
ECOLOGIA

KAREN HOSOMI TERAMAE

**ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA UTILIZANDO COLUNAS
DE WINOGRADSKY CONTAMINADAS POR ÓLEO
LUBRIFICANTE USADO E BIODIESEL**

A large, abstract geometric pattern in shades of blue and white, resembling a stylized globe or a complex network of lines, occupies the lower half of the page.

Rio Claro
2011

KAREN HOSOMI TERAMAE

**ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA UTILIZANDO COLUNAS DE
WINOGRADSKY CONTAMINADAS POR ÓLEO
LUBRIFICANTE USADO E BIODIESEL**

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Ecóloga.

Rio Claro
2011

574.5263 Teramae, Karen Hosomi
T315a Análise ecotoxicológica utilizando colunas de
Winogradsky contaminadas por óleo lubrificante usado e
biodiesel / Karen Hosomi Teramae. - Rio Claro : [s.n.], 2011
92 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ecologia) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de
Rio Claro

Orientador: Ederio Dino Bidoia

1. Ecologia aquática. 2. Ecotoxicologia. 3. Bactéria
sulfato-redutora. 4. Toxicidade. 5. Algas. 6. Bioindicadores.
I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedicado aos terráqueos, sobretudo àqueles
que não se julgam superiores aos outros.
Ao meu grande avô **Silvério**,
que me ensinou a amar
a simplicidade.

Aprendemos a voar como pássaros e
a nadar como peixes, mas não
aprendemos a conviver
como irmãos.

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS:

Gostaria de realizar esses agradecimentos de modo não hierárquico, pois cada indivíduo tem papel e importância imensuráveis, dentro dessa esfera da vida. Agradeço à Deus pelos seres incríveis que pude conhecer e por me permitir estar aqui.

Ao professor **Ederio**, agradeço por ter me acolhido desde o início, sempre orientando com palavras de incentivo e tranquilidade. Obrigada por toda a atenção dada ao meu TCC, por mais compromissos que tivesse e por me incentivar a escrever um pouco a cada dia. Agradeço também pelas conversas sobre temas multivariados, que me fizeram enxergar os acontecimentos de maneira mais sistêmica e por jamais dizer que algo é impossível de ser feito. Não poderia ter encontrado orientador melhor!

Obrigada **Fátima**, **Betão** e **Ivo**, pela ajuda com a obtenção de material para os experimentos e por serem sempre tão gentis e atenciosos.

Aos professores **Antônio** e **Corso**, agradeço por aceitarem compor a banca de avaliação do meu trabalho e por serem excelentes profissionais.

Agradeço à minha mãe **Silvana** e ao meu pai **Marcelo**, pelo maior presente que poderia existir: o amor sincero, responsável pelas escolhas difíceis que tiveram de fazer. Abriam mão de muitos planos pessoais e sonhos para que eu pudesse me desenvolver da melhor forma e jamais desistiram de mim, por mais árduo que fosse o trabalho de ensinar, por maiores que fossem os meus erros. Mesmo longe, sempre sinto a força de vocês. Os admiro imensamente por trabalharem com perseverança para que a família funcione da melhor forma e por serem os melhores tetra pais que já conheci. Amo muito vocês.

À **Xuxu**, ao **Yu** e ao **Cogumelo Peludo**, gostaria de dizer que os três poderiam estar na página dos que atrapalharam meu TCC. Mas sinceramente, amo a alegria que vocês produzem em qualquer ocasião. São tão diferentes entre si e tão característicos, que parecem astros de cinema treinados para as melhores cenas de comédia, drama, musical e terror, principalmente. Xuxu, você sempre será uma vencedora na vida, não importa o que aconteça.

Ao odichan **Silvério**, dedico este trabalho por ser meu herói. Em uma vida curta, conseguiu me ensinar o que realmente importa: não se desesperar, ajudar a quem puder com o que tiver e com o que souber, alegrar-se por presenciar a migração das andorinhas, fazer o que gosta, ser humilde e sorrir muito. Ele, mais do que ninguém, soube viver o presente com simplicidade e muita alegria. À obachan **Iolanda**, agradeço por ser um exemplo de força e dedicação. Sempre põe ordem na casa e luta pelos direitos dos fracos e oprimidos, sem medo da reação dos autoritários. Bá, muito obrigada por ser minha segunda mãe, pelos bons conselhos e por amar as plantas.

Ao odichan **Tuguio**, muito obrigada por cuidar da nossa família, que sempre anda em bando. Obrigada por ser essa fonte de sabedoria e de conhecimento, que se comporta como a chama de uma vela, que acende outras velas e não se apaga, se propaga. Agradeço por mostrar a importância da gratidão e da força do pensamento. À obachan **Márcia**, muito obrigada por valorizar as qualidades das pessoas e por sempre conversar ao invés de brigar. Nunca me esqueço daquela vez que conseguiu incluir uma criança isolada em um grupo, quebrando a barreira de preconceito entre elas e melhorando a auto-estima de cada uma. Obrigada por mostrar que não se deve guardar mágoas das pessoas e por trazer tanta felicidade à todos.

À **Cacau**, muito obrigada por ser tão pacifista e por me ajudar a superar momentos difíceis. Ao **Caterpi**, agradeço por mostrar que é possível sofrer uma metamorfose no período de uma vida efêmera. Ao **Morceguinho**, obrigada por me ensinar a ser forte e a superar grandes quedas. Ao **sanhaço**, sou grata por mostrar a importância da liberdade e da independência, mesmo com a asa quebrada. **Kika**, você foi uma guerreira até o fim. E à **Tequila**, agradeço por ser tão companheira e louca.

Agradeço ao **Dênis**, por ser meu namorado, amante e amigo. Quando me ajudou a catar latinhas festa, não pensei que seria o início de uma história. Sou muito grata por me presentear com comidas, por surpreender a cada dia e por ser tão romântico. Você é o mamífero da minha vida e quero muito realizar nosso sonho de velejar para outras terras, despidos de preconceitos e munidos de sabedoria para que possamos trazer alguma contribuição positiva para outros seres.

À **Thaís**, com quem já estou comemorando bodas de estanho. Graças à você, hoje consigo conversar com as pessoas e falar em público sem gaguejar. Te agradeço por ser essa amiga única, verdadeira e cheia de personalidade própria. Posso ficar um ano longe, mas quando te encontrar sei que vai parecer que nos vimos ontem. Obrigada Thá, sem palavras pra descrever o quanto você é importante pra mim.

À **Cris**, agradeço por ser essa amiga divertida, que me acompanha nas comilanças, que compartilha filosofias, alegrias, crises e palhaçadas. Obrigada por me ajudar a ter fé e a enxergar o lado bom dos humanos, além de ser esse altruísmo em pessoa, que educa os futuros cidadãos, constrói casas e colabora pra um desenvolvimento na consciência da humanidade. Se no mundo existissem mais pessoas como você, ele seria muito melhor!

Agradeço ao **Shindi**, por ter sido o único da família a se importar realmente com a apresentação do meu trabalho. Sou muito grata por isso e por me escutar em um momento tão importante pra mim. Shindi, sou sua fã, não só porque você me deu a maior força, mas porque você tem uma mente brilhante e é simplesmente um gênio.

Aos meus primos **Daniel, Bia, Mari, Hugo, Gohan e Gregório** obrigada por serem meus companheiros de férias e por fazerem parte de tantos momentos mágicos! Sempre me divirto muito com vocês!

Alberto e Harumi obrigada pelos abraços mais sinceros do mundo e **Kaori**, obrigada por ter escolhido a nossa família para trazer toda a tranquilidade e magia em um sorriso lindo.

Às minhas primas **Vivs, Sté e Carol**, por compartilharem comigo idéias, histórias, segredos, epifanias, sonhos, debates e momentos inesquecíveis. São mais do que primas, são amigas que levarei comigo por toda a vida. Juntas, na alegria e na fôssã. Obrigada por tudo, primas!

Aos meus primos **Pé, Thi e Luck**, obrigada por serem tão bem humorados e por trazerem tanta alegria à família. Apesar de encontrá-los muito pouco, espero que cada um se sinta realizado e muito feliz, ao longo do caminho que escolher para trilhar. **Shay e Caio**, eu não poderia ter conhecido agregados melhores!

À **Mari**, agradeço por ter me ajudado demais com o TCC e por compartilhar de tanto conhecimento sobre diversos assuntos. Tenho grande admiração por você vivenciar seu discurso diariamente, por ser a formadora de idéias mais inteligente que conheço, pelo enorme respeito que você tem pela opinião alheia e por deter as forças do mal, como se tivesse saído do Mortal Kombat.

À **Matraca**, muitíssimo obrigada pela ajuda com o trabalho. Sem você, não sei o que eu faria. Digo isto também por conta das suas palavras de sabedoria, que me ajudam sempre. Você tem um universo inteiro dentro da mente com filosofias, teorias pouco convencionais, questionamentos, fatos, lembranças misteriosas, percepções... E tenho certeza, que se você não fosse tão pé no chão, já teria ficado louca. Quer dizer, isso você já é, mas engana super bem! Apesar de você só sentir saudade das árvores, eu sentirei saudades suas.

À **Lala**, agradeço por agüentar minha bagunça nesses dois anos de rep, por ser essa amiga tão provida de qualidades, que tem tudo pra ser metida, mas não é nem um pouco. Obrigada por ter toda a responsabilidade que me falta, pela companhia nas noites passadas em claro, por compartilhar

segredos, ouvir desabafos, dar ótimos conselhos e por ser essa criança caipira eterna, que contagia todo mundo.

À **Elaine**, muito obrigada por me alimentar, por ser essa amiga espartana, guerreira mesmo, que topa os roles mais vikings. Afinal, tudo é Kung Fu. Obrigada por estar presente, desde os momentos de gargalhadas até os de sangue espirrando e dor nos músculos recém descobertos. Sua força de vontade para superar desafios é tanta, que me lembra a Demi Moore naquele filme “Até o Limite da Honra”.

À **Naruda**, agradeço por ser companheiríssima de aventuras insanas, esquemas, festas, trabalho meta quinze, ou momentos “não importa o que aconteça, estou com você”. Apesar de você querer explodir a humanidade 6 vezes por semana, você me ensinou a ser mais sociável e me mostrou o real significado de amizade e de parceria. Adoro pagar mico com você, realizar missões impossíveis e rir de nós mesmas. Ainda vamos para a África juntas...

