 g/L e inóculo: 1,32 g/L), que proporcionaram remoção de 73,0 % (teórico).

Tabela 4.9 – Valores das variáveis concentração de nitrogênio (CN), concentração de fósforo (CP) e concentração de inóculo (CI) após otimização.

Experimentos	CN (g/L)	CP (g/L)	CI (g/L)
Ponto central	0,380	0,104	2,470
Ponto de otimização – remoção de TPH	0,509	0,068	1,320
Ponto de otimização – variação da concentração celular (ΔC_{bm})	0,495	0,071	1,060

4.6.3 - Aspectos Visuais dos Experimentos

Em todas as condições estudadas foi observada a presença de turvação do meio, mostrando-se leitoso. O grau de turvação do meio variou de acordo com a remoção de TPH obtida, ou seja, nas maiores remoções foi evidenciado aumento da turvação do meio (Tabela 4.5).

Além disto, foi observado visualmente uma coloração diferenciada para cada experimento estudado, que surgiu após 48 horas de processo e se intensificou nas 72 horas (final do processo). As tonalidades leitosas verificadas variaram de verde intenso, verde claro branco e amarelo, como mostra a Tabela 4.10.

Além disto, como os experimentos apresentaram turvação nas primeiras 48 horas, isto sugere que houve a atuação predominante de bactérias, uma vez que foi utilizada cultura mista.

As tonalidades de verde indicam maiores concentrações de bactérias patogênicas (*Pseudomonas*). As tonalidades de branco e amarelo sugerem que os microrganismos em maiores concentrações podem não ser patógenos, de acordo com os microrganismos identificados que estavam em maior concentração na cultura mista C₁.

Ao comparar o aspecto visual dos experimentos com microrganismos e o controle abiótico (na ausência de microrganismos), pode-se observar um aspecto mais leitoso dos experimentos, totalmente distinto das características do controle. No controle, as fases combustível e água permaneceram praticamente imiscíveis.

Ao relacionar os resultados da Tabela 4.10 com da Tabela 4.5 verifica-se, que os experimentos com colorações leitosas de tonalidades em amarelo e branco, correspondentes aos experimentos 7, 8, 9, 12 e 14, e 1, 2, 4, e 6, nesta ordem, foram os que apresentaram menores remoções de TPH (inferior a 60%). Os experimentos 5, 10, 11, 13, 15 e 16 apresentaram remoções de TPH superiores a 65%, mostrando tonalidades em verde. Isto sugere, que os microrganismos presentes na cultura mista responsáveis por maior biodegradação dos contaminantes foram as *Pseudomonas*.

Tabela 4.10- Colorações observadas do meio biodegradado nos experimentos do planejamento composto central no final de 3 dias de processo.

Colorações Observadas				
Experimentos	Verde Intenso	Verde Claro	Amarelo	Branco
1				XXXXX
2				XXXXX
3				XXXXX
4				XXXXX
5	XXXXX			
6				XXXXX
7			XXXXX	
8			XXXXX	
9			XXXXX	
10	XXXXX			
11	XXXXX			
12			XXXXX	
13	XXXXX			
14			XXXXX	
15		XXXXX		
16		XXXXX		

4.6.4 - Teste de Reprodutibilidade Empregando as Melhores Condições de Concentrações de Nitrogênio, Fósforo e Inóculo Obtidas Pelo Planejamento Experimental

Após a análise dos resultados obtidos nos itens 4.6.1 e 4.6.2, procedeu-se este estudo, para verificar se ocorreria reprodutibilidade dos resultados, ao empregar as mesmas condições experimentais do melhor resultado do planejamento (pontos experimentais- E15 e E16) e do ponto otimizado obtido teoricamente.

O comparativo dos resultados encontrados no PCC e no ponto otimizado com a sua respectiva reprodutibilidade (repetição) estão apresentados na Tabela 4.11. Para os resultados de remoção de TPH já foram descontadas as perdas abióticas.

Comparando os resultados apresentados na Tabela 4.11, percebe-se que houve reprodutibilidade dos resultados tanto em termos de aumento da concentração de biomassa quanto de remoção de TPH. Estes resultados eram esperados, uma vez que estes experimentos (repetição) foram realizados em condições próximas aos experimentos 15 e 16.

Além disto, ao compararmos os resultados de remoções de TPH do ponto experimental de otimização ($R_{\text{pot exp}}$), após 3 dias de operação (71,8%) com o melhor resultado apresentado no item 4.5.2 de 59,6% (estudo da substituição de extrato de levedo por LCA na concentração

de 2g/L), pode-se verificar que houve um aumento considerável após a otimização das concentrações de nutrientes e inóculo. Isto mostra, a importância da análise conjunta destas variáveis estudadas para a remoção de TPH.

Tabela 4.11- Comparativo dos resultados de remoções de TPH e variações de concentrações de biomassa, nas condições experimentais do ponto central (E15 e E16), do ponto otimizado (E_{pot}).

Experimentos	ΔC_m (g/L)	Remoção de TPH (%)
E16 (CN=0,380 g/L, CP= 0,104 g/L, CI= 2,470 g/L)	$1,63 \pm 0,15$	$69,8 \pm 0,8$
E15 (CN=0,380 g/L, CP= 0,104 g/L, CI= 2,470 g/L)	$1,58 \pm 0,21$	$71,0 \pm 1,9$
R15 (CN=0,380 g/L, CP= 0,104 g/L, CI= 2,470 g/L)	$1,62 \pm 0,15$	$71,5 \pm 1,5$
E_{pot} (CN=0,509 g/L, CP= 0,068 g/L, CI= 1,32 g/L)	1,626	73,0
$R_{pot\ exp}$ (CN=0,509 g/L, CP= 0,068 g/L, CI= 1,32 g/L)	$1,70 \pm 0,09$	$71,8 \pm 1,2$

Obs* ΔC_m (g/L)- variação da concentração de biomassa; CN- concentração de nitrogênio, CP- concentração de fósforo, CI- concentração de inóculo; E15 e E16- condições experimentais definidas pela matriz do planejamento composto central (pontos centrais 15 e 16), R15- repetição das condições experimentais do ponto central, E_{pot} – condições experimentais definidas teoricamente, a partir da implementação do algoritmo (ponto otimizado) e $R_{pot\ exp}$ – repetição das condições experimentais do ponto otimizado.

4.6.4.1 - Avaliação dos Resultados Empregando Cromatografia Gasosa para os Experimentos R15 e $R_{pot\ exp}$

Como listado anteriormente na Tabela 4.2 (item 4.1.2) foram identificados 30 hidrocarbonetos pertencentes as seguintes classes: parafínicos, isoparafínicos, olefínicos, aromáticos e naftênicos.

Os resultados médios de biodegradação das classes de hidrocarbonetos identificados obtidos após 3 dias de processo, para os experimentos R15 e $R_{pot\ exp}$ estão apresentados na Tabela 4.12. Percebe-se por esta tabela, que todas as classes de hidrocarbonetos com exceção dos naftênicos apresentaram porcentagem de degradação superior a 70%, decorridos 3 dias de processo.

Os resultados apresentados nesta tabela estão de acordo com a ordem de susceptibilidade de ataque às classes de hidrocarbonetos pelos microrganismos, descrito por Leahye e Cowell (1990). Estes autores descreveram que as parafinas são as mais susceptíveis ao ataque microbiano, seguido pelas isoparafinas, aromáticos e os naftênicos, que são os menos susceptíveis ao ataque.

As Figuras 4.19 e 4.20, mostram as porcentagens de degradação dos compostos listados na Tabela 4.2 para cada condição dos experimentos estudados (R15 e $R_{pot\ exp}$). Estes compostos listados também são objetos de estudo de trabalhos científicos, que abordam a

degradação de hidrocarbonetos empregando culturas puras e mistas (TOWNSEND *et al.*, 2004; GHAZALI *et al.* 2004, CUNHA E LEITE, 2000; SOLANO-SERENA *et al.*, 1999).

Tabela 4.12 - Porcentagens de degradações das classes de hidrocarbonetos identificados para as condições experimentais R15 e $R_{pot\ exp}$, após 3 dias de processo.

Experimentos	R15	$R_{pot\ exp}$
Classes dos Hidrocarbonetos	Porcentagem de Degradação (%)	Porcentagem de Degradação (%)
Parafinas	86,3 ± 1	87,1 ± 1
Isoparafinas	78,2 ± 5	77,7 ± 3
Olefinas	76,9 ± 2	78,6 ± 2
Naftênicos	36,8 ± 2	38,4 ± 1
Aromáticos	70,6 ± 3	71,7 ± 2

Obs* R15- repetição das condições experimentais do ponto central e $R_{pot\ exp}$ – repetição das condições experimentais do ponto otimizado.

Comparando as Figuras 4.19 (experimento R15) e 4.20 (experimento $R_{pot\ exp}$), pode-se observar o mesmo comportamento de degradação das classes de hidrocarbonetos identificados e a proximidade dos valores de degradação dos compostos identificados termo a termo. Isto pode ser justificado, pela proximidade dos valores das condições experimentais utilizadas nos dois experimentos e por estes estarem dentro da região de otimização.

Cunha e Leite (2000), em seu estudo de biodegradação de gasolina em diferentes sistemas em solo, observaram os seguintes valores máximos de degradação dos constituintes da gasolina após 72 h: tolueno- 53,7%, etilbenzeno- 46,3%, nC_9 - 59,2%, nC_{11} - 88,7%, nC_{12} - 62,7%, respectivamente. Comparando estes resultados com os obtidos no presente estudo (Figuras 4.19 e 4.20), pode-se verificar que as porcentagens de degradação destes compostos (tolueno- 62,9 e 64,1%; etilbenzeno- 72,8 e 73,5%; nC_{11} - 64,8 e 65,1% e nC_{12} - 72,5 e 72,2%) mostraram-se superiores ao obtido por Cunha e Leite com exceção do nC_{11} . Mas, no trabalho de Solano- Serena *et al.* (1999) também não foi verificado o consumo do composto nC_{11} presente na gasolina, após 25 dias de incubação. Estes autores estudaram a biodegradação da gasolina em meio líquido, empregando lodos ativados obtidos do tratamento convencional de água urbana.

Dentre os compostos identificados por Solano – Serena *et al.* (1999), os seguintes valores de porcentagem de degradação foram obtidos (%): aproximadamente 100% para as isoparafinas, 2,2-dimetilpentano, 3- metilhexano e 3-etilpentano e para as olefinas, penteno e hepteno, decorridos 25 dias de operação. Comparando estes resultados com os resultados do presente trabalho (Figuras 4.19 e 4.20), apesar dos valores das porcentagens de degradação

destes últimos terem sido inferiores, a classe das isoparafinas apresentou-se com valores de remoções consideráveis 73,4 e 74,1% para 2,2- dimetilpentano, 78,9 e 80,2% para 3-metilhexano e 71,4 e 73,8% para o etilpentano, decorridos apenas 3 dias de processo.

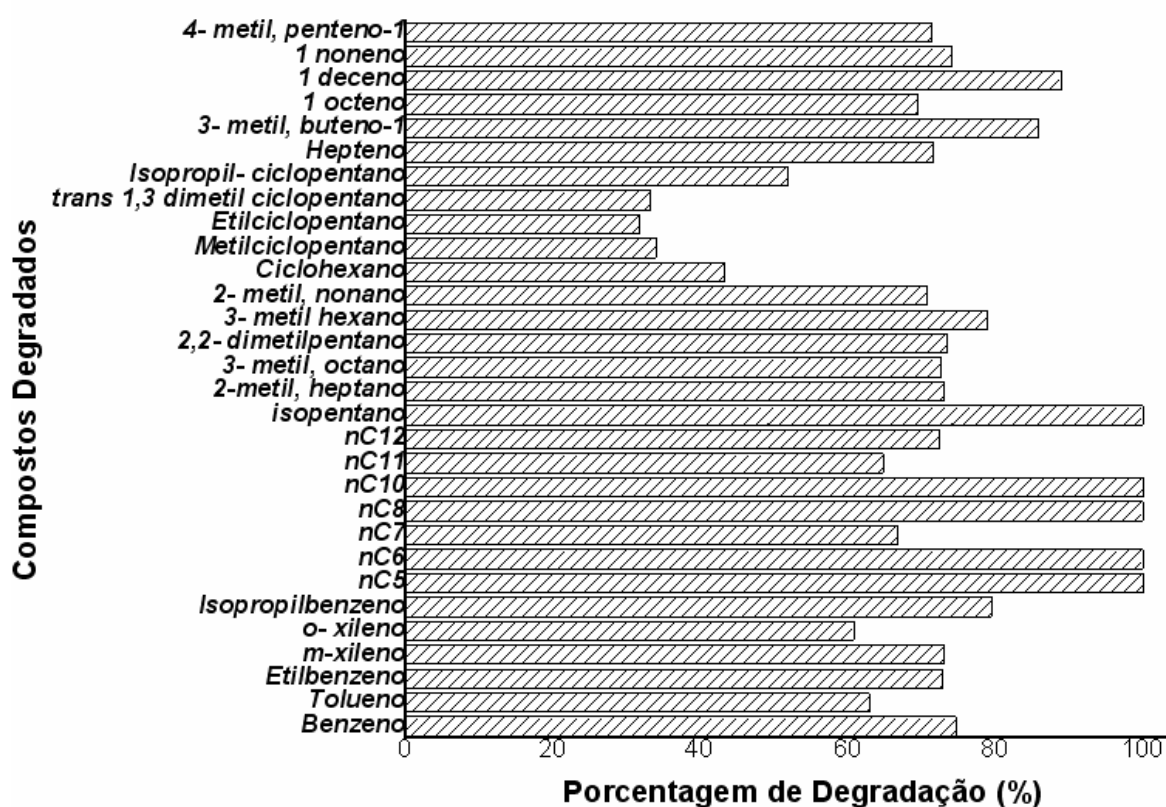


Figura 4.19 – Degradação dos hidrocarbonetos identificados para a condição do experimento R15, após 3 dias de processo.

Todos estes resultados apresentados mostram, que um mesmo composto presente na gasolina pode apresentar valores de degradação distintos, dependendo do tipo de meio no qual se encontra (solo ou meio aquoso), dos microrganismos empregados e das condições operacionais adotadas.

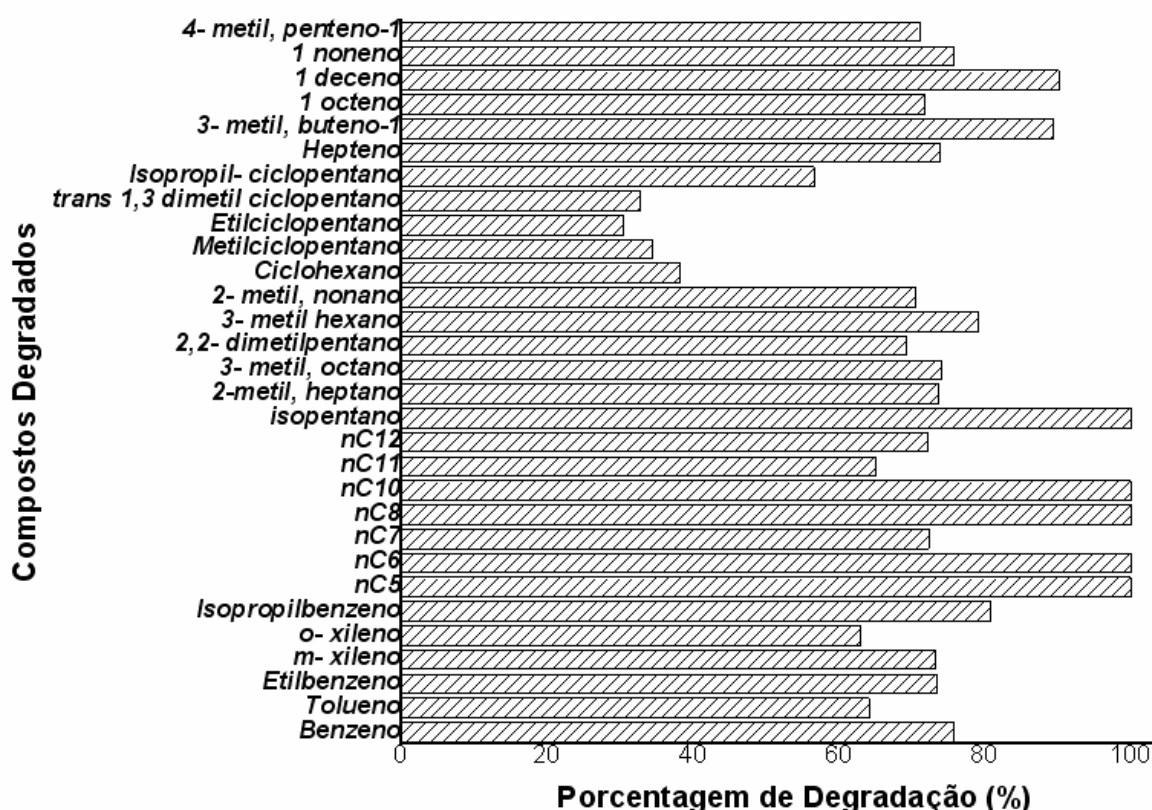


Figura 4.20 – Degradação dos hidrocarbonetos identificados para a condição do experimento $R_{pot\ exp}$, após 3 dias de processo.