Lígia, obrigada por me salvar várias vezes nesses 4 anos. Você é um exemplo de super mulher, que consegue manter a casa, sustentar a família, fazer projetos, pesquisas, ser noiva, dar atenção para os amigos, trabalhar pela comunidade, resolver os problemas de todo mundo, ser linda e ainda tirar boas notas. Sou sua fã de primeira fila, porque você é simplesmente incrível, batalhadora e quando pensam que acabou, tira forças de não sei onde. O mais legal é que você não é metida, apesar de ser tudo isso!

Ao **Diego**, agradeço por compartilhar segredos, por ser esse poço de sinceridade e por utilizar seus poderes sobrenaturais sem fins lucrativos. Obrigada também por romper convenções sexistas, por pensar com o próprio cérebro e não ser um mero propagador de idéias. Você me ensinou a enxergar muito além das aparências.

À **32ª turma de Ecologia**, agradeço por ter sido uma sala muito unida, com pessoas tão proativas e democráticas, em geral. Sentirei muita saudade dessa sinergia em trabalhos, festas, eventos, vaquinhas, viagens, provas, protestos, discussões, campos e simplesmente tudo. Muito sucesso na vida da galera!

À família de Santa Bárbara D'Oeste, especialmente à **Dê**, à **Duque**, à **Josi** e ao **Adilson**, agradeço por serem tão gentis, hospitaleiros e por me aceitarem do jeito que eu sou. Obrigada por todo o apoio, não só na época do TCC, mas em todos os momentos que precisei! Vocês são uma família incrível, unida e solidária. Aprendi muito com vocês, tanto por conversas, quando pelas ações. Amo vocês!

Aos professores **Miltinho**, **Goiten**, **Carlos** e tio **Massa**, obrigada por serem excelentes mestres e pessoas, por serem todos tão bem humorados e humildes. Foram os melhores professores que tive nesses anos de graduação, não só por causa da didática, mas pelas lições de vida dadas também fora da sala de aula. Tratam a todos com igualdade, respeito e sempre fornecem ajuda a quem necessita. Obrigada por contribuírem para a formação de caráter dos seus alunos.

Helene, **Marinete** e **Mariana**, obrigada por compartilharem o espaço, as fofocas, tensões, festas, baralho, tarefas, risadas e filosofias... Mesmo cada uma indo para um lado, espero reencontrá-las em breve! Saudades de vocês!

Dona Nilza, **Ju**, **Jé**, **Vó** e **Morceguda**, nunca vou esquecer das gargalhadas, trapalhadas, confusões e micos com vocês! Dona Nilza, você foi uma mãe louca pra mim e ao mesmo tempo uma guerreira que salva o mundo inteiro, todos os dias... Apesar de você ser essa maluca que cola o dente com Super Bonder, joga água nas vizinhas, bate a Derci Gonçalves no xingo, toma chá alucinógeno, xaveca os caras na rua, anda com revólver de plástico e compra cigarros explosivos, eu sou sua fã!

Galera do Kung Fu, valeu pelos momentos sangue nos olhos, pelas joelhadas e cotoveladas, pelas amizades que vou levar pro resto da vida!

Índio, Camarão, Rude, Lacreia, Heltinho, B-boys e B-girls, obrigada por me mostrarem o poder que o Break e o Hip Hop têm de transformar a vida das pessoas! Valeu por se preocuparem com melhorias pra comunidade e por compartilhar todo esse conhecimento, experiência, arte e cultura com todo mundo! Vocês têm essa energia incrível de superação e determinação, que os torna cada vez mais fortes pra realizar tudo aquilo que sonham. Sempre levarei o carinho de vocês aqui comigo, manos!

Ao pessoal do **Grupo de Apoio e Defesa dos Animais**, agradeço por me inserirem nesse universo da Veterinária e por lutarem até o fim pela vida de cada animal. Admiro imensamente o trabalho de vocês, porque não é fácil ver o sofrimento de um animal por culpa de pessoas ignorantes. Espero que esse trabalho continue por muito tempo e que possam melhorar e salvar a vida de muitos cães e gatos!

Meire, Serginho da portaria e outros porteiros, obrigada pelo “Bom dia” de cada dia, pelo bom humor mesmo em dias tumultuados, pelo sorriso gratuito, que irradia energias positivas pra quem passa por vocês. Obrigada pela segurança, pelas informações, conversas e pela amizade!

Dona **Áurea**, obrigada por me ensinar a dar os primeiros passos com o piano, que tanto sonhei tocar a vida inteira! Nunca tive uma professora com tanta paciência e paixão pela música, como a senhora. Agradeço pela compreensão nessa fase corrida e pela preocupação com o aprendizado e bem estar dos seus alunos. Espero encontrar alguém tão bom quanto a senhora pra continuar tocando!

Madrinhas **Rose e Akemi** e padrinhos **Carlos e Adilson**, obrigada por estarem sempre presentes, desde quando me conheço por gente. Valeu por todo o apoio em vários momentos da vida, por cuidarem de mim como filha e por terem a preocupação de pais, com a vantagem de que vocês podem estragar os afilhados e isso é muito bom! Amo vocês.

Tio **Takeshi**, tia **Sônia**, tio **Rubens** e tia **Helô**, obrigada pelos conselhos, pelas viagens, por todo o carinho, alegria, amor e por serem os tios que caíram do céu! Um agradecimento especial pra tia **Glenda** e pro tio **Sil**, que me inspiraram a escolher o curso de Ecologia, por serem biólogos exemplares, daqueles que levam os alunos pro brejo, pegam o barco e vão limpar a represa, montam uma casa ecológica e ensinam biologia pra galera até com fantasia de Meninas Super Poderosas...

À **Comunidade hippie**, sobretudo ao **Daniel** e ao **Carlos**, agradeço pelos ensinamentos e lições de desapego e de uma vida simples, que carrega só o que necessitamos pra viver. Obrigada pela amizade, um dos melhores presentes que alguém pode conquistar e por compartilharem tudo, inclusive a sabedoria de vocês. Vocês são capitães de suas vidas e autores de suas histórias...

Francis, você é o maior exemplo de força e superação que eu conheço. Só tenho a te agradecer, por me mostrar que sempre há esperança e que o caminho pode parecer tortuoso, mas com paciência realizamos nossos sonhos. Agradeço por você ser esse lutador justo e corajoso, que sobre uma cadeira de rodas pode chegar à lua, com toda essa determinação. Obrigada por mostrar o seu sorriso em tempos difíceis e por me ensinar tanta coisa, mesmo sem poder falar. Com seu jeito você conquista muitos amigos e mostra o quanto você é incrível e surpreendente...

Ifeany, Aisha, Funsho, Samuel, Bernard, Charles, Onyedikachi and Ugochukwu, thanks for show me a part of Nigerian culture. Thank you for being so animated and have so much patience with my English... I really want to visit them as soon as possible, but in your country! Miss you all!

São agradecimentos muito simplistas diante de tudo o que essas pessoas são, de tudo o que fazem e da contribuição que trouxeram não somente para a minha vida quanto para o desenvolvimento de muitos outros seres. Peço desculpas se não inclui muitos nomes, igualmente importantes. Gostaria de dizer muito obrigada à todos, por me ensinarem a viver e por existirem.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVO.....	11
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.2. Objetivos Específicos.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1. Ecotoxicologia.....	12
3.2. Biodegradação e Biorremediação.....	13
3.3. Óleo Lubrificante Usado.....	16
3.4. Biodiesel.....	18
3.5. Legislação.....	20
3.5.1. Óleo Lubrificante Usado.....	20
3.5.2. Biodiesel.....	21
3.6. Coluna de Winogradsky.....	22
3.7. <i>Bacillus subtilis</i>	25
3.8. Algas.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Coluna de Winogradsky.....	29
4.1.1. Coleta da amostra.....	29
4.1.2. Coleta dos poluentes.....	30
4.1.3. Preparação do inóculo.....	30
4.1.4. Montagem das colunas de Winogradsky.....	31
4.1.5. Réplicas das colunas II e IV.....	32
4.2. Experimento 1: Teste de toxicidade aguda, utilizando sementes de <i>Lactuca sativa</i> (alface).....	33
4.3. Experimento 2: Teste de toxicidade aguda, utilizando sementes de <i>Lactuca sativa</i> (alface) e de <i>Cucumis sativus</i> (pepino).....	35
4.4.1. Preparação das concentrações salinas.....	35
4.4.2. Montagem das placas de petri.....	36
4.4.3. Utilização das soluções salinas no tratamento de sementes.....	36
4.5. Análise do pH das colunas de Winogradsky.....	38
4.6. Identificação de algas.....	38
4.6.1. Utilização de algas como bioindicadores	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
5.1. Desenvolvimento de algas e de BRS nas colunas de Winogradsky 5.1.1. Réplicas das colunas II e IV.....	43
5.2. Resultados das análises de pH.....	44
5.3. Experimento 1.....	47
5.4. Experimento 2.....	48
5.5. Gêneros de algas.....	51
6. CONCLUSÕES.....	55
7. Referências Bibliográficas.....	57
8. ANEXOS.....	66
8.1. Anexo A- Resolução CONAMA nº 362/2005.....	66
8.2. Anexo B- Resolução nº 7- Agência Nacional do Petróleo (ANP).....	81

1. INTRODUÇÃO

O óleo lubrificante mineral é constituído basicamente por parafinas, naftênicos (ciclo parafinas) e hidrocarbonetos aromáticos e pode ser obtido por meio de processos de refinação do petróleo cru (HAUS *et al.*, 2004). O óleo lubrificante tem como principal função a redução de atrito e de desgaste entre as partes móveis de um objeto (SOHN, 2009).

Apenas 1 litro de óleo lubrificante é suficiente para contaminar 1 milhão de litros de água (ATLAS *et al.*, 1991). A contaminação de ecossistemas terrestres e aquáticos por esta substância é proveniente de diversas fontes, como: descarte inadequado de óleo usado, lavagem automotiva e derrames acidentais, tanto na fabricação e transporte como no armazenamento (SALMINEN *et al.*, 2004, PRPICH & DAUGULIS, 2005 e GÜLENSOY & ALVAREZ, 1999). Apenas 36% do óleo lubrificante usado no Brasil é reciclado (BRASIL, 2001).

Fabricantes de aditivos e formuladores de óleos lubrificantes vêm desenvolvendo produtos com maior vida útil, com o propósito de reduzir a geração de óleos usados. Por outro lado, cresce a dificuldade de regeneração após o uso (LIMA, 2004). O óleo lubrificante usado apresenta boa degradabilidade devido à ação de compressão e calor dentro dos motores de automóveis, levando à quebra de cadeias carbônicas grandes, o que o torna menos apolar que o óleo lubrificante não usado. Isto leva a dizer que o óleo lubrificante usado é bem biodegradável, mas em termos de toxicidade, este apresenta metais pesados e formação de cor escura na água devido a resíduos carbonizados do óleo (MONTAGNOLLI *et al.*, 2009).

O biodiesel é derivado de biomassa renovável e gera menos poluição ambiental do que os combustíveis fósseis, contribuindo menos para o aquecimento global (GERPEN, 2005).

Segundo Gomes (2008), ainda não se sabe quais são os reais efeitos em caso de vazamentos ou derramamentos de biodiesel sobre a qualidade das águas subterrâneas e se o risco à saúde humana e ao meio ambiente é tolerável.

Por conseguinte, baseado na promessa de que o biodiesel seja um substituinte do diesel de petróleo, estudos de biodegradabilidade em ecossistemas aquáticos são essenciais e tem o propósito de avaliar seu tempo de degradação, seu grau de toxicidade para a biota e os aspectos físico-químicos de sua degradação em caso de acidentes.

Diversos estudos propõem a biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos pela inoculação de microrganismos com potencial biodegradador (ATLAS E BARTHA, 1992). Técnicas de biorremediação em áreas contaminadas trazem vantagens como: custo mais baixo, não interferência nas operações já realizadas no local e execução em lugares de difícil acesso. Porém, como limitações, não é uma solução imediata e há necessidade de uma prévia preparação do local para que suporte a ação dos microrganismos (CHAMUSCA *et al.*, 2011).

De acordo com Gamazo *et al.*, 2005, a coluna de Winogradsky simula um ecossistema aquático. A coluna permite estudar os microrganismos que ocupam zonas altamente específicas de acordo com a sua tolerância ao microambiente e às fontes de energia e carbono disponíveis. Se a coluna for colocada num local onde receba luz solar ou luz artificial, ao fim de algumas semanas desenvolver-se-á ao longo da coluna, de uma forma estratificada, uma comunidade de microrganismos de acordo com as condições ambientais que naquela se estabeleceram.

Cada zona da coluna é preferencial para cada organismo. Compreendendo a função de cada um deles na biota, pode-se determinar os efeitos que um derrame de óleo lubrificante ou de biodiesel causaria no ecossistema aquático. Segundo Perez (2008), a diferença de cores no interior da coluna é resultado do zoneamento principal de três camadas baseadas na concentração de oxigênio. A área próxima à superfície é a zona aeróbia, com elevada concentração de oxigênio. Logo abaixo, está localizada a zona microaerofílica, com concentração parcial de O₂. Finalmente, a zona anóxica é o leito do lodo (no fundo da coluna).

Uma forma eficaz de simular um ecossistema aquático e verificar as mudanças que ocorrem em sua biota frente à contaminação causada por óleo lubrificante usado ou biodiesel é a coluna de Winogradsky. Ela consiste num recipiente de vidro contendo amostras de solo, água e nutrientes provenientes do ambiente, o qual se pretende reproduzir. Dentro da coluna é possível acompanhar o aparecimento e a distribuição dos microrganismos e a partir daí inferir o papel de cada um deles na microbiota do corpo d'água (NASA, 2001).

2. OBJETIVO

2.1. *Objetivo geral*

Utilizar a coluna de Winogradsky na análise da biota proveniente de um ecossistema aquático contaminado com óleo lubrificante mineral usado ou biodiesel.

2.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar as alterações na biota das colunas de Winogradsky;
- Comparar a biota de um mesmo ambiente de água salobra entre 6 condições distintas;
- Analisar o efeito do *Bacillus subtilis* no processo de biorremediação em ecossistemas aquáticos contaminados com óleo lubrificante mineral usado e biodiesel;
- Utilizar algas como organismos bioindicadores de qualidade da água;
- Verificar se há toxicidade para sementes de *Lactuca sativa* e *Cucumis sativus* quando é utilizada a água proveniente de ecossistema aquático contaminado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Ecotoxicologia

A preocupação em monitorar a ação antrópica sobre o meio ambiente levou à criação da Ecotoxicologia (SOARES 1990), uma ferramenta de monitoramento ambiental, baseada principalmente na resposta de indivíduos a estressores químicos (RAMADE, 1977).

O termo ecotoxicologia foi citado pela primeira vez, no decorrer de uma reunião do Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista Rene Truhaut (TRUHAUT, 1977), em junho de 1969. Segundo Truhaut, a Ecotoxicologia caracteriza-se pela ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades naturais (CHAPMAN, 2006), que compõem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem, num contexto integrado (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

A ecotoxicologia pressupõe o uso de testes de toxicidade com organismos, também chamados bioensaios. Estes testes servem para determinar o grau de toxicidade ou o efeito biológico de uma substância. Os resultados são analisados por meio de comparação experimental entre os efeitos da substância testada e os efeitos de uma substância conhecida, em uma cultura de células vivas ou em um organismo-teste (USEPA, 1988).

Os bioensaios buscam avaliar a contaminação ambiental por diversas fontes poluidoras, tais como: efluentes agrícolas, industriais e domésticos, sedimentos, medicamentos e produtos químicos em geral (LOMBARDI, 2004; MARSCHNER, 1999) e detectam a capacidade de um agente tóxico em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos, permitindo saber em que medida as substâncias são nocivas, como e onde se manifestam os efeitos (MAGALHÃES e FILHO, 2008). Também disponibilizam informações sobre o perigo potencial de uma substância tóxica aos organismos aquáticos tais como, letalidade, carcinogênese, mutagênese, teratogênese, desordens comportamentais, efeitos fisiológicos cumulativos, antagonismos e sinérgicos (BAUDO, 1987).

Os testes toxicológicos são realizados com organismos indicadores, que devido às suas características de pequeno limite de tolerância ecológica, a determinadas substâncias químicas, apresentam alguma alteração, seja ela

fisiológica, morfológica ou comportamental, quando expostos a determinados poluentes. As exposições são feitas em diferentes concentrações de substâncias e compostos químicos, amostras de efluentes ou água bruta, por um determinado período (SCHVARTSMAN, 1991).

Os testes de toxicidade aguda objetivam medir os efeitos gerados nos organismos a um curto período de exposição e têm o propósito de determinar a concentração de uma substância teste, a qual produz efeitos deletérios em um grupo de organismos sob condições controladas. O evento observado é a letalidade, a partir da qual se determina a concentração do agente tóxico que causa 50% de mortalidade (CL50) à espécie teste (RAND e PETROCELLI, 1985). Existem ainda os testes de toxicidade crônica, cujos organismos são expostos continuamente a produtos tóxicos por um período significativo de seu ciclo de vida (RAND e PETROCELLI, 1985). Na toxicidade crônica são avaliados efeitos subletais em organismos, tais como alterações no crescimento e na reprodução, mudanças no comportamento, na fisiologia, bioquímica e alterações teciduais (LAWS, 2000; ADAMS, 1995). Os testes de toxicidade crônica são diretamente dependentes dos resultados dos testes de toxicidade aguda, visto que as concentrações subletais são calculadas a partir da CL50.

Em ambientes aquáticos, a toxicidade crônica é a mais freqüente por conta de diversos fatores, dentre eles: a diluição dos poluentes, as relações antagonistas entre as substâncias, a rápida associação que ocorre entre a maioria das partículas e o húmus e a sedimentação de sólidos em suspensão. Desta maneira, os organismos são submetidos a baixas concentrações de determinados poluentes durante longos períodos de tempo (STEPHAN e MOUNT, 1973), ocasionando efeitos crônicos a níveis subletais e, até mesmo letais ao longo do tempo.

Estudos ecotoxicológicos permitem realizar avaliações de risco, com a identificação de efeitos adversos resultantes da exposição do ecossistema a um ou mais fatores de estresse ambiental, prevenindo a sua degradação (MARRAFA *et al.*, 2005).

3.2. Biodegradação e Biorremediação

Os microrganismos desempenham importante função na ciclagem de nutrientes. A mineralização de compostos orgânicos é essencial para a manutenção

da vida na Terra, pois permite a liberação do carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e outros elementos no estado inorgânico no meio (HIGGINS e BURNS, 1975).

A biodegradação ocorre por meio da ação enzimática de microrganismos presentes no ambiente (ATLAS, 1981; ALEXANDER, 1981; CRAPEZ, 1982; SLIVINS & TREMIER, 1985), os quais transformam compostos químicos orgânicos, alterando suas estruturas moleculares. O processo pode ser limitado por diversos fatores como: presença de nutrientes, composição da biota, salinidade, concentração de oxigênio dissolvido na água, temperatura e natureza do poluente.

Bactérias, fungos e leveduras são os principais agentes biotransformadores devido à habilidade em degradar uma ampla variedade de substâncias xenobióticas (URURAHY et al., 1998).

A biodegradação ambiental em seu sentido amplo mostra-se como alternativa viável na aplicabilidade de técnicas de remediação e abrange aspectos socioeconômicos relevantes, que vão desde a aceitabilidade de produtos pelo mercado consumidor até a interferência direta ou indireta na melhoria da qualidade de vida (MELO, 2001).

A biorremediação, por sua vez, refere-se à aceleração da biodegradação, por meio de duas técnicas que catalisam a reação no meio ambiente contaminado (RYTKONEN et al., 1997): uma delas é a bioaumentação, que consiste na adição de microrganismos da espécie de interesse, adaptados em laboratório às condições ambientais, em ecossistemas impactados. A bioaumentação tem por finalidade aumentar a população microbiana responsável pela degradação do óleo (HOFF, 1993). A outra técnica, denominada bioestimulação, consiste na adição de oxigênio, água e nutrientes ao meio contaminado, com o propósito de acelerar a reprodução microbiana, bem como suas atividades metabólicas (HOFF, 1993; MERLIN et al., 1994; SANTAS et al., 1999).