4.7 – 2º Planejamento Experimental – Otimização do Intervalo de Aeração e do Nível de Agitação

Nesta etapa foi realizada a otimização do processo de biodegradação em relação as variáveis: intervalo de aeração (IA_e) e velocidade de agitação (VA_g), uma vez que os parâmetros concentração de nutrientes (fósforo e nitrogênio) e concentração de inóculo foram otimizados previamente no Item 4.6. Adotou-se também, 3 dias de processo para a otimização das variáveis, conforme justificativa mencionado anteriormente.

A Tabela 4.13 apresenta a média dos resultados de remoção de TPH e crescimento de biomassa, para cada experimento do planejamento experimental. Para avaliação das perdas abióticas referentes à remoção de TPH foi realizado o teste controle e o máximo percentual de remoção de TPH observado foi de 2,1%. Estas perdas abióticas já foram descontadas nos valores de remoções de cada experimento.

Vale salientar, que foram acompanhados os resultados de pH e consumo de oxigênio dissolvido (O_{2d}), para cada experimento.

Por meio desta tabela, pode-se verificar, que as variações do intervalo de aeração (IA_e) e das velocidades de agitação (VA_g) proporcionaram resultados de remoções de TPH que variaram de 38 a 76,2%. E em relação ao crescimento de biomassa verifica-se, que em todas as condições experimentais testadas houve aumento de biomassa, mostrando que as condições experimentais favoreceram o crescimento conduzindo em menores ou maiores concentrações, que variaram de 0,892 a 2,282 g/L.

Analisando a Tabela 4.13 verifica-se, que os melhores resultados, das respostas avaliadas, foram obtidos nos experimentos localizados no ponto central (experimentos 9, 10 e 11).

Tabela 4.13- Resultados de remoções de TPH e biomassa, em diferentes condições experimentais definida pela matriz do planejamento composto central.

Exp.	IA_e (h)	VA_g (rpm)	Remoção de TPH (%)	ΔC_{bm} (g/L)
1	12	60	$38,0 \pm 2,0$	$0,89 \pm 0,16$
2	12	180	$42,0 \pm 2,0$	$1,33 \pm 0,25$
3	48	60	$52,0 \pm 3,0$	$0,94 \pm 0,12$
4	48	180	$54,5 \pm 1,0$	$1,19 \pm 0,32$
5	9	120	$56,3 \pm 2,0$	$2,07 \pm 0,15$
6	51	120	$60,5 \pm 4,0$	$1,57 \pm 0,34$
7	30	50	$48,0 \pm 1,0$	$0,83 \pm 0,29$
8	30	189	$59,0 \pm 3,0$	$1,08 \pm 0,18$
9 (C)	30	120	$74,0 \pm 2,0$	$2,16 \pm 0,32$
10 (C)	30	120	$76,2 \pm 1,0$	$2,21 \pm 0,27$
11 (C)	30	120	$75,0 \pm 2,0$	$2,28 \pm 0,24$

Obs* IA_e – Intervalo de aeração; VA_g – velocidade de agitação e ΔC_{bm} – variação da concentração de biomassa.

4.7.1 - Análise de Regressão dos Resultados Obtidos na Remoção de TPH a partir das Variáveis Estudadas

Após a realização da regressão múltipla no programa *Statistic 7.0*, obteve-se a seguinte equação completa:

$$\text{Remoção de TPH (\%)} = 74,954 + 4,722 X_1 - 12,385 X_1^2 + 2,883 X_2 - 16,107 X_2^2 - 0,375 X_1 X_2 \quad (4.4)$$

Após a eliminação do termo não significativo ($X_1 X_2$) para a resposta remoção de TPH foi obtida a Tabela 4.14, que relaciona os termos significativos bem como os parâmetros

referentes a estes. A equação empírica ajustada que representa a remoção de TPH esta descrita na Equação 4.5.

Tabela 4.14- Resultados da regressão múltipla para remoção de TPH, apresentando apenas as variáveis significativas com seus parâmetros e níveis de significância.

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante (β_0)	74,954	0,000000
X_1 (IA_e)	4,722	0,007728
X_1^2 (IA_e^2)	-12,385	0,000278
X_2 (VA_g)	2,883	0,050881
X_2^2 (VA_g^2)	-16,107	0,000064
$R^2 = 0,97$		

Obs* IA_e – Intervalo de aeração; VA_g – velocidade de agitação.

O coeficiente de correlação de 0,97 indica que ocorreu um ótimo ajuste dos dados experimentais ao modelo.

$$\text{Remoção de TPH (\%)} = 74,954 + 4,722 X_1 - 12,385 X_1^2 + 2,883 X_2 - 16,107 X_2^2 \quad (4.5)$$

Por meio da Tabela 4.14 verifica-se, que a variável IA_e (X_1) influenciou a resposta remoção de TPH mais significativamente do que VA_g (X_2). E os sinais positivos dos coeficientes destas variáveis, indicam que os aumentos destes valores promoveram o aumento da remoção. Isto pode ser claramente observado nos ensaios 5 e 10, nos quais as variações no intervalo de aeração de 9 para 30 h, mantendo constante o nível de agitação (120 rpm), promoveu um aumento significativo na remoção de TPH, que passou de 56,3 para 76,2%.

A Figura 4.21 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero e a Figura 4.22, o gráfico de valores preditos em função dos observados.

Observando a Figura 4.21, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando qualquer tendência à distribuição. Na Figura 4.22, nota-se que as respostas experimentais para remoção de TPH apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica.

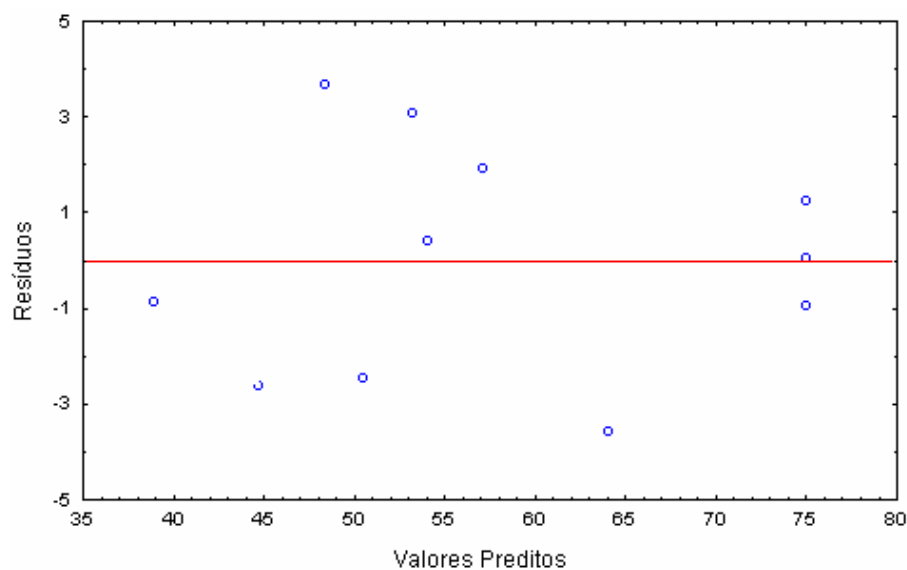


Figura 4.21 – Distribuição dos resíduos relativa à remoção de TPH.

Para ilustrar os efeitos das variáveis na biodegradação dos contaminantes está apresentada na Figura 4.23 a superfície de resposta e a curva de contorno. Da mesma forma como descrito nos itens anteriores, esta figura mostra a região de otimização das variáveis em suas formas codificadas e reais, duas a duas, em relação à resposta remoção de TPH. Observa-se nesta figura, que as faixas de valores de intervalo de aeração e velocidade de agitação da região de otimização está compreendida entre 25 a 40 h e 100 a 140 rpm, respectivamente.

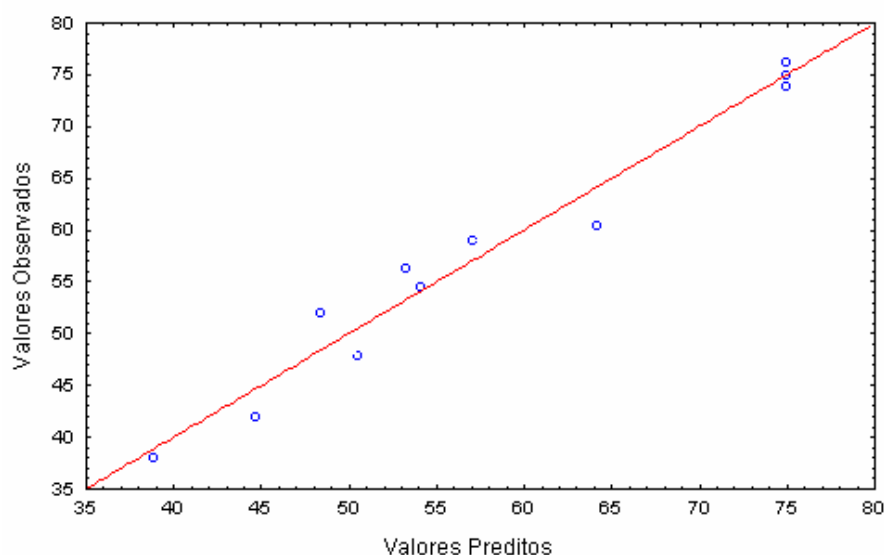


Figura 4.22 – Valores preditos em função dos observados relativos à remoção de TPH.

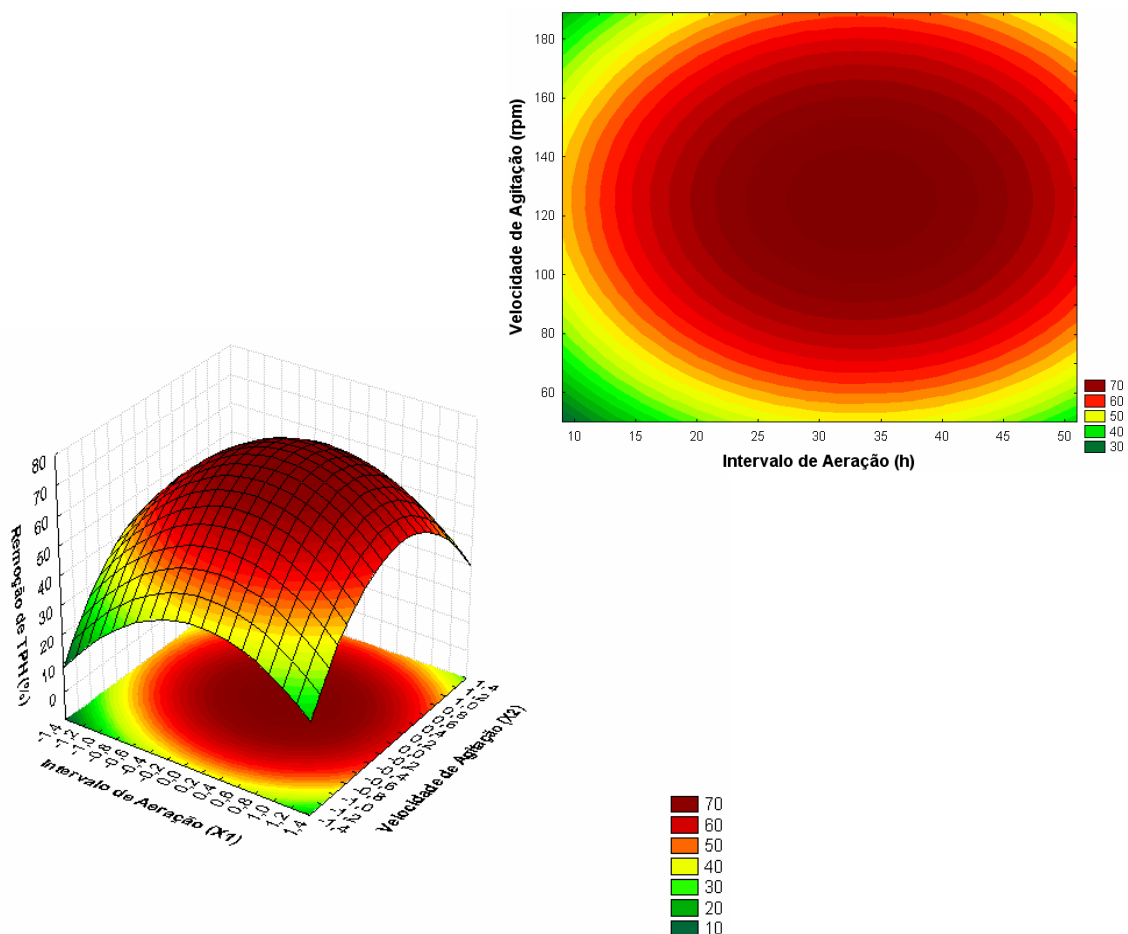


Figura 4.23 – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta remoção de TPH em função do intervalo de aeração (X_1) e nível de agitação (X_2).

O cálculo do ponto estacionário para a remoção de TPH foi realizado conforme citado anteriormente (item 4.6.1) e os valores dos λ 's referentes à remoção de TPH indicaram, que esta resposta possui um ponto de máximo, pois λ_1 (-16,12) e λ_2 (-12,37) apresentam sinais iguais e negativos.

Os valores referentes a este ponto em suas formas codificadas foram: $X_1 = 0,189$ e $X_2 = 0,087$. Além disto, pode-se verificar pela Figura 4.23, que estas coordenadas estão dentro da região de otimização.

Utilizando as equações de codificação (3.9) e (3.10) foram obtidos os valores reais das variáveis estudadas:

$$X_1 = 33 \text{ h};$$

$$X_2 = 125 \text{ rpm}.$$

Substituindo as variáveis codificadas X_1 e X_2 na equação 4.5, obteve-se um percentual de remoção de TPH teórico de 75,5%. Verifica-se, que este valor foi muito próximo ao encontrado nos experimentos 10 e 11, que são os pontos centrais (Tabela 4.13).

4.7.2 - Análise de Regressão dos Resultados Obtidos no Crescimento de Biomassa a Partir das Variáveis Estudadas

Por meio do programa *Statistica 7.0* realizou-se a regressão múltipla dos resultados apresentados na Tabela 4.13 e após a eliminação do parâmetro não significativo (X_1X_2) para o crescimento de biomassa obtiveram-se as relações ajustadas apresentadas na Tabela 4.15:

Tabela 4.15- Resultados da regressão múltipla para crescimento de biomassa, apresentando apenas as variáveis significativas com seus respectivos parâmetros e níveis de significância.

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante (β_0)	2,194	0
X_1 (IA _e)	-0,101	0,093
X_1^2 (IA _e ²)	-0,243	0,0133
X_2^2 (VA _g ²)	0,146	0,028
X_2 (VA _g)	-0,899	0,000014
$R^2 = 0,97$		

Obs* IA_e – Intervalo de aeração; VA_g – níveis de agitação.

A Equação 4.6 representa a expressão matemática das relações dos fatores e dos parâmetros apresentados na Tabela 4.15 após ajuste.

$$\text{Biomassa (g/L)} = 2,194 - 0,101 X_1 - 0,243 X_1^2 + 0,146 X_2 - 0,899 X_2^2 \quad (4.6)$$

Ao analisar a Tabela 4.15 verifica-se, que neste caso, a variável nível de agitação (X_2) foi mais significativa para o crescimento celular. E os sinais negativos das variáveis X_1 e X_2 indicam que o aumento do IA diminui a concentração de biomassa final.

De acordo com a Tabela 4.13, pode-se levantar as seguintes observações principais:

1) o aumento do IA_e de 9 para 51 h (experimento 5 e 6) proporcionou uma queda considerável na concentração de biomassa. Isto mostra, a importância da disponibilidade de oxigênio para o crescimento dos microrganismos envolvidos neste processo. Pode-se verificar, que o aumento do intervalo de aeração, ou seja, o intervalo entre cada fornecimento

de ar ao sistema promoveu a diminuição na concentração de oxigênio disponível (solúvel) para os microrganismos gerando diretamente a queda no crescimento.

2) nas maiores velocidades de agitação de 180 e 189 rpm, empregadas nos experimentos 2, 4 e 8 (Tabela 4.13), foram observadas baixas concentrações de biomassa. Além disto, estas mesmas condições proporcionaram os menores valores de remoções de TPH (inferiores a 60%). Isto sugere, que para valores de agitação de 180 e 189 rpm a produção de espuma observada, pode ter ocasionado a diminuição do contato substratos – microrganismos, resultando em diminuições da porcentagem de biodegradação e crescimento celular (Tabela 4.13).

3) Dentre as condições experimentais estudadas, os experimentos 1, 3 e 7 apresentaram os menores aumentos na concentração de biomassa (Tabela 4.13). Este comportamento pode estar associado aos baixos níveis de agitação empregados (50 e 60 rpm), que não proporcionaram a homogeneização adequada da camada de óleo formada na superfície do líquido, dificultando a atuação dos microrganismos na degradação do contaminante.

A presença de óleo nestes casos pode funcionar como uma barreira difusiva para o oxigênio na água. A difusão do oxigênio no óleo é da ordem de $10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$. Quando a camada de óleo é mais espessa que $100\mu\text{m}$, pode ocorrer a redução na velocidade de transferência por difusão em mais de 50% (SCHWARZENBACH *et al.*, 1993).

A Figura 4.24 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero e a Figura 4.25, o gráfico de valores preditos em função dos observados.

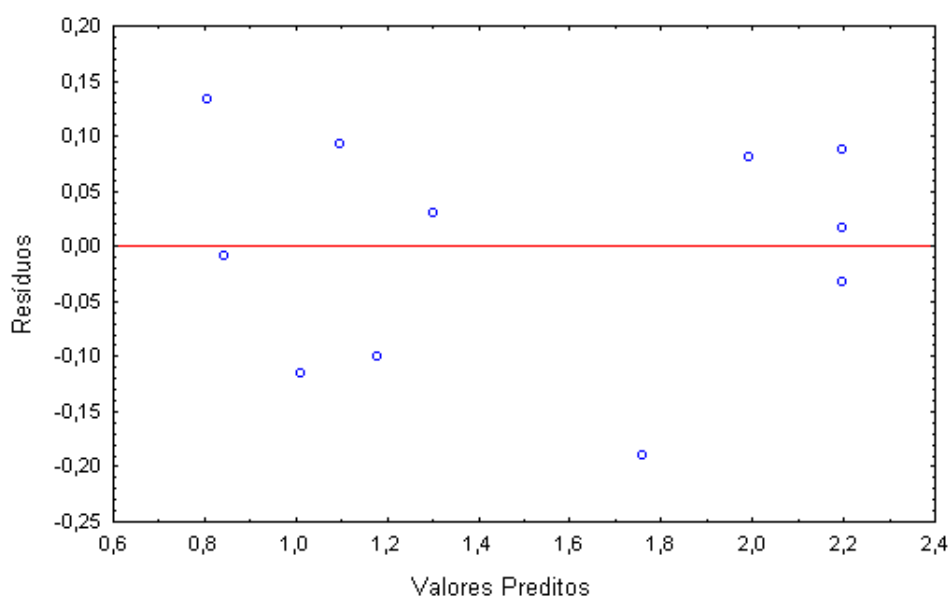


Figura 4.24 – Distribuição dos resíduos relativos à variação da concentração de biomassa.

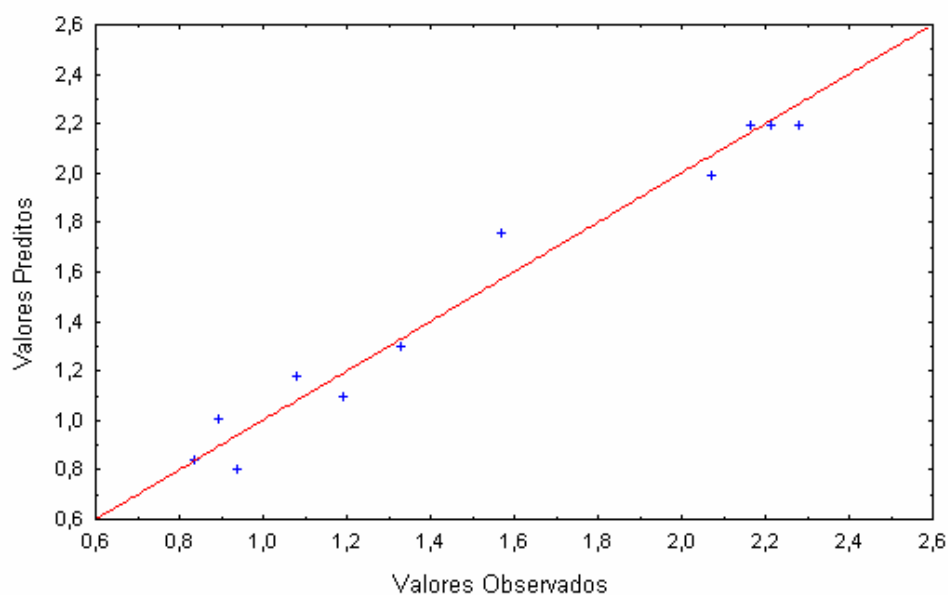


Figura 4.25 – Valores preditos em função dos observados relativos à variação da concentração de biomassa.

Observando a Figura 4.24, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero e não apresentou qualquer tendência quanto à distribuição. Na Figura 4.25, nota-se que o modelo descrito pela equação empírica se ajustou bem aos dados experimentais, por isso foi observada a proximidade dos dados experimentais à curva.

Para ilustrar os efeitos das variáveis na concentração de biomassa, a Figura 4.26 mostra a superfície de resposta e a curva de contorno. Da mesma forma como descrito nos itens anteriores, esta figura mostra a região de otimização das variáveis em suas formas codificadas e reais, duas a duas, em relação à concentração de biomassa. Observa-se por esta figura, que as faixas de valores de intervalo de aeração e nível de agitação da região de otimização é de 18 a 35 h e 110 a 140 rpm, respectivamente.

Com o objetivo de encontrar o ponto estacionário para a concentração de biomassa o mesmo procedimento descrito nos itens anteriores (4.6.1, 4.6.2 e 4.7.1) foi realizado aplicando o algoritmo implementado no programa *Maple V release 4*. Como resultado foram obtidos os seguintes valores codificados para as variáveis X_1 e X_2 : -0,216 e +0,087. Desta forma, observou-se que as coordenadas do ponto estacionário estavam dentro da região experimental.

Os valores de λ 's obtidos referentes a concentração de biomassa indicaram que esta resposta possui um ponto de máximo, pois λ_1 (-0,899) e λ_2 (-0,242) apresentaram sinais iguais e negativos.

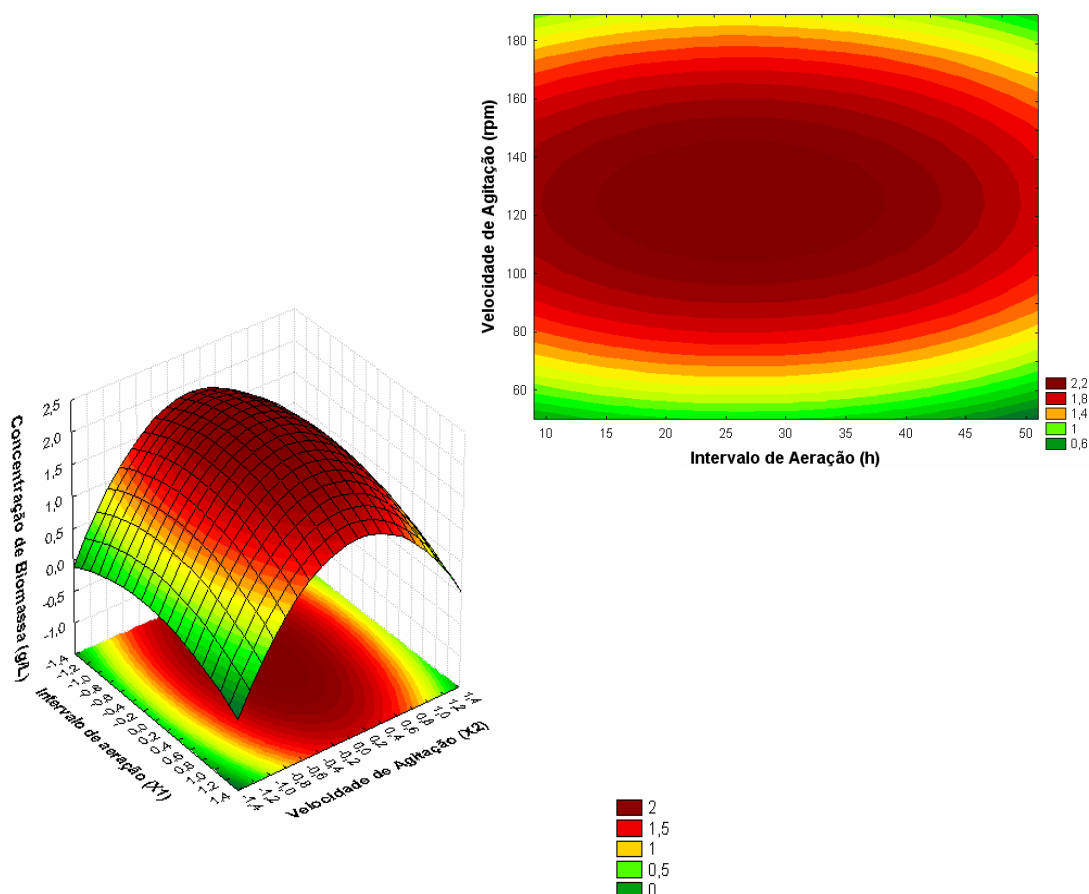


Figura 4.26- Superfície de resposta e curva de contorno para a concentração de biomassa em função do intervalo de aeração (X_1) e nível de agitação (X_2) nas formas codificadas e reais.

Utilizando as equações de codificação (3.9) e (3.10), obtiveram-se os seguintes valores reais das variáveis no ponto de maximização da concentração de biomassa:

$$X_1 = 26 \text{ h}$$

$$X_2 = 125 \text{ rpm}$$

Ao substituir os valores das variáveis codificadas do ponto de otimização da resposta concentração de biomassa no modelo da equação completa, obteve-se uma concentração de biomassa de 2,21 g/L neste ponto. Este valor é exatamente igual ao valor obtido quando empregado às condições do experimento 10.

Associando e comparando os resultados obtidos nesta etapa, pode-se observar que o objetivo de otimizar o intervalo de aeração e o nível de agitação foi alcançado, pois foi possível promover crescimento celular e remoções crescentes de TPH.

Como o principal objetivo deste estudo foi promover maiores remoções de TPH, a partir da otimização das variáveis, intervalo de aeração e nível de agitação, utilizou-se como critério os resultados obtidos ao analisar a resposta remoção de TPH. Foi escolhido como ponto de otimização para as etapas subseqüentes, os valores de intervalo de aeração e nível de agitação de 33 h e 110 rpm. As escolhas destes valores levaram em consideração a localização destes pontos dentro da região de otimização e os custos econômicos que estes poderiam gerar.

Como a região de otimização para o intervalo de aeração foi compreendida na faixa de 25 a 42 h e o ponto 33 h foi correspondente ao ponto de maximização da remoção de TPH, tornou-se interessante do ponto de vista econômico adotar este ponto. Pois, o tempo de aeração, mantido a cada 33 h de processo, foi apenas de 5 minutos o que sugere a necessidade de não selecionar intervalos de aeração superior a este valor.

Em relação à velocidade de agitação, como a velocidade tem que ser mantida continua durante todo o processo, do ponto de vista do menor custo econômico seria de interesse empregar menores valores. Desta forma, o valor de 110 rpm atenderia a este requisito dentro da faixa de otimização.

A Tabela 4.16 apresenta os resultados obtidos no ponto central do planejamento de experimentos (PCC) e os valores reais das concentrações das variáveis independentes IA_e e VA_g nos pontos de maximização para as respostas remoção de TPH e crescimento celular.

Tabela 4.16 – Valores das variáveis intervalo de aeração (IA_e) e velocidade de agitação (VA_g) após otimização.

Experimentos	IA_e (g/L)	VA_g (g/L)
Ponto central	30	120
Ponto de otimização – remoção de TPH	33	125
Ponto de otimização – variação da concentração celular (ΔC_{bm})	26	125
Ponto otimizado adotado	33	110

4.7.3 - Monitoramento do pH

A Figura 4.27 mostra os perfis de pH durante 3 dias de operação para cada experimento do planejamento (Tabela 4.13). Vale salientar, que durante o processo em nenhum dos experimentos estudados foi realizado o reajuste de pH, apenas o ajuste inicial.

Como pode ser observado na Figura 4.27, cada experimento apresentou valores diferentes de pH iniciais, mas com valores próximos a 7,0. Além disto, observar-se que houve

uma pequena flutuação nos valores do pH dos experimentos durante todo o processo, mas ao final foi observada uma variação entre 6,4 – 7,4. Esta faixa de flutuação de pH observada para todos os experimentos, mostrou-se dentro do limite sugerido por Atlas (1988). Segundo Atlas (1988), para a maioria dos microrganismos envolvidos nos processos de biorremediação, a faixa de pH mais favorável para seu crescimento está entre 6,0 – 8,0 com um valor ótimo de 7,0, sendo que os fungos são mais tolerantes às condições altas.

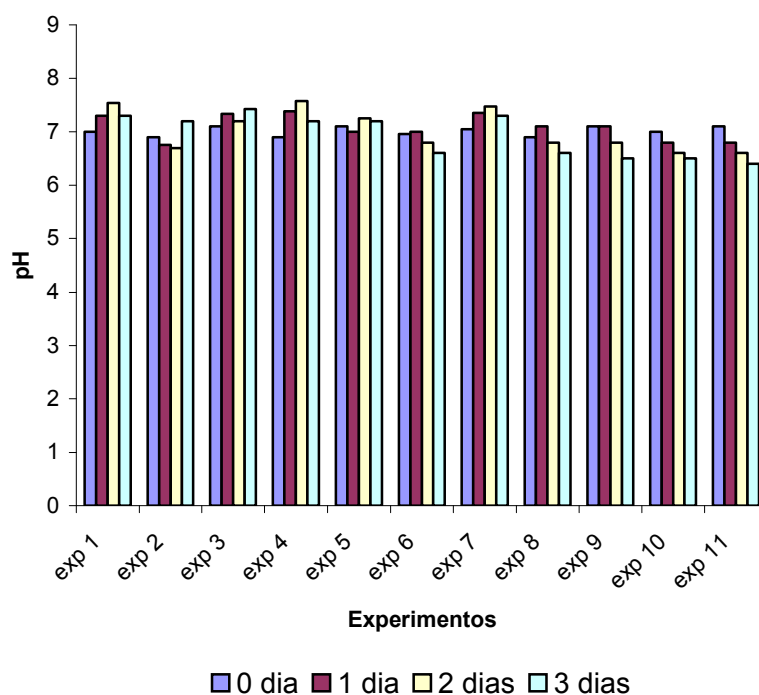


Figura 4.27- Perfil de pH dos experimentos definidos pela matriz do planejamento composto central (experimentos de 1 a 11), durante os 3 dias de processo.

Além disto, por meio da Figura 4.27 verifica-se que nas condições experimentais 9 a 11 (pontos centrais do planejamento) foram obtidas as maiores reduções nos valores de pH e os maiores valores de remoções de TPH (Tabela 4.13). Isto mostra, que a queda nos valores de pH estão diretamente relacionados ao aumento da biodegradação dos contaminantes.

4.7.4 - Monitoramento do Oxigênio Dissolvido (O_{2d})

A Figura 4.28 mostra o perfil da variação do nível de oxigênio dissolvido (O_{2d}) observado para o experimento 1. Para os demais experimentos foi observado o mesmo comportamento no consumo de oxigênio dissolvido.

A construção de cada curva da figura consistiu na observação da medida do valor inicial de oxigênio dissolvido realizado em cada intervalo de aeração até a sua queda com o tempo.

Comparando os comportamentos dos perfis de consumo de oxigênio dissolvido dos experimentos estudados observou-se, que os maiores valores de concentração de oxigênio no início do processo foram verificados nas condições experimentais com maiores velocidades de agitação e menores intervalos de tempo de aeração - experimentos 2, 5, 8, 9, 10 e 11, como era esperado. Pois, a combinação de elevadas velocidades de agitação e menores intervalos de fornecimento de ar, proporcionam o registro de maiores concentrações de oxigênio dissolvido.

Além disto, pode-se constatar pela Figura 4.28, que a queda de oxigênio dissolvido em todas as condições estudadas foram verificadas em menos de 1 hora de processo. A intensidade no consumo de oxigênio na primeira hora de processo, sugere que os microrganismos apresentam neste período uma elevada atividade biológica. Após este tempo verifica-se, que a maior parte do processo à cultura trabalha em baixas concentrações de oxigênio de 0,2 a 0,3 mg/L, mantendo ainda uma atividade sobre condição aeróbia.