A descoberta da biorremediação iniciou-se a partir de pesquisas que identificaram alguns microrganismos capazes de usar hidrocarbonetos de derivados do petróleo como fonte de carbono e energia (ATLAS, 1981). Posteriormente, os parâmetros bióticos e abióticos foram inseridos no processo e partindo dos resultados positivos, a técnica passou a ser utilizada na limpeza de ambientes contaminados por óleo (KING et al., 1997; BRAGG et al., 1993; LINDSTROM et al., 1991).

A biorremediação pode ser feita por processo *in situ* ou *ex situ*. No primeiro a remediação biológica é aplicada diretamente no local poluído, ao contrário dos

processos *ex situ*, em que o meio impactado é removido e destinado a um local de tratamento (MARGENSIN et al., 2000). Os produtos finais de uma biorremediação efetiva são água e gás carbônico, que não apresentam toxicidade e podem ser incorporados ao ambiente sem prejuízo aos organismos vivos (MARIANO, 2006).

Uma das primeiras aplicações *in situ* da técnica de bioestimulação ocorreu após o derrame de óleo pelo navio-tanque Exxon Valdez, em 1989 conforme a Figura 1 (FOBES, 1990). As aplicações de nutrientes ao longo da linha costeira do Alasca resultaram na aceleração da biodegradação do óleo na região contaminada (WOLFE et al.1994).



Figura 1: Derrame de óleo pelo navio Exxon Valdez.

A utilização da técnica de biorremediação apresenta vantagens e desvantagens, quando comparada a outras técnicas de limpeza (Tabela 1). O método deve ser criteriosamente estudado, antes de ser aplicado num determinado ambiente (COOKSON, 1995).

Tabela 1 - Vantagens e Desvantagens no Uso da Técnica de Biorremediação *in situ*

Vantagens	Desvantagens
Feita no próprio local contaminado	Alguns contaminantes não degradam
Trata-se de uma técnica barata	Necessidade de monitoramento intensivo
Redução permanente dos contaminantes	Requer um local específico
Aceitação pública positiva	Toxicidade dos poluentes
Recuperação de área contaminada	Intensa pesquisa de biorremediação
Eliminação de custo com transporte	Pode gerar produtos pouco conhecidos
Pode ser usada junto à outra técnica	Técnica pode não ser apropriada

Fonte: Cookson (1995).

A eficiência da biorremediação está associada a uma população microbiana adaptada ao consumo dos contaminantes e como esta pode ser enriquecida e mantida no ambiente (KATAOKA, 2001; MULLIGAN et al., 2001; BENTO et al., 2003; RAHMAN et al., 2003).

Se ocorre a presença de compostos não biodegradáveis e/ou se seus produtos metabólicos intermediários são mais tóxicos que os compostos originais, o uso da biodegradação pode ser mais prejudicial do que a própria contaminação. Portanto, a aplicação da técnica não é aconselhável nesses casos (CRAWFORD & CRAWFORD, 1996).

Deve-se verificar as propriedades físicas, químicas e biológicas envolvidas diretamente com a atuação do processo de biorremediação, fatores ecológicos, danos à saúde e tempo de exposição da contaminação (COOKSON, 1995) no processo de tomada de decisão referente aos planos de mitigação de impactos ambientais.

3.3. Óleo Lubrificante Usado

Os óleos lubrificantes são derivados do petróleo usados para reduzir ao máximo o atrito entre superfícies metálicas que mantêm contato nos sistemas mecânicos (SOUZA, 2003). São também funções do lubrificante, dependendo da sua aplicação, a refrigeração e a limpeza das partes móveis, a transmissão de força mecânica, vedação, isolamento e proteção de componentes específicos, além da

transferência de determinadas características físico-químicas a outros produtos (APROMAC, 2007).

Os óleos usados são formados por moléculas inalteradas do óleo básico, produtos de degradação do óleo básico; contaminantes inorgânicos; água proveniente da câmara de combustão, ou de contaminação accidental; hidrocarbonetos leves (combustível não queimado); partículas de carbono formadas devido ao craqueamento dos combustíveis e do próprio lubrificante e ainda outros contaminantes diversos (BRASIL, 2001).

Quando lançados no solo, os óleos usados se infiltram conjuntamente com a água da chuva contaminando lençóis freáticos e poluindo também as águas de aquíferos, rios, lagos e mares (SILVEIRA, 2006), afetando de maneira drástica a microbiota essencial ao desenvolvimento natural do ecossistema (BRASIL, 2001). Além disso, inutiliza o solo atingido, tanto para a agricultura quanto para a edificação, causando a morte da vegetação e dos microrganismos, destruindo o húmus e acarretando a infertilidade da área, que por sua vez pode se tornar uma fonte de vapores de hidrocarbonetos (APROMAC, 2007).

Ao entrar em contato com redes de drenagem, o óleo lubrificante usado polui os meios receptores hídricos e provoca danos às estações de tratamento de águas residuais (SILVEIRA, 2006). Ao ser lançado no esgoto, compromete o funcionamento das estações de tratamento, chegando a obstruir dutos (SOHN, 2009).

Os componentes degradados do óleo lubrificante usado geram compostos tóxicos para a saúde humana e para o ambiente, tais como dioxinas, ácidos orgânicos, cetonas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. O óleo lubrificante usado também contém diversos elementos tóxicos (cromo, cádmio, chumbo e arsênio), oriundos da fórmula original e/ou absorvidos do próprio motor ou equipamento. Esses componentes metálicos são bioacumulativos (perduram no interior dos tecidos de animais e vegetais, afetando toda a cadeia alimentar) e causam diversos problemas de saúde à população (SOHN, 2009).

A destinação legal do óleo lubrificante usado é proveniente de um demorado processo de conscientização e constatação técnico-científica, a partir da qual se concluiu que muitos usos populares podem ser perigosos e inadequados.

A Tabela 2 apresenta exemplos do emprego incorreto do óleo usado e as conseqüências de cada uso ilegal da substância (APROMAC, 2007).

Tabela 2: Usos ilegais do óleo lubrificante usado e suas consequências

Uso ilegal	Consequência danosa
Queima como combustível	Poluição atmosférica, emissão de compostos nocivos e particulados, gerando prejuízos para a saúde pública e para o meio ambiente.
Adulteração de óleo lubrificante usado	Traz danos para os equipamentos, podendo causar acidentes.
Uso como óleo desmoldante	Expõe os trabalhadores a risco de intoxicação e doenças ocasionadas pelos contaminantes presentes no óleo lubrificante usado.
Formulação de graxas	Expõe os trabalhadores a risco de intoxicação e doenças ocasionadas pelos contaminantes presentes no óleo lubrificante usado.
Lubrificação de corrente de motosserra	Causa intoxicação aos trabalhadores, danos ao equipamento e poluição ambiental, pois o óleo lubrificante usado não se adere à corrente da motosserra.
Impermeabilização de cercas, telhados, pisos e similares	Risco de intoxicação para os seres vivos, podendo também contaminar o solo, o lençol freático e corpos d'água.

Fonte: Adaptada de Apromac (2007).

3.4. Biodiesel

O biodiesel consiste em um mono-alquil éster de ácidos graxos derivado de fontes renováveis (MONYEM & VAN GERPEN, 2001), obtido por meio de diferentes processos, tais como o craqueamento (Figura 2), a esterificação (Figura 3) e a transesterificação, na qual ocorre a transformação de triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos (SUAREZ & MENEGETTI, 2007).

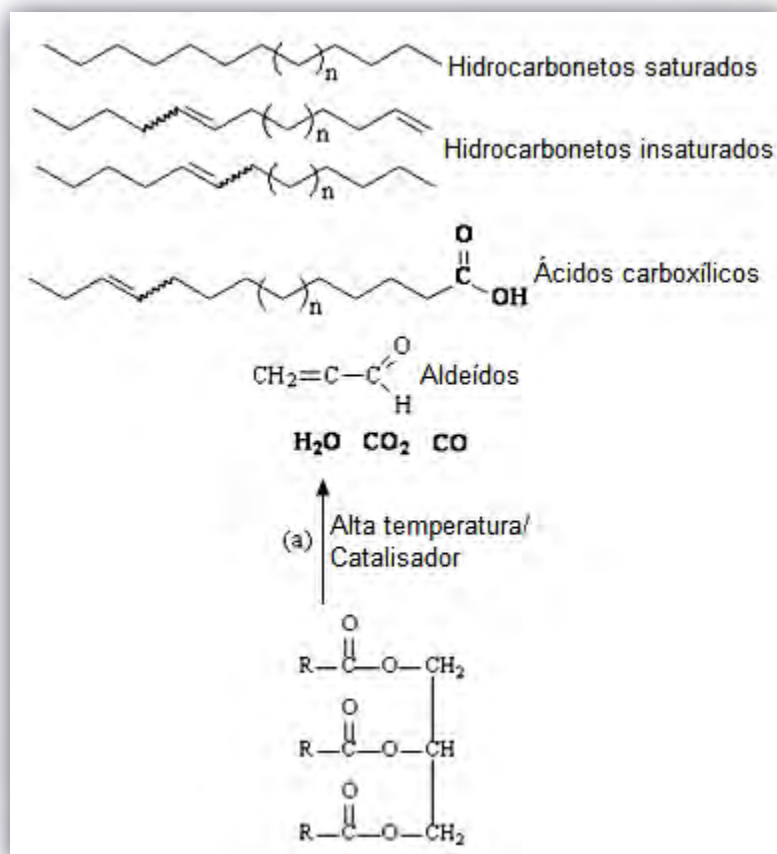


Figura 2: Reação de craqueamento (SUAREZ E MENEGHETTI, 2007). Esta reação consiste no fornecimento de energia, com a utilização opcional de um catalisador, para a quebra das moléculas constituintes dos óleos e gorduras, originando moléculas de hidrocarbonetos, de diferentes tamanhos, além de gás carbônico e água.

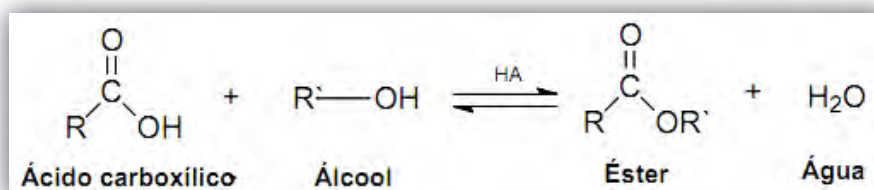


Figura 3: Reação de esterificação. Nessa reação os ácidos carboxílicos reagem com um monoálcool produzindo um éster, mais água (FABIANO, 2007).

A transesterificação (Figura 4) é o processo mais utilizado atualmente para a produção de biodiesel. Consiste numa reação química dos óleos vegetais ou gorduras animais com etanol ou metanol, estimulada por um catalisador, da qual também se extrai a glicerina, produto com aplicações diversas na indústria química (FABIANO, 2007).

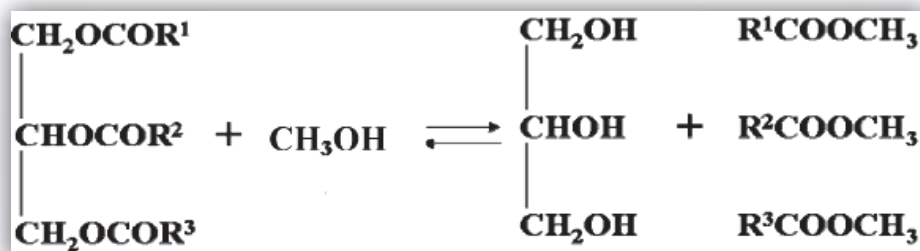


Figura 4: Reação de transesterificação típica para a produção de biodiesel (SOUZA, 2006).

As matérias primas para a produção de biodiesel são: óleos de espécies vegetais, como soja, dendê (palma), girassol, babaçu, amendoim, mamona e pinhão manso (espécies mais utilizadas no Brasil). Quase 90% da produção de óleo no Brasil provêm da soja (MASJUK & SAPUAN, 1995).

Gordura de origem animal, óleos e gorduras residuais, resultantes de processamento doméstico, comercial e industrial também servem como matérias primas para a obtenção do biodiesel. Um levantamento primário da oferta de óleos residuais de frituras, suscetíveis de serem coletados, revela um potencial de oferta no país superior a 30 mil toneladas por ano (GAZZONI, 2011).

A utilização de biodiesel para fins automotivos vem apresentando um potencial promissor no mundo inteiro, devido, em primeiro lugar, a sua contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, principalmente nos grandes centros urbanos (MASJUK, 1995). Em segundo lugar, como fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados do Petróleo.

3.5. Legislação

3.5.1. Óleo Lubrificante Usado

O rerrefino foi escolhido pelo CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, através da Resolução nº 362/2005 (ANEXO A), como instrumento prioritário para a gestão ambiental, com o objetivo de recuperar o óleo básico (material que origina novos óleos lubrificantes) e de minimizar a geração de resíduos no ambiente (APROMAC, 2007). Por conseguinte, todo o óleo lubrificante usado deve ter destinação adequada, sendo proibidos descartes em solos, águas superficiais, sistemas de esgoto ou lançamento em águas residuais.

O processo de rerrefino é capaz de extrair cerca de 80% a 85% do óleo lubrificante básico, atendendo às especificações técnicas estabelecidas pela ANP-Agência Nacional do Petróleo (SOHN, 2009), cujas portarias ditam normas para o gerenciamento dos óleos lubrificantes usados.

A Resolução da ANP nº 19, de 18 de junho de 2009 considera que o aproveitamento de óleo lubrificante usado contribui para a proteção do meio ambiente e para a maximização dos recursos naturais e estabelece os requisitos necessários à regulação da atividade de rerrefino (ANP, 2009). Enquanto a Resolução da ANP nº 20/2009 dispõe dos requisitos à autorização de coleta de óleo lubrificante usado ou contaminado.

A Lei nº 14186, de 15 de julho de 2010 do Estado de São Paulo dispõe sobre a coleta, o recolhimento e o destino final das embalagens de óleos lubrificantes usados e fornece outras providências correlatas (APROMAC, 2007).

Apesar da existência de normas claras na legislação defendendo a destinação correta do óleo lubrificante usado, ainda há uma grande quantidade de óleo lançada diretamente no ambiente (SOHN, 2009).

3.5.2. Biodiesel

O biodiesel comercial utilizado em todo o Brasil é uma mistura de diesel e biodiesel (B100). O biodiesel puro é formado a partir de óleos vegetais ou de gordura animal e deve atender às especificações estabelecidas pela Resolução ANP nº 07/2008 (FERRARI, 2004), que consta no ANEXO B (ANP, 2011). A Resolução ANP nº 41 de 24 de novembro de 2004 regulamentou que para funcionar em nível comercial, as indústrias de biodiesel devem receber autorização da Agência Nacional de Petróleo.

O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) foi criado pela lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005, com o objetivo de introduzir o uso do biodiesel. Este programa foi o responsável pela organização da cadeia produtiva, pela definição das linhas de financiamento e estruturação da base tecnológica.

A área plantada necessária para atender ao percentual de mistura de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo é estimada em 1,5 milhão de hectares, o que equivale a 1% dos 150 milhões de hectares plantados e disponíveis para agricultura no Brasil.

Atualmente há cerca de 16 empresas autorizadas pela ANP para produzir biodiesel, com capacidade de 2,13 milhões de litros/dia, totalizando 639 milhões de litros por ano (SILVA e SAKATSUME, 2001).

3.6. Coluna de Winogradsky

Criada em 1880 por Sergei Nikolaievich Winogradsky, a coluna de Winogradsky (Figura 5) consiste em um microecossistema fechado no interior de um recipiente de vidro, composto por solo, água e nutrientes, dentro do qual é possível acompanhar o desenvolvimento de microrganismos, sua distribuição e o papel de cada um deles no sistema do corpo d'água, bem como as consequências de uma contaminação na microbiota (NASA, 2001).

Cada zona da coluna é preferencial para cada microrganismo, de acordo com a disponibilidade de nutrientes, carbono e da tolerância às condições do meio.

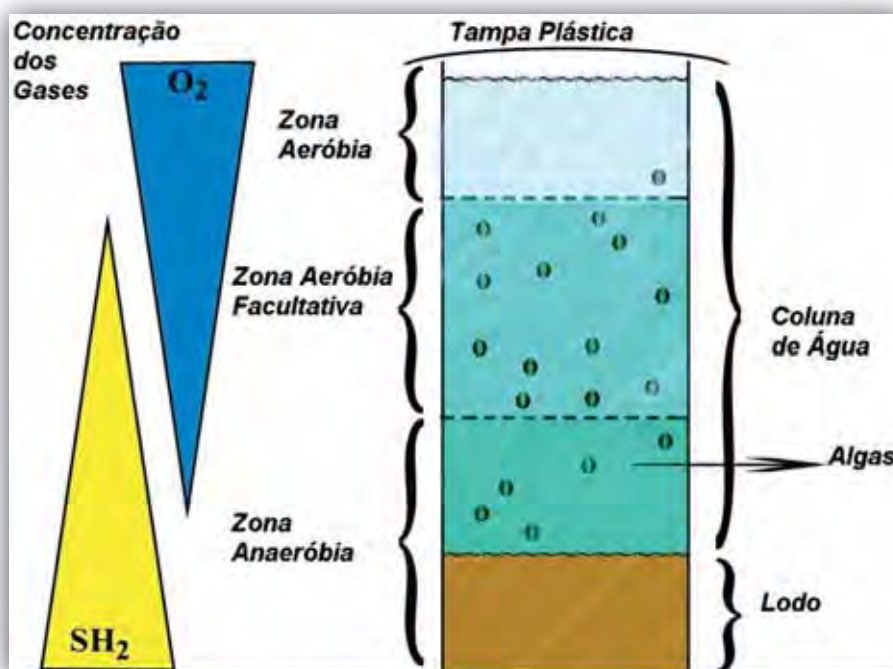


Figura 5: Esquematização da Coluna de Winogradsky.

Na coluna de Winogradsky convencional ocorre o aparecimento de algas e cianobactérias na camada mais superficial (Tabela 3). Estes microrganismos produzem oxigênio e mantêm a zona aeróbia. Depois de algum tempo podem se desenvolver bactérias oxidantes de enxofre quimiolitotróficas, ou seja, que oxidam H_2S para obter energia e sintetizam matéria orgânica a partir de CO_2 .

Na zona anóxica ou anaeróbia ocorre o desenvolvimento de microrganismos que consomem o oxigênio do sedimento e da água. Desta forma, a zona anóxica favorece o crescimento de microrganismos anaeróbios ou fermentativos.

Os processos de decomposição fermentativa têm como produtos finais: ácidos orgânicos, alcoóis e H_2 , os quais podem servir de substrato para as bactérias redutoras de sulfato. No processo de respiração anaeróbia o sulfato é reduzido a H_2S , que por sua vez é utilizado por bactérias sulfurosas verdes e púrpuras. As bactérias sulfurosas se desenvolvem de forma estratificada ao longo da coluna de acordo com a quantidade de sulfeto.

As bactérias verdes e púrpuras realizam reações fotoquímicas. Utilizam o H_2S como doador de elétrons na produção de S (enxofre elementar). O enxofre, ou o sulfato resultante da sua oxidação é reciclado pelas bactérias sulfato redutoras.

Na zona microaerofílica podem se desenvolver bactérias não sulfurosas, as quais crescem em condição anaeróbia e não toleram elevado gradiente de H_2S . São foto heterotróficas e utilizam ácidos orgânicos como fonte de carbono para a síntese celular.

Tabela 3: Principais gêneros de bactérias presentes na Coluna de Winogradsky.