Analisando a Figura 4.28, pode-se observar que durante as 72 horas de processo foram realizadas 6 aerações a cada 12 horas, sendo verificada após cada aeração queda na concentração de oxigênio dissolvido a uma concentração mínima de 0,3 g/L. Após a 2ª aeração (12 horas após o início do processo) a queda na concentração de O_2 dissolvido à concentração mínima foi obtida em um menor tempo de 8 minutos. Nas demais aerações esta queda foi mais lenta levando em torno de 45 minutos para alcançar a mesma concentração mínima de oxigênio dissolvido.

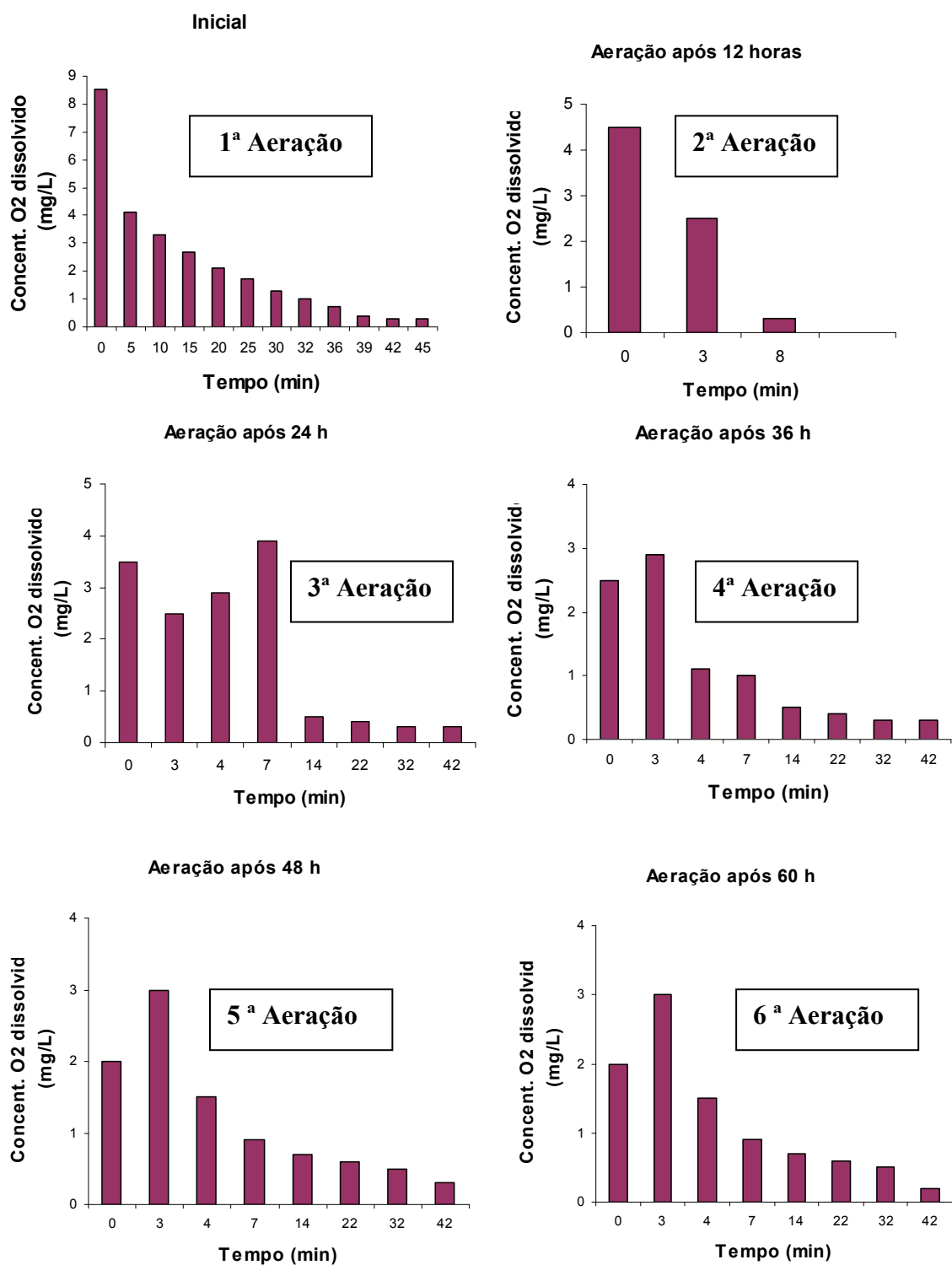


Figura 4.28 - Perfis de queda da concentração de oxigênio dissolvido no reator para as condições do experimento 1, a cada aeração intermitente (12h).

4.7. 5 - Teste de Reprodutibilidade Empregando as Melhores Condições de Intervalo de Aeração e Nível de Agitação Obtidos pelo Planejamento Experimental

O principal objetivo desta etapa foi verificar se ocorreria reprodutibilidade dos resultados, quando empregado à mesma condição experimental referente ao ponto central (R_{10}), que proporcionou melhor resultado de remoção. Além disto, verificar o desempenho da cultura mista nas condições do ponto otimizado adotado $R_{\text{pot,IA,Vag}}$ (33 h e 110 rpm) e comparar este resultado com o teórico obtido na otimização $E_{\text{pot,IA,Vag}}$ (33 h e 125 rpm). Portanto, na Tabela 4.17 estão apresentados os valores de remoções de TPH e concentrações de biomassa para as referidas condições experimentais citadas.

Vale salientar, que para os resultados de remoções de TPH já foram descontadas as perdas abióticas.

Pode-se observar pela Tabela 4.17, que ao comparar os resultados E_{10} e R_{10} , verifica-se que houve reprodutibilidade dos resultados tanto em termos do aumento da concentração de biomassa quanto de remoção de TPH, por apresentarem valores muito próximos.

Além disto, quando comparamos os resultados de remoções de TPH do ponto de otimização teórico ($E_{\text{pot,IA,Vag}} = 75,5\%$) com o resultado experimental no ponto de otimização adotado ($R_{\text{pot,IA,Vag}} = 75,9\%$) pode-se verificar, que a utilização de uma menor agitação (110 rpm) não comprometeu o resultado de remoção de TPH. Portanto, esta escolha foi válida para a remoção de TPH.

Tabela 4.17- Resultados comparativos das respostas variação da concentração de biomassa e remoção de TPH dos experimentos do ponto central e do ponto otimizado.

Condições Experimentais	(%) Remoção de TPH	ΔC_m (g/L)
E_{10} (IA= 30 h e $VA_g = 120$ rpm)	$76,2 \pm 1,30$	$2,21 \pm 0,27$
R_{10} (IA = 30 h e $VA_g = 120$ rpm)	$75,4 \pm 1,20$	$2,29 \pm 0,90$
$R_{\text{pot,IA,Vag}}$ (IA = 33 h e $VA_g = 110$ rpm)	$75,9 \pm 1,5$	$2,25 \pm 0,70$
$E_{\text{pot,IA,Vag}}$ (IA = 33 h e $VA_g = 125$ rpm)	75,5	2,21

Obs* ΔC_m (g/L)- variação da concentração de biomassa; IA- intervalo de aeração; VA_g - velocidade de agitação; E_{10} – condições experimentais definidas pela matriz do planejamento composto central (ponto central 10), e R_{10} - repetição das condições experimentais do ponto central, $E_{\text{pot,IA,Vag}}$ – condições experimentais definidas teoricamente, a partir da implementação do algoritmo (ponto otimizado) e $R_{\text{pot,IA,Vag}}$ – repetição das condições experimentais do ponto otimizado.

Ao comparar os resultados de remoções de TPH do ponto de otimização adotado ($R_{\text{pot,IA,Vag}} = 75,9\%$ - Tabela 4.17) com o resultado apresentado no ponto de otimização, apenas das variáveis concentração de nutrientes e de inóculo, da Tabela 4.11 ($R_{\text{potexp}} = 71,8\%$)

obtido em 3 dias de processo empregando a cultura C₁, pode-se observar, que houve um pequeno aumento após a otimização do intervalo de aeração e nível de agitação. Isto mostra, que a principal contribuição para o aumento da remoção de TPH estava associado às concentrações de nutrientes e inóculo. Pois, quando estas concentrações foram otimizadas a remoção passou de 59,0% para 71,8% decorridos 3 dias.

Além disto, ao compararmos os resultados de concentração de biomassa nas condições experimentais do ponto de otimização das concentrações de nutrientes e inóculo ($R_{\text{pot exp}} = 1,70 \pm 0,09$ g/L) da Tabela 4.11 com o valor obtido na Tabela 4.16 ($R_{\text{pot,IA,Vag}} = 2,25 \pm 0,70$), pode-se verificar, que após a otimização do intervalo de aeração e nível de agitação ocorreu um aumento na concentração de biomassa final. Isto possivelmente, se deve a uma maior disponibilidade de oxigênio dissolvido, uma vez que o emprego de melhores condições de aeração e agitação promove uma maior turbulência e subdivisão das bolhas de ar, resultando numa diminuição da espessura das películas interfaciais que são responsáveis por esse transporte de massa (ESPÍRITO-SANTO, 2002).

4.7.5.1 - Avaliação dos Resultados Empregando Cromatografia Gasosa para os Experimentos R_{10} e $R_{\text{pot,IA,Vag}}$

A Tabela 4.18 mostra os resultados de porcentagem de degradações das classes de hidrocarbonetos identificados após 3 dias de processo para os experimentos R_{10} e $R_{\text{pot,IA,Vag}}$. A mesma preocupação com relação à escolha dos hidrocarbonetos que representassem as 5 classes foi mantida. Os hidrocarbonetos selecionados e detectados foram numerados de 1 a 30 e são os mesmos identificados no item 4.1.2.

Tabela 4.18- Porcentagem de remoção para cada classe de hidrocarbonetos identificados no efluente.

Experimentos	R_{10}	$R_{\text{pot,IA,Vag}}$
Classes dos Hidrocarbonetos	Porcentagem de Degradação (%)	Porcentagem de Degradação (%)
Parafinas	$90,8 \pm 3$	$91,8 \pm 2$
Isoparafinas	$82,6 \pm 2$	$83,3 \pm 1$
Olefinas	$78,5 \pm 2$	$80,9 \pm 1$
Naftênicos	$37,3 \pm 1$	$39,3 \pm 2$
Aromáticos	$79,5 \pm 3$	$80,9 \pm 1$

Pode-se observar por esta tabela, que para ambas as condições experimentais estudadas, todas as classes de hidrocarbonetos identificados apresentaram porcentagem de degradação superiores a 70%, com exceção dos naftênicos.

Além disto, ao comparar os resultados de porcentagens de degradações de todas as classes de hidrocarbonetos, nas duas condições experimentais estudadas, verifica-se, que estes valores mostraram-se muito próximos. Isto pode ter ocorrido, devido às condições experimentais de R_{10} e $R_{pot,IA,Vag}$ apresentarem valores próximos e estarem dentro da região de otimização.

Ao comparar os resultados de porcentagem de remoções das classes de hidrocarbonetos nas condições otimizadas de concentração de nutrientes e inóculo (Parafinas = 87,1%, Isoparafinas = 77,7%, Olefinas = 78,6%, Naftênicos = 38,4% e Aromáticos = 71,7%) com os resultados apresentados da Tabela 4.18, pode-se observar, que a otimização do intervalo de aeração e nível de agitação proporcionou um aumento percentual dos aromáticos de aproximadamente 9%. Mas, esta última otimização não contribuiu para o aumento na remoção dos naftênicos, que praticamente manteve-se constante. Este fato mostra, o grau de recalcitrância apresentado por este composto, empregando a cultura mista C_1 , após 3 dias de processo.

As Figuras 4.29 e 4.30, mostram as porcentagens de degradação dos compostos listados na Tabela 4.12 para cada condição dos experimentos estudados (R_{10} e $R_{pot,IA,Vag}$).

Comparando as Figuras 4.29 (experimento R_{10}) e 4.30 (experimento $R_{pot,IA,Vag}$), pode-se observar o mesmo comportamento de degradação das classes de hidrocarbonetos identificados. Os valores de remoções dos compostos identificados termo a termo também se mostraram com valores próximos. Este comportamento pode ser justificado mais uma vez, pela proximidade dos valores das condições experimentais utilizadas nos dois experimentos.

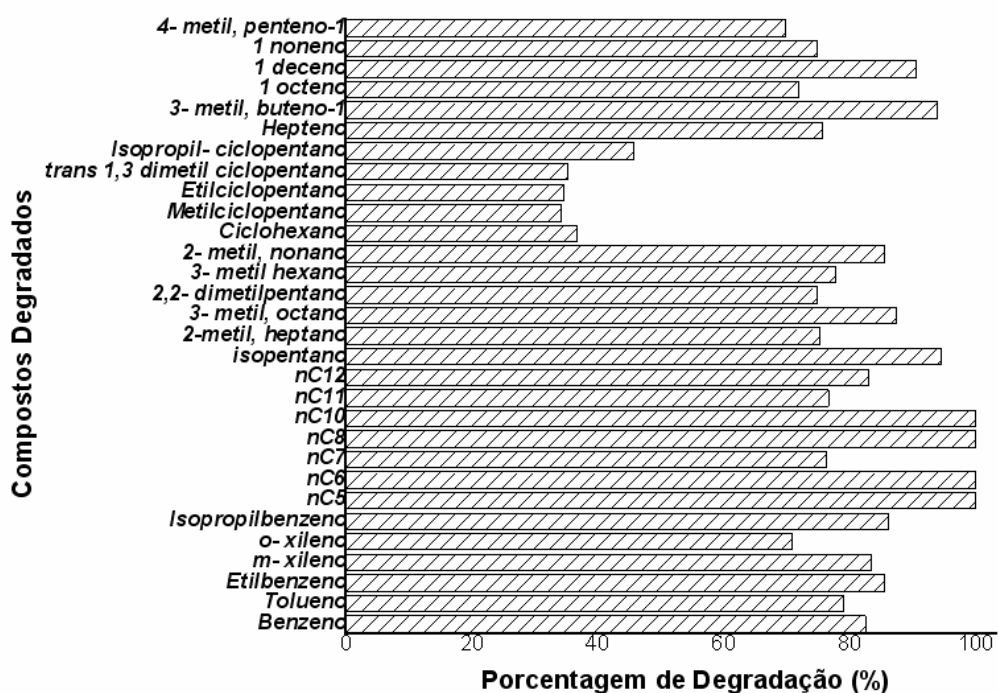


Figura 4.29 – Degradação dos hidrocarbonetos identificados para a condição do experimento R10, após 3 dias de processo.

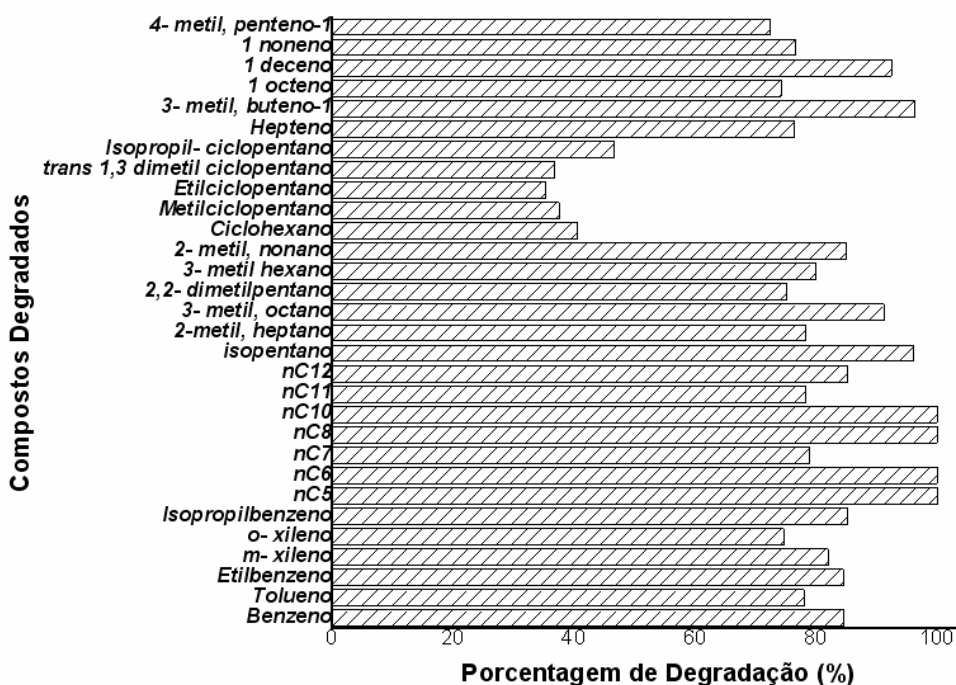


Figura 4.30 – Degradação dos hidrocarbonetos identificados para a condição do experimento R_{pot,IA,Vag}, após 3 dias de processo.