Bactéria	Forma e características	Classificação
<i>Beggiatoa</i> sp.	Bactéria alongada e filamentosa, quimiolitotrófica, não fotossintética, gram-negativa e aeróbia. Utiliza a oxidação do H ₂ S como fonte de energia, acumulando grânulos de enxofre no interior do citoplasma e utiliza o CO ₂ como fonte de carbono.	Bactéria filamentosa oxidante de enxofre.
<i>Thiobacillus</i> sp.	Bacilo gram-negativo, quimiolitotrófico, não fotossintético e aeróbio. Obtém energia pela oxidação do sulfeto de hidrogênio ou enxofre elementar, produzindo sulfato, e utiliza o CO ₂ como fonte de carbono.	Bactéria incolor oxidante do enxofre.
<i>Rhodospirillum</i> sp.	Espiralada flagelada, gram-negativa, heterotrófica e microaerófila. Utiliza a luz como fonte de energia mas não pode converter o CO ₂ em açúcar. Utiliza compostos orgânicos como fonte de carbono.	Bactéria púrpura não relacionada ao enxofre.
<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	Bacilo flagelado, gram-negativo, heterotrófico e microaerófilo. Utiliza a luz como fonte de energia mas não pode converter o CO ₂ em açúcar. Utiliza compostos orgânicos como fonte de carbono.	Bactéria púrpura não relacionada ao enxofre.
<i>Chromatium</i> sp.	Coco ou bacilo gram-negativo, autotrófico sulfuroso e anaeróbio. Possui depósitos internos de enxofre. Obtém energia por meio de reações fotoquímicas e produz seus materiais celulares a partir do CO ₂ . Não gera oxigênio durante o processo.	Bactéria púrpura do enxofre.
<i>Chlorobium</i> sp.	Bacilo gram-negativo, sem mobilidade, fotoautotrófico sulfuroso e anaeróbio. Obtém energia por meio de reações fotoquímicas e produz seus materiais celulares a partir do CO ₂ . Não gera oxigênio durante o processo.	Bactéria verde do enxofre.
<i>Clostridium</i> sp.	Bacilo quimioheterotrófico, anaeróbio estrito, gram-positivo formador de endósporo. Os produtos de seu metabolismo fermentativo são utilizados como substrato por outros grupos microbianos.	Bacilo gram positivo formador de endósporo.
<i>Desulfovibrio</i> sp.	Vibrião, anaeróbio obrigatório, utiliza as formas oxidadas do enxofre, tais como sulfatos (SO ₄ ²⁻) ou enxofre elementar (S ⁰) como acceptor final de elétron. O produto desta reação é o sulfeto de hidrogênio.	Bactéria dissimilatória redutora do sulfato ou enxofre.

Fonte: Holt (1999).

3.7. *Bacillus subtilis*

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria gram-positiva, aeróbia ou anaeróbia facultativa e formadora de endósporo. Sendo assim, ela se torna metabolicamente ativa quando há disponibilidade de substratos adequados ao seu desenvolvimento e produz esporos em condições adversas, mas pode também se reproduzir por fissão binária. Quando produz o esporo, o bacilo também libera antibióticos no ambiente, para reduzir a competição por recursos com outras bactérias gram-positivas.

Este gênero é conhecido pela capacidade de degradar diversos substratos, incluindo celulose, amido, pectina, proteínas, hidrocarbonetos, dentre outros. Portanto, tais bactérias desempenham um papel muito importante nos ciclos biológicos de carbono e nitrogênio.

O *B. subtilis* é comumente encontrado no solo e na água. E sua atividade ideal ocorre a uma temperatura de 37°C e com um pH= 8 (TODAR, 2011).

Muitas cepas de *B. subtilis* produzem um biosurfactante denominado surfactina (Figura 6), cuja molécula consiste em um lipopeptídeo cíclico associado a ácidos graxos hidroxilados e a um heptapeptídeo (COOPER e GOLDENBERG, 1987). A atividade biológica da surfactina depende da composição de aminoácidos, da sequência do peptídeo e da natureza de sua parte lipídica (KOWALL et al, 1998).

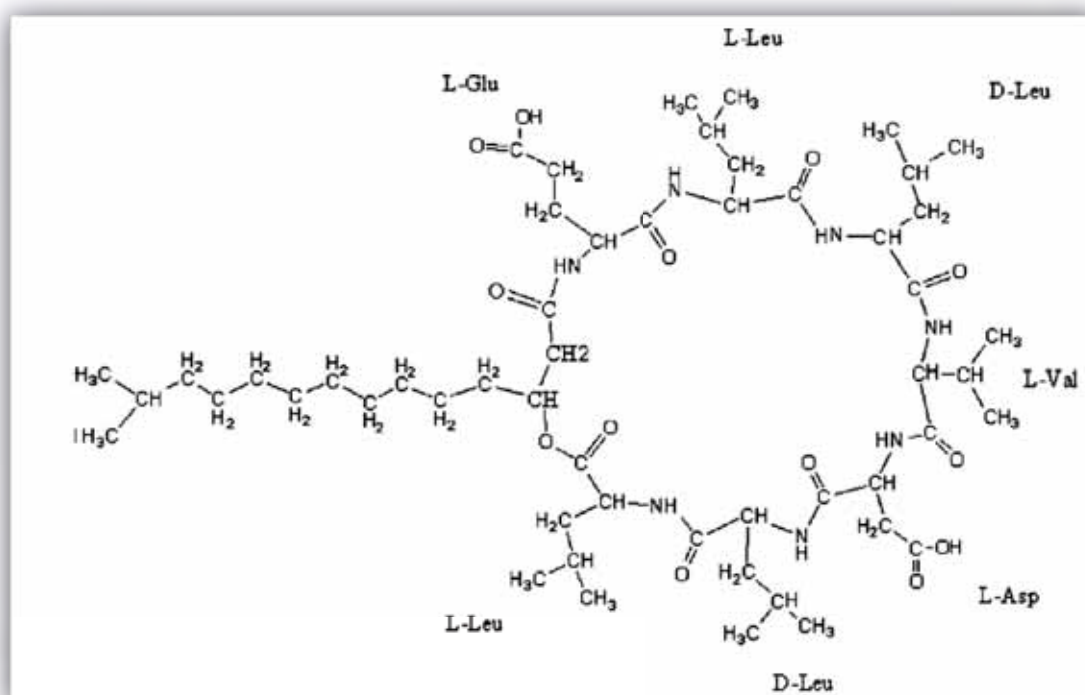


Figura 6: Molécula da surfactina (BARROS et al., 2007).

A surfactina é bastante estável quando submetida a diversas condições de pH. A acidificação da solução para pH=2 eleva a tensão superficial para 62 mN/m e a neutralização (pH=6) diminui a tensão para 27 mN/m, demonstrando que as propriedades surfactantes da surfactina são altamente dependentes do pH. Isto se deve ao fato de que em meio ácido a surfactina precipita, mas sua estrutura não se altera. Esta característica constitui em uma vantagem adicional, pois mesmo submetida a condições extremas de pH, há manutenção da estrutura química original (COSTA, 2005).

Surfactantes possuem a capacidade de alterar as propriedades superficiais (Figura 7) de um fluido (PORTER, 1991). Os microrganismos produzem biossurfactantes, cuja biodegradabilidade e baixa toxicidade constituem vantagens sobre a maioria dos surfactantes sintéticos (provenientes do petróleo). Conseqüentemente tornam-se mais apropriados para aplicação *in situ*, além de serem mais bem aceitos pelos consumidores, por conta da preocupação ambiental.

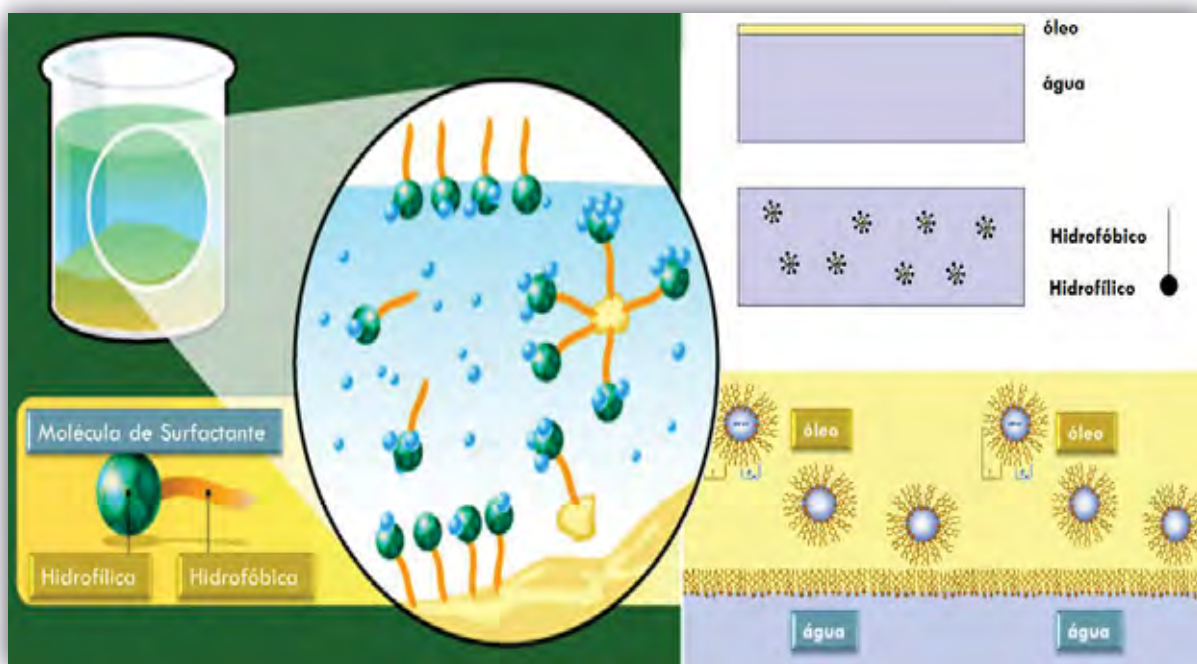


Figura 7: Moléculas de surfactante atuando no processo de emulsificação do óleo. A porção hidrofílica interage com a água enquanto a porção hidrofóbica do surfactante se liga ao poluente.