4.8 - Estudo Comparativo do Processo de Biodegradação do Efluente Contaminado Sob as Condições Com Aeração Constante (AC), Sem Aeração (SA) e com Aeração Intermitente (AI)

O objetivo desta etapa do trabalho foi comparar o desempenho de degradação dos contaminantes empregando a cultura mista, nas condições extremas de operação, com aeração constante (AC) e sem aeração (SA) e com aeração intermitente (AI). Pois, um dos objetivos deste estudo foi avaliar o processo de tratamento empregando aeração intermitente, na tentativa de diminuir os custos finais de tratamento.

Segundo Thomas e Ward (1989), o oxigênio é o fator metabólico mais crítico num processo de biodegradação. Podendo ser utilizado na biorremediação de ambientes contaminados, tanto como acceptor final de elétrons no metabolismo microbiano quanto como oxigênio molecular requerido em grande parte nas reações de degradação de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos. De acordo com Kwapisz *et al.* (2007), a assimilação de hidrocarbonetos envolve a sua oxidação pelo oxigênio molecular conduzindo a formação de intermediários, que são posteriormente incorporados dentro da rota metabólica central incluindo o ciclo de Krebs e a β - oxidação.

É citado na literatura, que em aquíferos subterrâneos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, populações microbiológicas geralmente são capazes de degradar sob condições aeróbias e anaeróbias (CHAPELLE, 1999). Mas, em geral grande parte dos trabalhos que abordam o tratamento de resíduos de hidrocarbonetos em solo ou em água subterrâneas são conduzidos por processos aeróbios pelo fato, desta condição proporcionar maiores remoções em menor tempo de processo.

Os experimentos foram conduzidos durante 22 dias de processo visando avaliar a cinética de biodegradação em menor tempo de operação.

4.8.1 - Resultados de Remoção de TPH

A Figura 4.31 mostra os resultados de concentrações e remoções de TPH durante os 22 dias de processo, nas três condições estudadas com aeração constante (AC), sem aeração (SA) e com aeração intermitente (AI).

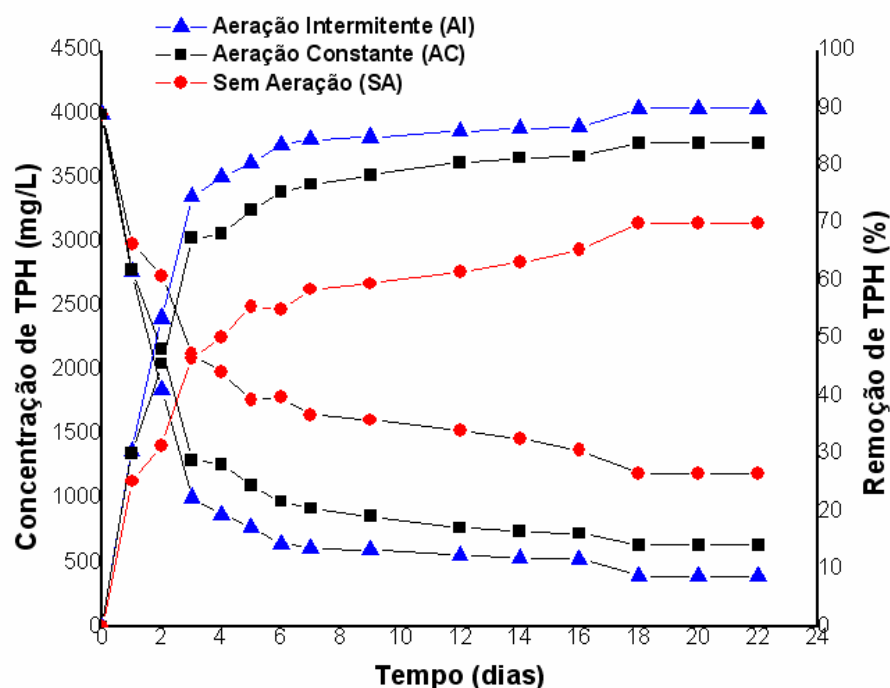


Figura 4.31 – Concentrações e remoções de TPH nas três condições estudadas AC, SA e AI, empregando a cultura mista C_1 , durante 22 dias de processo.

Comparando os resultados da Figura 4.31, observa-se o destaque da condição AI por promover os melhores resultados de remoções de TPH durante os 22 dias de operação. Este fato pode estar relacionado, a maneira pela qual foram estabelecidas as condições operacionais para o desenvolvimento destes processos (AI, AC e SA). Para os três processos estudados foram empregadas as mesmas condições operacionais de concentrações de nutrientes (nitrogênio e fósforo), concentração de inóculo, adaptação do inóculo e nível de agitação. Como estas condições operacionais foram determinados desde o início dos estudos para o processo com aeração intermitente, tais fatos, podem ter conduzido o melhor desempenho de remoção de TPH no processo AI.

Além disto, um comportamento comum verificado na Figura 4.31 está relacionado ao período de estabilização no consumo de TPH. Para todas as condições testadas (AI, AC e SA) a estabilização foi obtida a partir do décimo oitavo dia resultando em remoções de: 90, 84 e 70%, nesta ordem.

No estudo de biodegradabilidade de efluente sintético, contendo óleo diesel e gasolina, empregando a cultura mista C_1 (a mesma empregada no presente trabalho), ao final de 49 dias de processo obteve-se uma remoção de 90% (VIEIRA, 2004). Ao comparar este resultado com o melhor resultado empregando a condição AI (Figura 4.31), pode-se verificar, que o

mesmo valor de remoção de 90% foi obtido em um menor tempo de operação de 18 dias. Esta comparação mostra, a importância da otimização das condições de processo, tais como: concentração de nutrientes e inóculo, intervalo de aeração e nível de agitação para promover maiores remoções em menores tempos de operação.

Kwapisz *et al.* (2007), em seu estudo sobre o efeito dos íons nitrato e amônio na cinética de biodegradação aeróbia do óleo diesel (5g/L), empregando a cultura *Gordonia alkanivorans* S7 (bactéria desnitrificante), verificou que a condição com íons nitrato promoveu maior remoção de TPH de 81%, após 14 dias de processo. Além disto, estes mesmos autores conseguiram ao final de 3 dias de processo remoção de TPH de 38%. Comparando com o resultado obtido no presente trabalho (condição AI (Figura 4.31)) no mesmo período, constata-se que a condição AI apresentou melhor remoção com 74,7%. Vale salientar, que além do melhor resultado apresentado pelo presente trabalho em termos de remoção de TPH, o emprego da aeração intermitente em detrimento a aeração contínua é um fator favorável em relação aos custos finais de tratamento. Pois, ao analisar a utilização da aeração contínua em um sistema em grande escala, o processo torna-se dispendioso devido principalmente a dois principais fatores: 1) a elevada concentração de biomassa decorrente do processo necessitará de um tratamento posterior, pois se trata de um resíduo com elevada carga orgânica e 2) os custos com energia elétrica para promover a aeração no sistema empregando os aeradores. Estes tipos de problemas não serão verificados se o processo de aeração intermitente for empregado, pois estes custos são reduzidos ao gerar uma menor concentração de biomassa e utilização dos aeradores em um menor tempo de operação.

Por meio da Figura 4.31, observa-se em relação à concentração de TPH que a condição AI promoveu uma queda de 4000 para 400 mg/L, correspondente a uma remoção de TPH de 90%. E o valor de queda de DQO correspondente passou de 4300 para 258 mg/L, apresentado uma remoção de 94%, ao final do processo. Apesar, desta queda consideravelmente elevada na concentração de TPH o efluente ainda não se enquadraria dentro dos padrões de lançamento permitido pela legislação vigente, necessitando de um pós-tratamento. Pois, segundo Santos (2005), o Estado de Minas Gerais é amparado pela Deliberação Normativa COPAM nº 10 que estabelece normas e padrões para qualidade das águas e lançamento de efluentes nas coleções de águas. Neste caso, o valor de DQO como um dos parâmetros de qualidade do efluente não pode ultrapassar o valor de 90 mg/L para ser descartado.

4.8.2 - Resultados de pH e Crescimento de Biomassa

Os valores de crescimento de biomassa e pH estão apresentados nas Figuras 4.32 e 4.33.

Comparando os resultados apresentados na Figura 4.32 observa-se, que a condição AC proporcionou maior crescimento de biomassa e a condição SA a menor, durante os 22 dias de operação. De acordo com Schmitt (2006), em sistemas de tratamento de efluentes convencionais, sem aeração (anaeróbio), a produção de lodo é menor do que as que decorrem de processos aeróbios como lodos ativados ou filtros biológicos. A maior geração de lodo observado nos processos aeróbios estão associados ao princípio do sistema que realiza a recirculação do lodo de uma unidade para outra. Em decorrência da recirculação contínua de lodo e da adição contínua da matéria orgânica, ocorre o aumento da biomassa.

Os resultados de concentração de biomassa, obtidos ao final do processo, para as condições AC, AI e SA foram: 3,5, 2,7 e 2,1 g/L. O maior crescimento verificado na condição AC, sugere que o fornecimento de oxigênio ao sistema na vazão de 30 L/h (1 vvm) por 5 minutos a cada 33 h foi suficiente para promover as funções metabólicas dos microrganismos.

Além disto, ao analisar o comportamento comum de crescimento celular nas três condições (Figura 4.32), verifica-se que o maior pico de crescimento foi obtido nos primeiros 3 dias de processo. Comparativamente, neste mesmo período também foram observadas as maiores variações no aumento das remoções de TPH apresentados na Figura 4.31. Isto sugere, que neste período o consumo de TPH foi realizado para o crescimento dos microrganismos.

Posteriormente, decorridos os 3 dias foram verificados por meio das curvas de crescimento, 3 períodos de estabilização, sendo eles: do 3º ao 4º dia, do 5º ao 14º dia, e do 16º ao 22º dia. Percebe-se, que o 2º período apresentou o maior tempo de estabilização do crescimento. Este fato sugere, que nos 4 primeiros dias de operação, deve ter ocorrido o consumo de hidrocarbonetos mais facilmente biodegradáveis, que foram metabolizados e utilizados para o crescimento celular. A partir do 5º até o 14º dia de operação, houve um longo período em que as células entraram na fase estacionária e logo após foi condicionado um novo crescimento e uma nova estabilização verificada até o cultivo ser interrompido. Este comportamento sugere a ocorrência do fenômeno típico de diauxia.

Tal fenômeno ocorre quando o meio contém fontes de carbono (C) diferentes, como é o caso da presença de vários hidrocarbonetos de petróleo. Os microrganismos tendem a utilizar primeiramente as fontes que proporcionam maior rendimento energético. Quando tais fontes acabam há um tempo de adaptação a outro (s) substrato (s), que é consumido. Portanto, a

velocidade de crescimento é maior quando o primeiro (s) substrato (s) é consumido (consumido nos primeiros 4 dias), o que não acontece com os demais substratos.

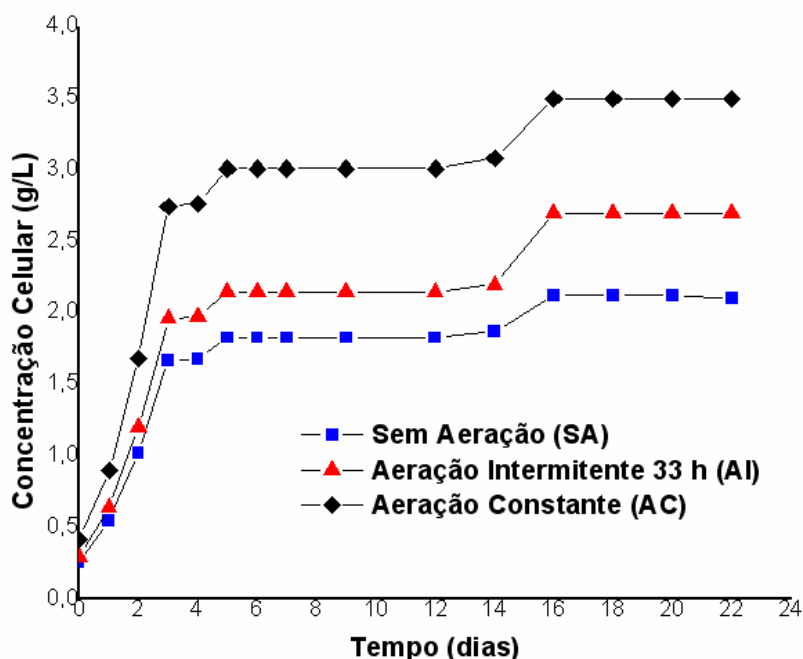


Figura 4.32- Concentrações de biomassa nas três condições estudadas AC, SA e AI, ao longo dos 22 dias de processo.

Além disto, como neste trabalho a fonte de matéria orgânica (gasolina e óleo diesel) fornecida aos microrganismos é composta por uma variedade de hidrocarbonetos e a cultura mista apresenta diversos microrganismos, a combinação destes fatores pode gerar a produção de metabólitos. Dependendo das características dos metabólitos formados pode haver o consumo destes por outros microrganismos secundários no processo, ocasionando um período de adaptação a esta nova condição.

Ao analisar os resultados em relação ao pH, observa-se na Figura 4.33 que não houve variações significativamente elevadas nos valores de pH para os sistemas estudados (AC, SA e AI). O ligeiro decréscimo observado pode estar relacionado à formação de compostos ácidos intermediários do metabolismo (CUNHA, 2004).

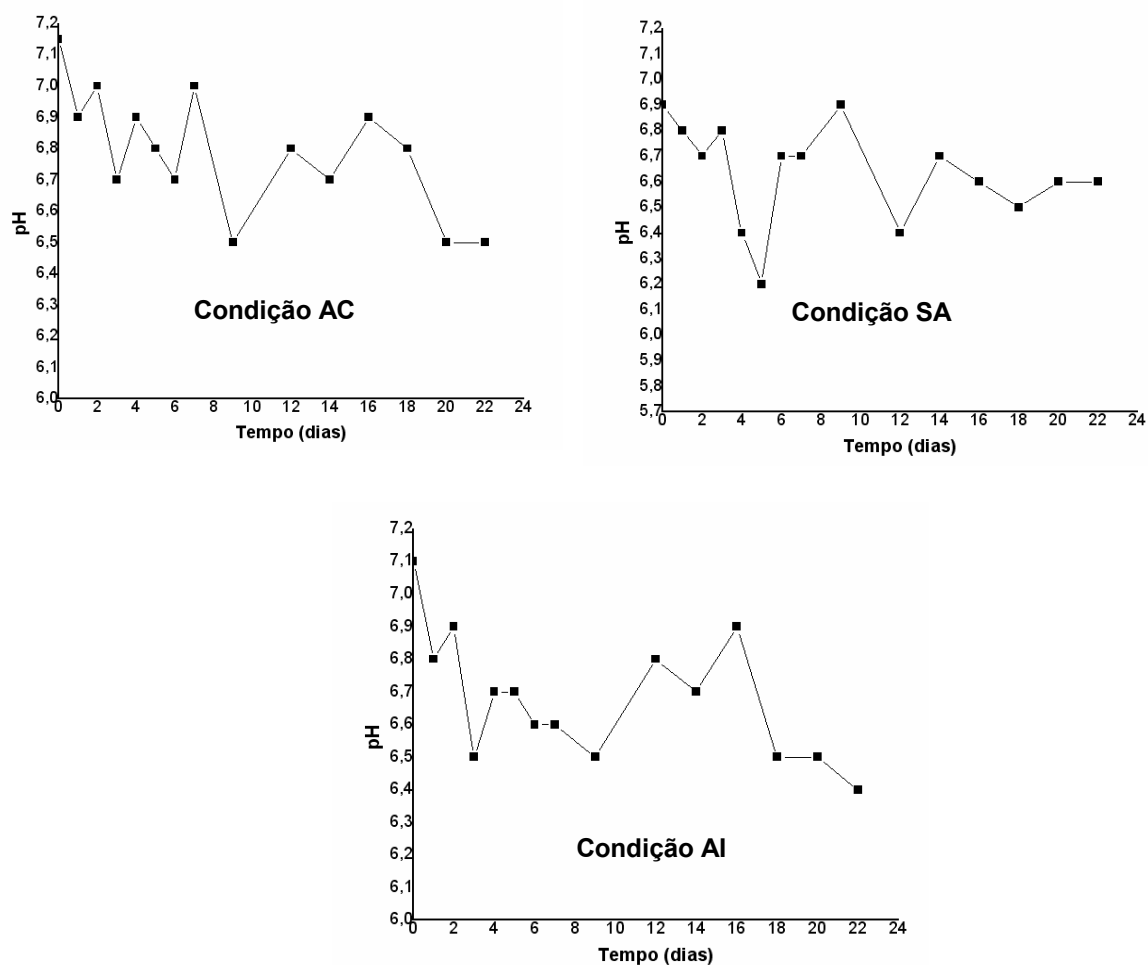


Figura 4.33- Perfil de pH para as condições AC, SA e AI, ao longo dos 22 dias de processo.

As variações nos valores de pH observadas para os processos AC, SA e AI no início e no final do processo (22 dias) foram: 7,1 a 6,5, 6,9 a 6,6 e 7,1 a 6,4, respectivamente.

4.8.3 - Remoção dos Hidrocarbonetos Avaliada por Análise Cromatográfica

A Tabela 4.19 mostra os resultados médios em termos de porcentagens de degradações das classes de hidrocarbonetos identificados, nas condições AC, SA e AI, ao final de 22 dias de processo.

Pode-se verificar por esta tabela, que ao final de 22 dias de processo as condições AI e AC apresentaram os melhores resultados de porcentagem de remoção em relação a todas as classes de hidrocarbonetos listadas. Além disto, os valores de remoções apresentados por estas duas condições mostraram-se muito próximos.

De acordo com a Tabela 4.19 a ordem de suscetibilidade das classes de hidrocarbonetos ao ataque pela cultura mista foram: parafinas > olefinas > isoparafinas > aromáticos > naftênicos, nas condições AI e SA. Na condição AC (aeração constante) esta ordem passou a ser: parafinas > isoparafinas > olefinas > aromáticos > naftênicos. Estas seqüências estão próximas com a ordem relatada por Coelho (2005). Segundo Peters e Moldowan (1993) *apud* Coelho (2005), estudos realizados em laboratório e no campo têm mostrado, que os hidrocarbonetos saturados e aromáticos, e as frações de resinas e asfaltenos diferem em relação à suscetibilidade ao ataque microbiano, normalmente seguindo uma ordem decrescente de biodegradabilidade relativa: parafinas > isoparafinas > aromáticos de baixo peso molecular > naftênicos > aromáticos de elevado peso molecular > resinas e asfaltenos.

Tabela 4.19- Porcentagens de remoções das classes de hidrocarbonetos identificados para cada condição operacional estudada ao final de 22 dias de processo.

Experimentos	Aeração Intermitente (AI)	Aeração Constante (AC)	Sem Aeração (SA)
Classes dos Hidrocarbonetos	Porcentagem de Degradação (%)	Porcentagem de Degradação (%)	Porcentagem de Degradação (%)
Parafinas	99,6 ± 1	98,5 ± 3	76,8 ± 2
Isoparafinas	94,0 ± 2	90,0 ± 4	70,1 ± 4
Olefinas	95,4 ± 3	83,7 ± 2	72,8 ± 3
Naftênicos	70,8 ± 2	62,2 ± 1	56,2 ± 5
Aromáticos	83,4 ± 1	80,6 ± 3	66,2 ± 3

Além disto, quando comparados os melhores resultados da Tabela 4.18 ($R_{pot,IA,Vag}$ - ao final de 3 dias de processo com aeração intermitente otimizada) com os da Tabela 4.19 (AI- ao final de 22 dias de processo), pode-se verificar, que a extensão do tempo de operação ocasionou maiores variações de aumento nos valores de biodegradações apenas dos naftênicos e das olefinas, com 33,5 e 16,9%, respectivamente. As demais classes de hidrocarbonetos também apresentaram aumentos percentuais, mas estes foram em média inferiores a 10% para as parafinas e isoparafinas e 5% para os aromáticos, respectivamente.

Estes resultados sugerem, que para todas as condições experimentais estudadas e estabelecidas (concentração de nutrientes, inóculo, nível de agitação e condição de aeração), que o consumo máximo das classes de hidrocarbonetos identificadas foram em % de: 99,6 para as parafinas, 94,0 para as isoparafinas, 95,4 para as olefinas, 70,8 para os naftênicos e 83,4 para os aromáticos, respectivamente.

No estudo de Prince *et al.* (2007) avaliando a biodegradação aeróbia de gasolina em meio líquido, empregando lodos ativados de tratamento de esgoto, constataram que a maior biodegradação dentre as classes de hidrocarbonetos identificados foi observada em relação aos maiores *n*-alcanos e *iso*-alcanos e os menores compostos aromáticos alquilados, seguido pelos menores *n*-alcanos e *iso*-alcanos e naftênicos. Os últimos compostos a serem degradados foram: butano, *iso*-butano e o 2,2-dimetilbutano.

Vieira (2004) analisando o consumo dos compostos de hidrocarbonetos presentes no efluente sintético, contendo óleo diesel e gasolina, verificou após 49 dias de processo um consumo de 81,8 % das parafinas e isoparafinas, 100% das olefinas e naftênicos e 30% dos aromáticos, empregando a cultura mista C₁ (a mesma empregada no presente estudo). Ao compararmos estes resultados com o melhor resultado apresentado no presente trabalho (Tabela 4.19, condição AI), pode-se verificar, que apesar de não ter verificado consumo total das classes de olefinas e naftênicos no presente trabalho, houve um aumento considerável principalmente na degradação dos aromáticos, que passou de 30% para 83,4%. Mostrando, que as novas condições operacionais otimizadas favoreceram ao aumento no consumo desta classe de hidrocarbonetos, em um menor tempo de operação de 22 dias de processo.

A fim de ilustrar o consumo dos compostos pertencentes às 5 classes de hidrocarbonetos listados na Tabela 4.19, nas Figuras 4.34 a 4.36 e na Tabela 4.20 estão apresentados os resultados de consumo de cada hidrocarboneto identificado nas condições AI, AC e SA, após 22 dias de processo.

Para as discussões seguintes serão levados em consideração apenas os resultados referentes à Figura 4.34, relacionada à condição AI, que apresentou os melhores resultados de consumo dos hidrocarbonetos.

Dos *n*-alcanos identificados, os únicos compostos que não apresentaram consumo total ao final de 22 dias de processo foram: o heptano (nC₇) e o undecano (nC₁₁).

Em relação aos *iso*-alcanos (Figura 4.33), os compostos da forma 2-metil apresentaram maior biodegradação do que as formas 3-metil. Prince *et al.* (2007), estudando a biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos também verificaram o mesmo comportamento, com exceção dos compostos 2 e 3-metil pentano, que foram degradados em porcentagens muito semelhantes. Segundo estes autores, há uma preferência para a biodegradação da forma 2-metil sobre as formas 3 e 4-metil. Além disto, eles verificaram que a biodegradação do 3-etil hexano foi menor do que o 3-metil pentano, mas foi semelhante às formas dimetil. E as formas trimetil ficaram entre os compostos mais recalcitrantes.

Ao analisar os naftênicos, observa-se pela Figura 4.34, que o ciclohexano foi o único composto que apresentou remoção total ao final de 22 dias de processo. Segundo Prince *et al.* (2007), o ciclohexano é completamente biodegradado dentro de um período de 8 dias. O único composto que apresentou menor porcentagem de degradação foi 4-metil, penteno-1, com valor inferior a 90%. De acordo com Prince *et al.* (2007), as olefinas lineares com uma insaturação simples podem ser completamente biodegradadas se as condições operacionais forem ideais.

Com relação aos compostos aromáticos, pode-se verificar, que o benzeno e o etilbenzeno além de apresentarem mesmos valores de remoções foram os mais biodegradados, com 87,2%, seguido do isopropilbenzeno, m-xileno, tolueno e o-xileno com valores em % de: 84,5, 84,2, 80,1 e 77,3, respectivamente, ao final de 22 dias de processo. Mas, se compararmos estes resultados com os resultados cromatográficos apresentados no item 4.7.5.1 (Figura 4.30) ao final de 3 dias de processo, nas mesmas condições experimentais, podemos verificar que o aumento médio percentual para estes compostos após mais 19 dias de processo foi mínimo, de aproximadamente 2,5%. Isto mostra, que para os aromáticos o consumo máximo destes compostos foi verificado nos primeiros 3 dias de processo.

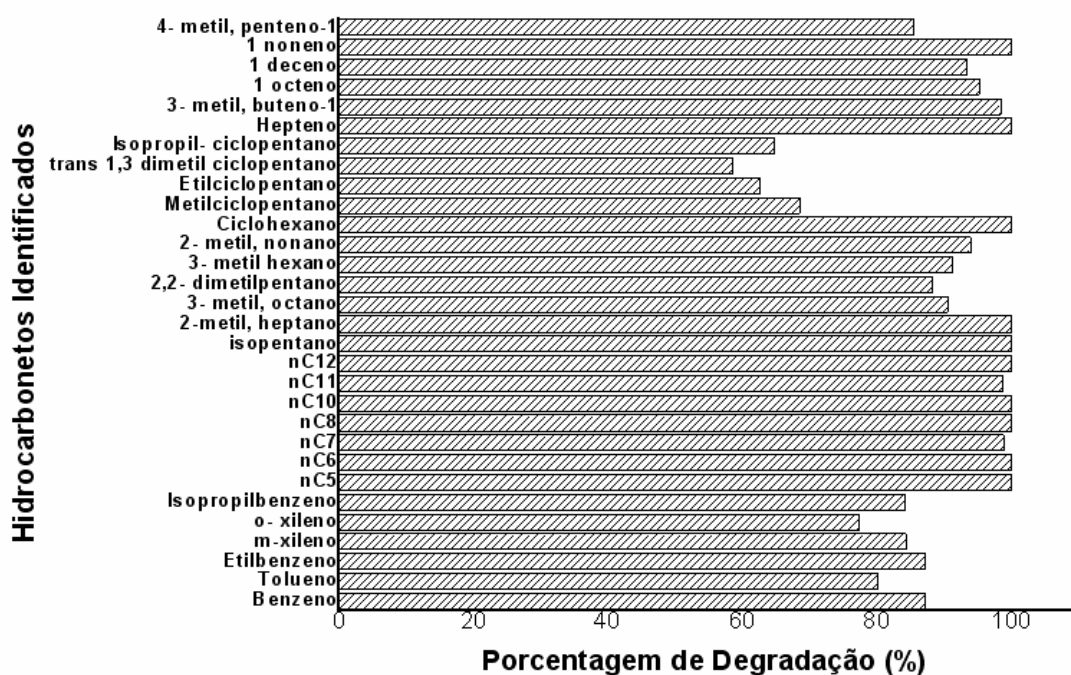


Figura 4.34- Porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos na condição AI após 22 dias de processo.

De acordo com a Figura 4.29, após os 3 dias foram verificados os seguintes valores de porcentagem de remoções % de: 84,6 para o benzeno, 78,0 para o tolueno, 84,5 para o etilbenzeno, 82,0 para o *m*-xileno, 74,6 para o-xileno e 85,2 para o *isopropil*benzeno, respectivamente.

Tabela 4.20- Porcentagens de degradação dos hidrocarbonetos identificados sob as condições AI, AC e SA, após 22 dias de processo.

Número de Compostos	Compostos	Aeração Intermitente (AI)	Aeração Constante (AC)	Sem Aeração (SA)
		(%) Degradação	(%) Degradação	(%) Degradação
1	Benzeno	87,2	84,3	68,4
2	Tolueno	80,1	77,4	65,6
3	Etilbenzeno	87,2	84,3	69,2
4	<i>m</i> -xileno	84,3	81,5	63,7
5	<i>o</i> - xileno	77,3	74,7	63,1
6	<i>Isopropil</i> benzeno	84,1	81,3	67,6
7	<i>n</i> C5	100	100	76,2
8	<i>n</i> C6	100	100	78,3
9	<i>n</i> C7	98,8	95,6	67,5
10	<i>n</i> C8	100	100	80,7
11	<i>n</i> C10	100	100	81,9
12	<i>n</i> C11	98,7	94,3	73,4
13	<i>n</i> C12	100	100	79,6
14	<i>isopentano</i>	100	100	74,2
15	2-metil, heptano	100	97,2	73,4
16	3- metil, octano	90,5	84,6	66,7
17	2,2- dimetilpentano	88,2	82,3	65,6
18	3- metil hexano	91,3	87,4	69,5
19	2- metil, nonano	93,9	88,5	71,4
20	Ciclohexano	100	100	77,6
21	Metilciclopentano	68,5	54,8	51,8
22	Etilciclopentano	62,5	50,1	49,4
23	<i>trans</i> 1,3 dimetil ciclopentano	58,5	49,8	48,6
24	<i>Isopropil</i> - ciclopentano	64,7	56,3	53,5
25	Hepteno	100	87,5	74,3
26	3- metil, buteno-1	98,4	90,4	78,5
27	1 octeno	95,2	83,5	72,6
28	1 deceno	93,4	87,9	75,4
29	1 noneno	100	79,1	70,1
30	4- metil, penteno-1	85,5	74,1	62,4

Cunha (2004), em seu estudo de biorremediação de água subterrânea verificou em sua avaliação do percentual de degradação dos componentes da gasolina nos sistemas de bioestimulação, empregando várias estirpes isoladas de um solo contaminado, os seguintes valores máximos de percentuais de degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno, *m*-xileno, *o*-xileno em % de: 81,5, 61,8, 72,9, 74,6, 66,8, respectivamente, após 10 dias de processo. Ao compararmos estes valores com os valores obtidos na Figura 4.29 (item 4.7.5.1), pode-se verificar que o presente trabalho apresentou melhores resultados em termos de consumo destes hidrocarbonetos.

Ao analisar a Figura 4.35, pode-se verificar que na condição AC os únicos compostos que apresentaram degradação total foram: nC_5 , nC_6 , nC_8 , nC_{10} , nC_{12} , isopentano e o ciclohexano. No processo sem aeração como mostra a Figura 4.36, foi verificado que apenas os compostos nC_8 e nC_{10} apresentaram porcentagens de degradação superiores a 80%.

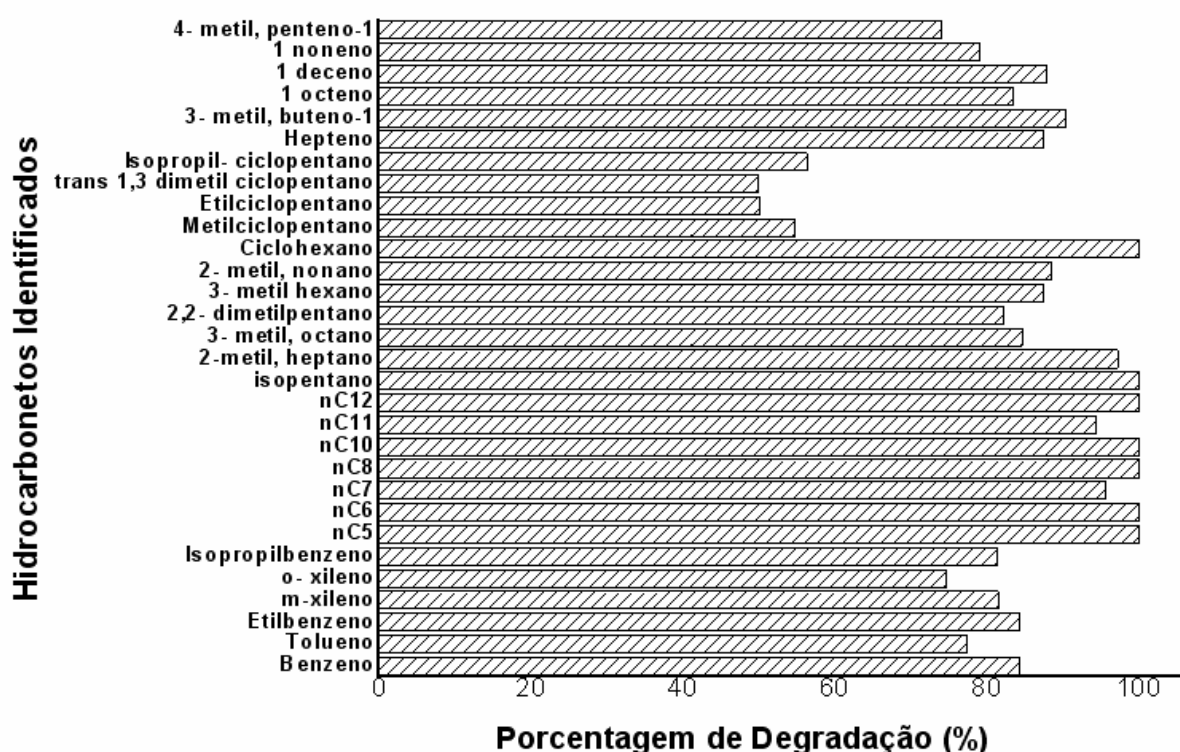


Figura 4.35- Porcentagem de degradação dos hidrocarbonetos identificados na condição AC após 22 dias de processo.