Bactérias têm sido isoladas de sedimentos, do solo, da água marinha e de áreas contaminadas por óleos. Os biossurfactantes são produzidos em larga escala nestes ambientes, comprovados por evidências, tais como: presença de espuma e emulsões estáveis em áreas de derramamentos de óleos em oceanos, efeito positivo

no aumento da recuperação terciária (BODOUR et *al.*, 2003), bem como a biorremediação de solos altamente contaminados por metais pesados.

3.8. Algas

As algas garantem a funcionalidade de diversos ecossistemas, pois suas espécies possuem diferentes níveis de tolerância aos fatores ambientais, resistindo a algumas alterações em seu habitat, inclusive alterações provenientes de ações antrópicas. São organismos de ampla distribuição e podem ser encontrados em praticamente todos os corpos d'água.

As algas pertencem a três diferentes reinos: monera, protista e plantae.

O reino monera engloba as cianobactérias, algas unicelulares, procariontes e autótrofas. Devido à baixa exigência nutricional e à capacidade de realizar fotossíntese com o aproveitamento do nitrogênio atmosférico, atuam como pioneiras no processo sucessional.

As algas do reino protista são em sua maioria unicelulares, eucariontes e autótrofas ou heterótrofas. Apresentam clorofilas, carotenos e xantofilas no interior de plastos, os quais permitem a fotossíntese. Os filos deste reino e suas características são representados na Tabela 4 (VIDOTTI et *al.*, 2004).

Tabela 4: Filos do reino protista e suas respectivas características.

<i>Euglenophytas</i>	<i>Pyrrophytas</i>	<i>Chrysophytas</i>
Vivem em água doce	Predominantemente marinhos	Marinhos ou de água doce
Unicelulares	Maioria unicelular	Unicelulares ou coloniais
Heterótrofos ou autótrofos	Autótrofos	Autótrofos
Células possuem clorofilas a, b e carotenos	Células possuem clorofilas a e c, caroteno e peridinina	Células possuem clorofilas a e c, caroteno e xantofilas
Armazenam óleos e polissacarídeos como reserva	Armazenam amidos e óleos como reserva	Armazenam crisolaminarina e óleo como reserva
Um ou dois flagelos	Dois flagelos	Gameta masculino da Ordem Centrales tem flagelo

Fonte: Vidotti, et *al.*, 2004.

No reino plantae são encontrados organismos pluricelulares, eucariontes e autótrofos, cujas principais características estão expressas na Tabela 5.

Tabela 5: Filos do reino plantae e suas respectivas características.

<i>Chlorophytas</i>	Rhodophytas	Phaeophytas
Vivem em água doce, salgada, solos úmidos e troncos (formam líquens)	Marinhos (mais comuns em águas quentes). Ficam fixados no substrato	Predominantemente marinhos (mais comuns em águas frias). Ficam fixados no substrato ou flutuando
Unicelulares, coloniais, filamentosos, ou parenquimatosos	Quase exclusivamente pluricelulares	Exclusivamente plurielulares
Autótrofos	Autótrofos	Autótrofos
Células possuem clorofilas a e b, clorofilas e carotenos	Células possuem ficoeritrina, clorofilas a e d e carotenóides	Células possuem fucoxantina, clorofilas a e c e carotenóides
Possuem reservas de amido	Possuem reservas de amido	Possuem reservas de óleos e laminarina (polissacarídeo)
Podem apresentar flagelos na fase reprodutiva ou vegetativa	Ausência de flagelos	Presença de flagelos nos gametas ou em esporos

Fonte: Vidotti, et *al.*, 2004.

As algas podem ser utilizadas como organismos bioindicadores da qualidade da água, pois são facilmente amostradas, possuem distribuição cosmopolita, acumulam poluentes facilmente e podem ser reproduzidas em laboratório.

A utilização de algas como organismos testes tem por base seu ciclo de vida curto, facilitando pesquisas que necessitam de várias gerações, além das altas taxas de crescimento e da facilidade em manter as culturas. Os ensaios com algas são fontes de informações importantes acerca da disponibilidade de nutrientes, ou substâncias potencialmente tóxicas e seus efeitos nos ecossistemas (TRAINOR, 1983).

Um critério de poluição foi sugerido, com base nos gêneros de algas presentes nos sistemas aquáticos: quanto menos diversificada a população, maior a contaminação do sistema (TRAINOR, 1983).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados nos laboratórios do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Unesp- Campus de Rio Claro.

4.1. Colunas de Winogradsky

4.1.1. Coleta da amostra

A primeira etapa consistiu na coleta de água e de solo do Ribeirão Claro na ETA 1 no DAAE de Rio Claro, situada a 238489.31 m E e 7519653.42 m S, em coordenadas UTM (Figura 8). A água neste trecho do ribeirão tinha boa qualidade, verificada pela alta diversidade de organismos, comparando-se a outros ambientes impactados por atividades antrópicas (BARBOSA E CALLISTO, 2000).



Figura 8: Localização da ETA 1, onde foram coletadas as amostras de água e solo.

4.1.2. Coleta dos poluentes

O óleo lubrificante usado foi coletado em locais de troca (local especializado), não apresentando marca ou tipo de óleo, pois era uma mistura de óleos lubrificantes usados. E o biodiesel (éster metílico) novo (B100) foi obtido na Caramuru Alimentos S. A. (GO), empresa produtora de biodiesel.

4.1.3 Preparação do inóculo

Na primeira etapa do processo, o *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi mantido sob refrigeração (4°C) em meio de caldo nutriente de ágar de acordo com o manual da Difco, 1984. O bacilo então foi reativado em meio caldo nutriente (3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne, 5,0 g.L⁻¹ de peptona e 8,0 g.L⁻¹ de NaCl). O bacilo cresceu em incubadora Shaker da Solab sob agitação a 180 rpm por 24 horas e o inóculo líquido obtido (10⁵ a 10⁶ colônias por mL) foi guardado em refrigeração para uso posterior.

Para se ter certeza da concentração de bacilos presentes no caldo nutriente, utilizou-se a escala de Mc Farland (Figura 9), que consiste em um padrão de turvação usado para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos. Quanto maior o número de bactérias, maior será a opacidade do meio de cultura. A comparação da escala de McFarland ao tubo de cultura bacteriana é feita a olho nu (LENNETTE et al., 1985).



Figura 9: Escala de McFarland numerada, contendo diferentes concentrações de sulfato de bário, correspondente a diferentes contagens bacterianas.

4.1.4. Montagem das colunas de Winogradsky

As colunas de Winogradsky foram preparadas com água e o solo do Ribeirão Claro em provetas de vidro de 500 mL incluindo nutrientes (Na_2CO_3 anidro P.A. da marca Vetec, 0,2 g, P.M.= 105,99; Na_2SO_4 P.A. da marca Dinâmica, 4,5 g, P.M.= 142,04; KH_2PO_4 P.A. da marca Reagen, 0,5 g, P.M.= 152,14; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ P.A. da marca Dinâmica, 0,2 g, P.M.= 136,09, mais 0,5 g de papel A4 cortado em pequenos quadradinhos para servir como fonte de celulose). A concentração de sais na água foi de 10,8 g/L, simulando um ambiente de água salobra. Para a pesagem dos nutrientes foi utilizada uma balança semi-analítica da marca Marte, modelo AS5500. Os nutrientes foram adicionados de acordo com (SOUSA, 2011) e as colunas foram preparadas conforme abaixo:

- I. Coluna controle contendo somente 100 g de solo e 500 mL de água do Ribeirão Claro;
- II. Coluna contendo 100 g de solo, 495 mL de água e 5 mL do surfactante Tween 80;
- III. Coluna contaminada contendo o 100 g de solo, 490 mL de água, 5 mL de biodiesel e 5 mL do surfactante Tween 80;
- IV. Coluna contaminada contendo 100 g de solo, 490 mL de água, 5 mL do óleo lubrificante usado e 5 mL do surfactante Tween 80;
- V. Coluna contaminada contendo o 100 g de solo, 485 mL de água, 5 mL de biodiesel e 5 mL do surfactante Tween 80, mais 5 mL do inóculo líquido do *Bacillus subtilis*;
- VI. Coluna contaminada contendo o 100 g de solo, 485 mL de água, 5 mL do óleo lubrificante usado e 5 mL do surfactante Tween 80, mais 5 mL do inóculo líquido do *Bacillus subtilis*.

O inóculo do *B. subtilis* foi acrescentado nas duas últimas colunas para possibilitar a análise e comparação da biorremediação, tanto do óleo lubrificante usado, quando do biodiesel, na presença e na ausência do bacilo.

O surfactante químico Tween 80 (Polisorbato 80), cuja função é a de aumentar a disponibilidade de hidrocarbonetos aos microrganismos, foi acrescentado em todas as colunas, menos na coluna controle, para aumentar o nível de biodegradação dos contaminantes nos diferentes microecossistemas.

As colunas foram colocadas próximas à janela para receber a luminosidade natural e à temperatura ambiente. Essas condições foram utilizadas para que o experimento simulasse o ambiente natural.

Nas colunas de Winogradsky foram realizadas análises ecotoxicológicas através da identificação de algas (PARRA & BICUDO, 1995) e outros organismos em cada parte da coluna: topo, meio e fundo. Também foram feitas avaliações no pH dos microecossistemas. Tais análises serão mais bem detalhadas posteriormente.

4.1.5. Réplicas das colunas II e IV

Para garantir que o desenvolvimento das colunas II e IV tivesse um acompanhamento mais rígido, por conta do aparecimento de bactérias sulfato-redutoras em grandes quantidades, foram feitas réplicas. Explicações sobre essas bactérias redutoras de sulfato serão mais bem detalhadas posteriormente. A escolha de tais colunas foi determinada pelo fato da coluna II ser desprovida de contaminantes, ao contrário da coluna IV, que continha o óleo lubrificante usado na superfície.

As réplicas foram feitas com a finalidade de observar as mudanças na biota de cada uma e verificar se as respostas às condições ambientais e ao contaminante condiziam com as transformações notadas nas colunas II e IV originais.

Para a construção das novas colunas de Winogradsky foram usados a água e o solo do Ribeirão Claro em provetas de vidro de 500 mL, incluindo os mesmos nutrientes e nas mesmas quantidades descritos anteriormente. As colunas foram preparadas conforme abaixo:

RII. Réplica contendo 100 g de solo, 495 mL de água e 5 mL do surfactante Tween 80;

RIV. Réplica contaminada contendo 100 g de solo, 490 mL de água, 5 mL do óleo lubrificante usado e 5 mL do surfactante Tween 80.