Segundo Prince *et al.* (2007), as utilizações de microrganismos nativos (geralmente culturas mistas) proporcionam a degradação de um vasto leque de hidrocarbonetos, mais efetivamente, quando os hidrocarbonetos são fornecidos como uma mistura de substratos, o

que pode estimular alguns microrganismos em utilizar os intermediários resultantes de diferentes rotas para balancear seu metabolismo global, promovendo menores valores de contaminação. Mohanty e Mukherji (2007), estudando a porcentagem de biodegradação de *n*-alcanos por culturas *Exiguobacterium aurantiacum* e *Burkholderia cepacia*, compararam a taxa de decaimento máximo do *n*-C₁₆ quando presente sozinho como substrato e como um componente do óleo diesel, empregando as duas culturas. Verificaram que a taxa de decaimento máximo foi significativamente maior para o *n*-hexadecano como um componente no óleo diesel, empregando a cultura *Exiguobacterium aurantiacum*.

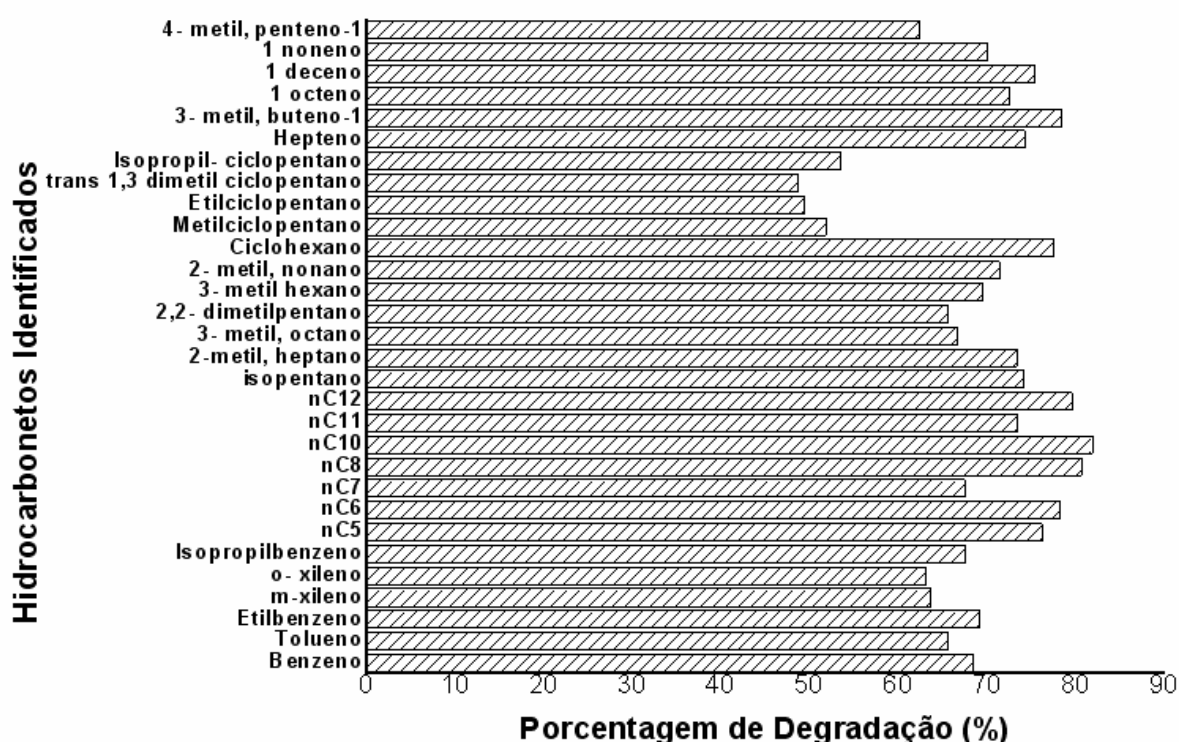


Figura 4.36- Porcentagem de remoção dos hidrocarbonetos identificados na condição SA após 22 dias de processo.

Em termos gerais deste estudo pode-se concluir, que o presente trabalho proporcionou resultados consideravelmente elevados de porcentagem de degradações dos hidrocarbonetos identificados, mostrando a elevada capacidade metabólica da cultura mista empregada, após a otimização das condições operacionais estudadas. Pode-se observar, por meio dos resultados obtidos, que este trabalho conseguiu proporcionar uma evolução no aumento da remoção de TPH, após a otimização das condições operacionais de processo, empregando a cultura mista. Esta evolução, muitas vezes, não é verificada em diversos trabalhos científicos devido, a erros

cometidos durante a etapa de adaptação das culturas ao efluente contaminado. Pois, esta etapa é crucial para a seleção dos microrganismos mais resistentes e com maior capacidade metabólica em biodegradar os contaminantes. Por isto, é necessário estabelecer com critério as condições operacionais desta etapa, que será responsável pela sustentação para os estudos subsequentes.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1 – Conclusões

- Na cinética de biodegradação a cultura mista atingiu seu máximo de remoção de TPH ao sétimo dia de operação, com 79,3%, a partir deste período não foi verificado aumento considerável na remoção até o final do processo;
- Foi possível substituir o extrato de levedo por levedura cervejeira autolizada sem prejuízo na remoção de TPH;
- Aplicando o primeiro planejamento composto central (PCC) foi possível determinar a condição de otimização das variáveis estudadas. Nesta condição a remoção de TPH foi de 71,8%. Antes de aplicar o PCC a maior remoção, após 3 dias de biodegradação, era de 60,5%. Isto mostra a importância da determinação das melhores condições experimentais avaliando as variáveis de forma conjunta;
- A menor biodegradação foi observada para os hidrocarbonetos naftênicos com valores de remoção inferiores a 40%, devido a sua maior recalcitrância quando comparado aos demais hidrocarbonetos. Para as demais classes de hidrocarbonetos a biodegradação, após 3 dias de processo, foi superior a 70%. Destacando que para as parafinas a remoção de TPH foi em média de $87,1 \pm 1\%$;
- Com o segundo planejamento composto central (PCC) foi possível determinar a condição de otimização das variáveis estudadas, intervalo de aeração e nível de agitação nos valores de 33 h e 110 rpm. Nesta condição a remoção de TPH foi de 75,9 %, após 3 dias de processo;
- A otimização do intervalo de aeração e nível de agitação proporcionou um maior aumento percentual de biodegradação dos aromáticos (aumentou de 9%). Mas, esta última otimização não contribuiu para o aumento na remoção dos naftênicos, que praticamente manteve-se constante. Este fato mostra, o grau de recalcitrância apresentado por este composto empregando a cultura mista C₁, para o tempo de operação de 3 dias;
- No estudo comparativo do processo de biodegradação do efluente contaminado sob as condições com aeração constante (AC), sem aeração (SA) e com aeração intermitente (AI), verificou-se que a condição com AI proporcionou maiores remoções de TPH durante

os 22 dias de processo. E ao final apresentou remoção de 90% de TPH. Como todas as condições operacionais (adaptação da cultura, concentração de nutrientes, concentração de inóculo e velocidade de agitação) aplicadas aos 3 processos (AC, AI e SA) foram determinadas para condição com aeração intermitente (AI), isto pode ter condicionado os maiores valores de remoções empregando a condição AI;

- Em relação aos resultados cromatográficos a ordem de suscetibilidade das classes de hidrocarbonetos ao ataque pela cultura mista, verificada na condição AI foram: parafinas > olefinas > isoparafinas > aromáticos > naftênicos;
- Para a condição experimental AI foi verificado, que em relação aos hidrocarbonetos identificados à extensão do tempo de operação de 3 para 22 dias de processo proporcionou maiores variações de aumento nos valores de biodegradações apenas dos naftênicos e das olefinas, com 33,5 e 17,2%, respectivamente. As demais classes de hidrocarbonetos também apresentaram aumentos percentuais, mas estes foram em média inferiores a 10% para as parafinas e isoparafinas e 5% para os aromáticos, respectivamente.

5.2 – Sugestões para Próximos Trabalhos

Após a análise global dos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se para posteriores estudos:

- Estudar a diluição do efluente em água ou em esgoto doméstico visando diminuir a carga orgânica final, mantendo as relações de nutrientes;
- Realizar um tratamento físico-químico, como por exemplo, os Processos Oxidativos Avançados (POA's), após o tratamento biológico, a fim de reduzir a carga orgânica final;
- Avaliar a capacidade de produção de biosurfactantes pela cultura mista;
- Testar o efeito da adição de biosurfactantes no meio, visando a aumentar o contato entre o substrato (contaminante) e os microrganismos, favorecendo a maior degradação dos contaminantes;
- Avaliar a adição intermitente de fertilizantes durante a cinética de biodegradação do efluente, visando a manter a relação nutricional com intuito de aumentar a degradação dos contaminantes;
- Adaptar a cultura mista sob condição aeróbia;
- Sob condição aeróbia, estudar a otimização das condições operacionais como: concentração de nitrogênio, concentração de fósforo e concentração de inóculo, nível de agitação e vazão de ar;
- Adaptar a cultura mista sob condição anaeróbia;
- Sob condição anaeróbia, estudar a otimização das condições operacionais como: concentração de nitrogênio, concentração de fósforo e concentração de inóculo e nível de agitação;
- Avaliar diferentes formas de condução do processo de biodegradação do efluente (batelada alimentada, cíclica ou contínua);
- Avaliar a sedimentabilidade da cultura mista visando melhorar a separação da mesma e a aplicação de processo contínuo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT/NBR 9898. Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores, Rio de Janeiro-RJ, 22 p, 1987.
- ALEXANDER, M. Biodegradation and bioremediation. Academic Press, 302 p, 1994.
- ALEXANDER, M. In: Biodegradation and Biorremediation. Academic Press, 2nd ed., San Diego, Califórnia, 239p, 1996.
- ALVAREZ-COHEN L.; SPEITEL JR, G.E. Kinetics of aerobic cometabolism of chlorinated solvents. Biodegrad. v. 12, pp. 105–126, 2001.
- AMADI, A. An assessment of the performance of some petroleum hydrocarbon degrading microorganisms in aqueous axenic cultures, Discov. Innov. v. 4 . pp. 61–67, 1992.
- ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: environmental perspective. Microbial Reviews, v. 45, n. 1, pp. 180-209, 1981.
- ATLAS, R.M. Petroleum microbiology. USA, Mcmillan Publishing, 692p, 1984.
- ATLAS, R.M. Microbiology - Fundamental and applications. 2nd ed. New York - USA, Mcmillan Publishing Co, 1988.
- ATLAS, R.M. Microbial hydrocarbon degradation: Bioremediation of oil spill. 1991.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. Journal Microbial, v. 18, pp. 1851-1855, 1972.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. Biochemical engineering fundamentals, 2nd ed. New York, Editor MacGraw-Hill Book Company, 1986.
- BENKACOKER, M.O., EKUNDAYO, J.A. Applicability of evaluating the ability of microbes isolated from an oil spill site to degrade oil, Environ. Monit. Assess. v. 45. pp. 259–272, 1997.
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. Biodeterioration of stored diesel oil: Studies in Brazil, Internat. Biodet. & Biodegrad., v.47, pp. 107-112, 2001.
- BIELICKA, K.; KACZOREK, E.; OLSZANOWSKI, A.; VOELKEL, A. Examination of biodegradation of hydrocarbons in emulsified systems, Publish J. Environ. Stud. v.11 pp. 11–16, 2002.
- BOLDÚ, F. X. P.; VERVOORT, J.; GROTENHUIS J. T. C.; VAN GRAENISIJN J. W. Substrate interations during the biodegradation of Benzene, Toluene, Etilbenzene, and Xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. Strain T₁. Appl. And Environm. Microb. pp. 2660-2665, 2002.

- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. Biores. Techn., v. 74, pp. 63-67, 2000.
- BOOPATHY, R. Anaerobic Biodegradation of n0, 2 diesel fuel in soil: a soil column study. Biores. Techn., v. 94, pp. 143-151, 2004.
- BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. Vol. 1. 1ª Edição. Editora Edgard Blucher. 288p, 2001.
- BOSSERT, I. D.; BARTHA, R. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: ATLAS, R.M. (ed.). Petrol. Microb. New York, Macmillan Publishing Co, 1984.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, T. S. Statistics for Experimenters. United States of America and Canada, John Wiley & Sons, Inc, 1978.
- BROWN, L.R. Oil-degrading microorganisms. Chem. Engin. Progress, October, p. 35-40, 1987.
- CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. v. 19, pp. 324-333, 1997.
- CERNIGLIA, C. E.; GIBSON, D. T. Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum* strain PR-6. Biochem. & Biophys. Res. Communic., V. 88, pp. 50-58, 1979.
- CHAPELLE, F.H. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated ground water: The perspectives of history and hydrology. Ground Water. v. 37, pp. 122-132, 1999.
- COELHO, M. F. Estudo do uso de fertilizante NPK imobilizado na biorremediação de derrames de petróleo no mar simulação em laboratório. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Macaé – RJ, 110p., 2005.
- COPELAND, R.A. Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. VCH Publishers, Inc., New York, NY, 1996.
- COULON F.; PELLETIER, E.; GOURBANT, L.; DELILLE D. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub Antarctic soil. Chemosp. v. 58. pp. 1439-1448, 2005.
- CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação para derrames de petróleo. Revista Ciência Hoje. v. 30, p. 129, 2002.
- CRAVO JR., W.B. Biodegradação de querosene de aviação (QAV) por culturas mistas e por *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertação de Mestrado, Escola de Química - UFRJ, 68p, 1998.

- CUNHA, C. D. Avaliação de Diferentes Tecnologias de Biorremediação de Água Subterrânea Contaminada com Gasolina e Análise Molecular da Comunidade Bacteriana Presente. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Escola de Química. 176p, 2004.
- CUNHA, C. D.; DO ROSÁRIO, M.; ROSADO, A. S.; LEITE, S. G. F. Serratia sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. Process Biochemistry, v. 39, pp. 2277-2282, 2004.
- CUNHA, C.D; LEITE, S.G.F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms, Brazil. J. Microbiol. v.31. pp. 45–49, 2000.
- DAVIES, J. S.; WESTLAKE, W.S. Crude oil utilization by fungi, Can. J. Microbia v.25, pp. 146-156, 1978.
- DAVIS, J.W.; MADSEN, S. Factors affecting the biodegradation of toluene in soil. Chemosp., v. 33, n. 1, pp. 107-130, 1996.
- DEBBRECHT, F.J. Qualitative and quantitative analysis by gas chromatography. In: Modern Practice of Gas Chromatography. Wiley-Interscience, pp. 451-475, 1985.
- DEL'ARCO, J. P.; DE FRANÇA, F.P. Biodegradation of crude oil in sandy sediment. Intern. Biodet. & Biodegrad., v. 44 pp. 87-92, 1999.
- DEL'ARCO, J. P.; DE FRANÇA, F.P. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. Environ. Pollut., v. 110 pp. 515-519, 2001.
- DIAZ, M.P.; GRIGSON, S.J.W.; PEPPIATT, C.J.; BURGESS, J.G. Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments, Mar. Biotech. v.2. pp. 522–532, 2000.
- DORN, P.B.; SALANITRO, I.P. Temporal Biological Assesment of oil contaminated sails before and after bioremediation". Chemosp., v. 40 pp. 419-426, 2000.
- ESPÍRITO-SANTO, L S. Biodegradabilidade de óleo Diesel por microrganismos nativos da areia da praia de Suape – PE e predição de um modelo relacionado ao derramamento do poluente. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil, 2002.
- FELIPE, C. A. V. Influência das variáveis de processo na qualidade de semente de soja submetidas à secagem em leito deslizante e escoamentos concorrentes. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG, 156p, 1999.

- FERRARI, M. D. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y su aplicación en la biorremediación de suelos y lodos contaminados. Rev. Argentina Microbiol., v. 28, p.83- 98, 1996.
- FOGHT, J.; SEMPLE, K.; GAUGHIER, C.; WESTLAKE, D.W.S.; BLENKINSOPP, S.; SERGY, G.; WANG, Z.; FINGAS, M. Effect of nitrogen source on biodegradation of crude oil by defined bacterial consortium incubated under cold marine conditions. Environ. Techn., v. 20 pp. 839-849, 1999.
- GHAZALI, F.M.; ABDUL RAHMAN, R.N.Z.; SALLEH, A.B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium, Intern. Biodet. Biodeg. v.54. pp. 61–67, 2004.
- GOGOI, B.K.; DUTTA, N.N.; GOSWAMI, P.; KRISHNA MOHAN, T.R. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site, Adv. Environ. Res. v. 7. pp. 767–782, 2003.
- GRADY, C. P. L. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. Biotech. Bioeng., v. 27, pp. 660-674, 1985.
- GRISHCHENKOV, V.G.; TOWNSEND, R.T.; MCDONALD, T.J.; AUTENRIETH, R.L.; BONNER, J.S.; BORONIN, A.M. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions, Process Biochem. v.35. pp. 889–896, 2000.
- GRUIZ, K.; KRISTON, E. In situ bioremediation of hydrocarbon in soil. Journ. of soil contaminat., v. 4 n. 5, 1996.
- GUIMARÃES A. P.; CESÍDIO E. H.; MARTINS M. T., AZEVEDO D. C. S.; CAVALCANTE JR C. L. Utilização da técnica de cg/em para caracterização de gasolinas. 2º Cong. Bras. de p&d em Petróleo & Gás, 2004.
- GUO, C. L.; ZHOU, H. W.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Isolation of PAH degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. Marine Pollut. Bulletin, in press, 2005.
- HAWS, N. W.; BALL, W. P.; BOUWER G. J. Modelling and interpreting bioavailability of organic contaminant mixtures in subsurface environments. Jour. of Contamin. Hydrol. v.82. pp. 255-292, 2006.
- HUN, C. J.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. Biochemical Engineering Journal, v.15, pp. 151-174, 2003.

- ILORI, M.O., AMOBI, C.J., ODOCHA, A.C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading Aeromonas spp. isolated from a tropical environment, Chemosp., v. 61, pp. 985-992, 2005.
- JAMINSON, V.W.; RAYMOND, R.L.; HUDSON, I.O. Biodegradation of high-octane gasoline. Dev. Ind. Microbial, v. 16, pp. 305-312, 1975.
- JOHNSEN, A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environ. Pollut., v. 133, p. 71-84, 2005.
- JUHASZ, A. L., & NAIDU, R. Bioremediation of high- molecular- weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. Int. Biodet. Biodeg. v. 45, pp. 57-88, 2000.
- KALUARACHCHI, J.J.; CVETKOVIC, V.; BERGLUND, S. Stochastic analysis of oxygen- and nitrate-based biodegradation of hydrocarbons in aquifers, J. Cont. Hydrol. v. 41. pp. 335–365, 2000.
- KATAOKA, A. P. A. G. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.
- KREPSKY, N.; SOBRINHO, F. S.; CRAPEZ, M.A.C. Biodetergentes para Limpeza de Petróleo. Revista Ciência Hoje. v. 38, pp.70-73, 2006.
- KWAPISZ, E.; WSZELAKA, J.; MARCHUT, O.; BIELECKI, S. The effect of nitrate and ammonium ions on kinetics of diesel oil degradation by Gordonia alkanivorans S7. Internat. Biodet. & Biodegrad. Article In Press, 2007.
- LAKHA, S.S.; MILLER, M.; CAMPBELL, R.G.; ELAHIMANESH, K.S.P.; HART, M.M.; TREVORS, J.T. Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges, J. Microbiol. Meth. pp. 9–19, 2005.
- LAPINSKAS, J. Bacterial degradation of hydrocarbon contamination in soil and groundwater. Chem. Ind., v. 23, pp. 784-789, 1989.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbial Review, v. 54, n. 3, pp. 305-315, 1990.
- LEBLANC, L.; FITZGERALD, A. Bioremediation. Striking Successes in spill cleanup, but obstacles remain Off Shore. September, pp. 26-30, 1990.
- LETHOMAKI, L.; NIEMELA, S. Improving Microbial Degradation of oil in soil. AMBIO, v. 4, n. 3, pp. 126-129, 1975.

- LIEBERG, E.W.; CUTRIGHT, T.J. The investigation of bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in PAH contaminates soil. Intern. Biodet. and Biodeg., v. 44, pp. 55-64, 1999.
- LOVELY, D. R. Anaerobic benzene degradation. Biodegrad, v.11, pp. 107-116, 2000.
- LUCAS, A.; RODRIGUES, L.; VIELASÑOR J.; FERNÁNDEZ, F. J. Kinetics of stored wastewater substrates by a mixed microbial culture. Biochem. Engineer. Journ. v. 26. pp. 191-197, 2005.
- LUEDEKING, R. & PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation: batch process at controlled pH. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. v. 1, pp. 393-412, 1959.
- MacGILLIVRAY, A. R.; SHIARIS, M. P. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. Applied & Environ. Microb., v. 59, pp. 1613-1668, 1993.
- MANCINI, T. M. Métodos de caracterização de áreas potencialmente contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro-SP, 146 p. 2002.
- MARAYYAN, B.; BATTIKHI, M. N. Biodegradation of total organic carbons (TOC) in Jordain petroleum sludge. Journ. Of Hazard. Mat. B120. pp. 127-134, 2005.
- MARIANO, A. P. Avaliação do Potencial de Biorremediação de Solos e de Águas Subterrâneas Contaminados com Óleo Diesel. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, São Paulo, 2006.
- MARQUARDT, D. W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. J. Sot. Indust. Appl. v.11, pp. 431-441, 1963.
- MEHLMAN, M.A. Dangerous properties of petroleum - refining products. carcinogenicity of motor fuels (gasoline). Teratogemesis, carcinogenesis, mutagenesis, v. 15, pp. 399-408, 1990.
- MELLO, J. M. M. Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 2007.
- MESQUITA, A.C. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro- RJ, 2004.
- MOERI, E.; COELHO, R.; MARKEI, A. Remediação e Revitalização de Áreas Contaminadas. Aspectos Técnicos Legais e Financeiros. Editora Signus. 219p, 2004.

- MOHANTY, G.; MUKHERJI, S. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. Internat. Biodet. e Biodegrad. Article In Press, 2007.
- MONTGOMERY, D. C. Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons, New York, 4th ed, 704p, 1999.
- MORGAN, P.; WATKINSON, R.J. Assessment of the potencial for in situ Biotreatment of hydrocarbon- contaminated soils. Water Sci. And tech., v. 22, n. 6, pp. 63-68, 1990.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. Revista Química Nova, v.25, pp. 772-776, 2002.
- OKERENTUGBA, P.O.; EZERONYE, O.U. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria, Afr. Journ. Biotech. v. 2, pp. 288–292, 2003.
- OLIVEIRA, F.J.S. Biorremediação de Solo Arenoso Contaminado por Óleo Cru. Tese de Mestrado, Escola de Química - UFRJ, 110 p, 2001.
- LOUDOT, J.; FUSEY, P.; ABDELOUAHID, D. E.; HALOUI, S. ROQUEBERT, M. F. Capacités dégradatives des bactéries et de champignons isolés d'un sol contaminate par un fuel. Canad. Jour. of Microb., v. 33, p. 232-243, 1987.
- PARENTE, P. F.; NETO, F. F. L.; LANDAU, L. Análises físico-químicas da água de formação e a biodegradação do petróleo. 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. Salvador. pp. 1-6, 2004.
- PAUL, E. A.; CLARK, F. G. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. San Diego. p. 340, 1989.
- PELCZAR, M.J.; MILLS, G.L.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia conceitos e aplicações. 2ª edição, v. 1, Makron Books, 1996.
- PEREIRA, L. T. C.; LEMOS, J. L. S. Ampliação da biodegradação de petróleo por *Aspergillus Versicolor*. XII Jornada de Iniciação Científica, Rio de Janeiro-Rj. pp. 1-11, 2004.
- PIEDEDE DÍAZ, M.; GRIGSON, S. J.W.; PEPPIATT, C. J.; BURGESS, J. G. Isolation and Characterization of Novel Hydrocarbon-Degrading Euryhaline Consortia from Crude Oil and Mangrove Sediments. Mar. Biotechnol. v.2, pp. 522–532, 2000.
- PRINCE, M.; SAMBASIVAM, Y. Bioremediation of petroleum wastes from the refining of lubricant oils. Environ. Progress, v. 12, n. 1, pp. 5-11, 1993.
- PRINCE, R. C.; PARKERTON, T. F.; LEE, C. The Primary Aerobic Biodegradation of Gasoline Hydrocarbons. Environ. Sci. Technol., v.41, pp.3316-3321, 2007.

- PROVIDENT, M.A.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Select factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. Journ. of Indust. Microb. v. 12 pp. 379-395, 1993.
- PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains a cell surface hydrophobicity technique, Biotechn. Techn. v.11. pp. 671-674, 1997.
- RAMALHO, J. B. V. S. Ensaio para avaliação dos principais parâmetros necessários ao dimensionamento de separadores gravitacionais trifásicos. Bol. téc. PETROBRAS, Rio de Janeiro, v.43 (1), pp.28-33, 2000.
- REARDON, F. K.; MOSTELLER, D. C.; ROGERS, J. B.; DUTEAU, N. M.; KIM, K.H. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. Env. Heal. Perspec. v.110 pp. 1005-1011, 2002.
- REDDY, P.G., SINGH, H.D., ROY, P.K. AND BURUAH, J.N. Predominant role of hydrocarbon solubilization in the microbial uptake of hydrocarbons, Biotechnol. Bioeng. v. 24, pp. 1241-1269, 1982.
- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel, Intern. Biodet. Biodeg. v. 44, pp. 93-100, 1999.
- ROBINSON, K.G.; KIM, K.; FARMER, W.S.; NOVAK, J.T. Bioremediation Removes Gasoline Residues. Pollut. Engen. v. 22, n. 8, pp. 76-79, 1990.
- ROCHA, F.J.M.; SOTO, J.O.; HERNÁNDEZ, M.C.R.; GARCIA, M.M. Determination of the hydrocarbon-degrading metabolic capabilities of tropical bacterial isolates, Intern. Biodet. Biodeg. v. 55, pp. 17-23, 2005.
- RODRIGUES, A. M.; SALIBY, E. Revista Exame, Melhores e Maiores, 1996.
- ROMANTSCHUK, M.; SARAND, I.; PETANEN, T.; PELTOLA, R.; JONSSONVIHANNE, M.; KOIVULA, T.; YRJALA, K.; ÁTELA, K. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. Environ. Pollut., v. 107, pp. 179-185, 2002.
- SANTOS, A. S. P. Avaliação de desempenho de um filtro biológico percolador em diferentes meios suporte plásticos. Dissertação de Mestrado. COPPE/ UFRJ. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro- RJ. 2005.
- SCHIMITT, F. Tratamento Anaeróbio de Efluentes. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis - Rio Grande do Sul, 2006.
- SCHWARZENBACH, R.P.; GSCHWEND, P.M.; IMBODEN, D.M. Environmental Organic Chemistry. New York, John Wiley & Son, 1993.

- SOHRABI, M.; MOGHAREI, A. Some aspects of bioremediation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons. Afinidad LVI, 483, Sept-Oct, 1999.
- SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, R.; ROPARS, M.; LEBECURT, J. M.; VANDECOSTELLE, J.P. Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. Journ. Of Applied Microbiol. v. 86. pp. 1008-1016, 1999.
- SOUSA, M. F. V. Q.; VILLELA, A. L. S. ; MELO, E. J. V.; SOUZA, M. R.; MELO, B. J. M.; SILVA, P. A. Desenvolvimento de Bioprocesso de Degradação de Óleo Diesel. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos. SINAFERM, Curitiba. 2007.
- SPAIN, J. C. E VAN VELD, P. A. Adaptation of Natural Microbial Communities to Degradation of Xenobiotic Compounds: Effects of Concentration, Exposure Time, Inoculum, and Chemical Structure. Applied and Environ Microb, v. 45, pp. 428-435, 1983.
- SPORMANN, A. M., & WIDDEL, F. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. Biodegrad, v.11, pp. 85-105, 2000.
- STANDARD METHODS. For the Examination of water and wastewater. 20th Edition, 1998.
- SUTHERLAND, J. B. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. J. Ind. Microbiol. v. 9, pp. 53-62, 1992.
- THOMAS, J. M.; WARD, C. H. In situ bioremediation of organic contaminants in the subsurface. Environm.Sci. and Techn. v. 23 (7), pp. 760-766, 1989.
- TIBURTIUS, E.R.L.; ZAMORA, P.P.; LEAL, E.S. Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites, Quím. Nova. v.27. pp. 1-16, 2004.
- TOWNSEND, G.T.; PRINCE, R.C.; SUFLITA, J.M. Anaerobic biodegradation of alicyclic constituents of gasoline and natural gas condensate by bacteria from an anoxic aquifer, FEMS Microbiol. Ecol. v. 49, pp. 129-135, 2004.
- TRINDADE, P.V.O. Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação solo contaminado por hidrocarboneto de petróleo. Dissertação de mestrado, Escola de Química – UFRJ, Rio de Janeiro- RJ, 2002.
- URURAHY, A.F.P.; MARINS, M.D.M.; VITAL, R.; GABARDO J.T.; PEREIRA JR., W. Effect of aeration on biodegradation of petroleum Waste. Rev. de Microb., v. 29. n. 4, 1999.
- VAN HAMME, J. D.; SINGH A.; OWEN, P.W. Recent advances in petroleum microbiology. Microb. and Molec. Biol. Reviews. Dec. pp. 503-549, 2003.

- VASUDEVAM, N. e RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. Environ. Internat., v. 26, pp. 409-411, 2001.
- VENKATESWARAM, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. Can. J. Microbiol., v. 41, pp.767-775, 1995.
- VIEIRA, P. A. Avaliação da biodegradação de efluente contendo óleo diesel e gasolina empregando culturas mistas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2004.
- VIEIRA, P. A., VIEIRA, R. B., DE FRANÇA, F. P., CARDOSO, V. L. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. Journ. Hazard. Mat. v. 140, pp. 52-59, 2007.
- VILLELA, A. L. S. ; SOUSA, M. F. V. Q; MELO, E. J. V.; SOUZA, M. R.; MELO, B. J. M.; SILVA, P. A. Desenvolvimento de bioprocesso de degradação de óleo diesel. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos. SINAFERM, Curitiba, 2007.
- WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Environ. Biotechn., v.12, pp. 259-276, 2001.
- WILSON, V.L.; TATFORD, B.C.; YIN, X.Q.; RAJKI, S.C.; WALSH, M.M.; LAROCK, P. Species-specific detection of hydrocarbon-utilizing bacteria, Journ. Microbiol._Meth. v. 39, pp. 59–78, 1999.
- YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C; SGARBIERI, V. C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. Rev. de Nutrição. v.16, n.4, pp. 1-12, 2003.
- YERUSHALMI, L.; GUIOT, S. R. Kinetics of biodegradation of gasoline and its hydrocarbon constituents. Appl. Microb. Biotechn. v.49, 475-481, 1998.
- YUAN, S.Y.; WEI, S.H.; CHANG, B.V. Biodegradation of polycyclic aromatics hydrocarbons by a mixed culture. Chemosp., v. 41, pp. 1463-1468, 2000.

- www.anp.gov.br/doc/anuario2007/Secao2.pdf: acessado em novembro de 2007.
- www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2007/12/26/materia.2007-12-26.5628329788/view.
- www.ambientebrasil.com.br: acessado em julho de 2005.
- www.br.com.br/portalbr/calandra.nsf#http://www.br.com.br/portalbr: acessado em dezembro de 2005
- www.br.com.br/portalbr: acessado em outubro de 2005 e novembro de 2007.
- www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_07.pdf: acessado em outubro de 2007.
- www.cetesb.sp.gov.br/Solo/agua_sub/valores.asp, acessado em janeiro de 2007.
- www.ciencia.hsw.uol.com.br/refino-de-petroleo5.htm: acessado em novembro de 2007.
- www.comciencia.br/reportagens/petroleo/pet05.shtml: acessado em agosto de 2005.
- www.epa.gov/oust/pubs/fpr_c3.pdf : acessado em outubro de 2003.
- www.manguinhosdistribuidora.com.br/index.jsp?categoria=26&produto=40: acessado em dezembro de 2007).
- www2.petrobras.com.br/espacoconhecer/Produtos/diesel.asp: acessado em outubro de 2007.
- www2.petrobras.com.br/Petrobras/portugues/plataforma/pla_campos_petroleo.htm: acessado em novembro de 2007.
- www.pt.wikipedia.org/wiki/Petrobras: acessado em janeiro de 2008.
- www.refap.com.br/produtos_diesel.asp : acessado em abril de 2005.
- www.tecnohidro.com.br/tecnologia_02.htm: acessado em agosto de 2005.
- www.transpetro.com.br/portugues/empresa/dutosTerminais/dutosTerminais.shtml: acessado em novembro de 2007.
- www.pt.wikipedia.org/wiki/Petrobras: acessado em janeiro de 2008)