Estas colunas também foram colocadas próximas à janela para receber a luminosidade natural, em temperatura ambiente. Posteriormente, todos os testes feitos com as colunas originais foram repetidos para as réplicas.

4.2. Experimento 1: Teste de toxicidade aguda, utilizando sementes de *Lactuca sativa* (alface)

Este teste constitui um recurso prático, de baixo custo e de sensibilidade razoável na indicação qualitativa da presença de substâncias tóxicas ou inibidores biológicos (INAZAKI, 2001).

Foram utilizadas para os testes de toxicidade aguda, 9 placas de petri de 100 x 20 mm. Cada placa continha um papel filtro da marca Qualy e 50 sementes de *Lactuca sativa* dispostas de maneira homogênea e com o máximo de espaçamento entre elas, para evitar a competição por nutrientes e água (Figura 10).

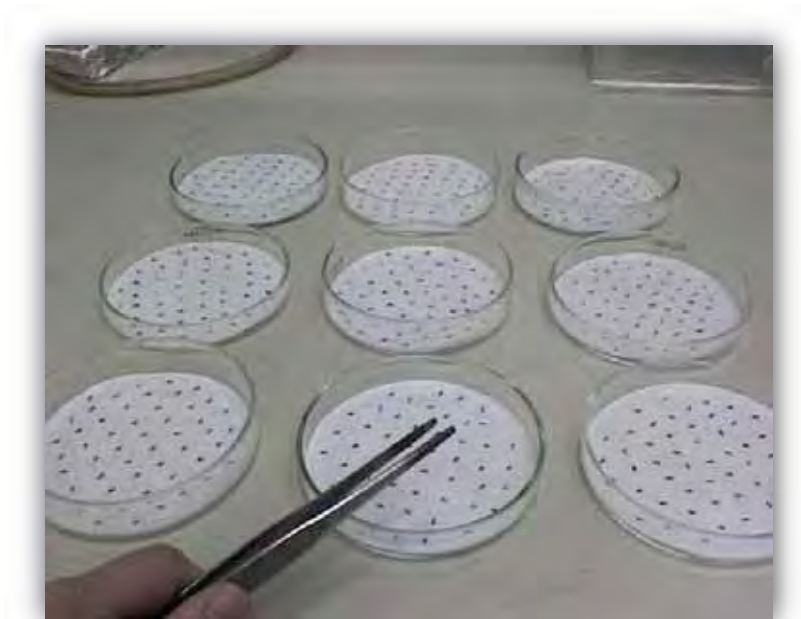


Figura 10: Sementes de *Lactuca sativa*.

Em cada placa foi acrescentada a água da coluna correspondente, com auxílio de uma pipeta graduada. O controle foi feito acrescentando-se 1,5 mL de água mineral. Nas outras placas foram colocados 1,5 mL de água das colunas I, II, III, IV, V, VI, Réplica II e Réplica IV (Figura 11).

As placas foram deixadas em temperatura ambiente, próximas à janela para receber luminosidade solar. As placas de petri foram tampadas com o propósito de evitar a perda de água para o ambiente externo.

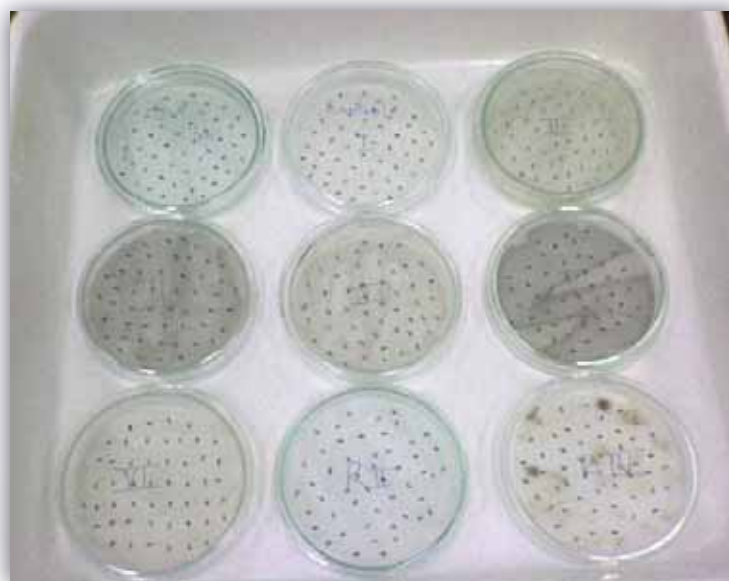


Figura 11: Teste de ecotoxicidade utilizando sementes de *Lactuca sativa*.

Após 24 horas, 1 mL de água mineral foi novamente acrescentado na placa controle e 1 mL da água de cada coluna foi injetado em sua respectiva placa.

Todas as placas foram novamente tampadas e deixadas em temperatura ambiente, com acesso à luz solar por mais 48 horas. Após esse período, as sementes germinadas (Figura 12) de cada placa foram contadas, para a determinação do grau de toxicidade das águas. Não foi levado em consideração o comprimento das radículas, apenas a ocorrência ou não de germinação das sementes.



Figura 12: Contagem de sementes germinadas para a avaliação toxicológica.

4.3. Experimento 2: Teste de toxicidade aguda, utilizando sementes de *Lactuca sativa* (alface) e de *Cucumis sativus* (pepino)

Os microecossistemas das colunas de Winogradsky representam ambientes de água salobra. Consequentemente, a salinidade poderia afetar a germinação das sementes e desta forma não haveria como saber se os resultados da avaliação toxicológica do teste anterior foram provenientes do efeito do contaminante na taxa de germinação ou se a maior influência foi da concentração de sais presentes nas águas.

Se a concentração de sais da água é muito alta ocorre uma diferença de pressão osmótica dentro e fora do tegumento da semente, fazendo com que a água passe do meio hipotônico para o meio hipertônico, ou seja, a água migraria de dentro da semente para fora dela e isto impossibilitaria sua germinação.

Portanto, foi realizado um segundo teste de toxicidade aguda, visando determinar a influência de diferentes concentrações de nutrientes na água, desprovida de poluentes, sobre a germinação de sementes de *Lactuca sativa* e de *Cucumis sativus*.

4.3.1. Preparação das concentrações salinas

A concentração original (Co) de nutrientes, presente em todas as colunas de Winogradsky, era de 10,8 g/L. Determinou-se que para este teste de toxicidade aguda, o resultado seria mais expressivo com o uso de diversas diluições da água salobra. Portanto, foram utilizadas 5 concentrações distintas, descritas abaixo:

- Co: Concentração original, correspondente a 10,8 g/L;
- Co/2: Metade da concentração original, correspondente a 5,4 g/L;
- Ca: Concentração de nutrientes comumente encontrada em ambientes de água doce, correspondente a 3,9 g/L;
- Co/3: Um terço da concentração original, correspondente a 3,6 g/L;
- Co/4: Um quarto da concentração original, correspondente a 2,7 g/L.

Para fazer a solução original de água salobra foram necessários os seguintes nutrientes: Na₂CO₃ anidro P.A. da marca Vetec, 0,1 g, P.M.= 105,99; (NH₄)₂SO₄ P.A. da marca Dinâmica, 0,1 g; Na₂SO₄ P.A. da marca Dinâmica, 2,25 g, P.M.= 142,04 e KH₂PO₄ P.A. da marca Reagen, 0,25 g, P.M.= 152,14.

Todos os nutrientes foram pesados na balança semi-analítica da marca Marte, modelo AS5500, antes de serem acrescentados aos 250 mL de água proveniente do Ribeirão Claro, ETA 1. Os nutrientes foram diluídos na água, em uma proveta de 250 mL, com o auxílio de um bastão de vidro.

Cinco balões volumétricos de 50 mL foram utilizados para as diferentes concentrações. Os volumes de água doce do Ribeirão Claro necessários para diluir as quantidades de solução salobra estão determinados na Tabela 6:

Tabela 6: Volumes de solução salobra e de água doce necessários para obter as concentrações de nutrientes

Concentração	Volume de solução (mL)	Volume de água doce (mL)
Co	10,00	0,00
Co/2	10,00	10,00
Ca	3,57	10,00
Co/3	10,00	20,00
Co/4	10,00	30,00

4.3.2. Montagem das placas de petri

Foram utilizadas para este experimento, 12 placas de petri de 100 x 20 mm, contendo o papel filtro da marca Qualy. Destas placas, foram preparadas 6, cada uma com 50 sementes de *L. sativa* e outras 6, cada uma contendo 50 sementes de *C. sativus*. Para a placas controle, foi adotado o mesmo procedimento do Experimento 1, mas utilizando-se a água filtrada.

4.3.3. Utilização das soluções salinas no tratamento de sementes

Cada uma das 5 placas contendo 50 sementes de *L. sativa* recebeu 1,5 mL de uma solução salina com concentração distinta. As placas foram marcadas de acordo com a concentração salina presente no seu interior (Figura 13).

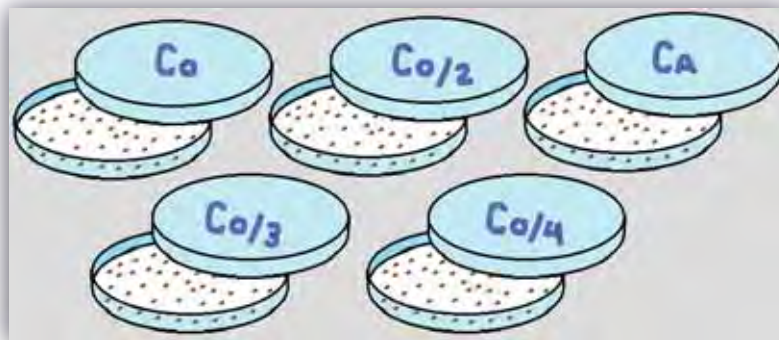


Figura 13: Placas contendo sementes de *L. sativa*, água e nutrientes em diferentes concentrações.

O mesmo procedimento foi realizado para as 5 placas contendo sementes de *C. sativus* (Figura 14).

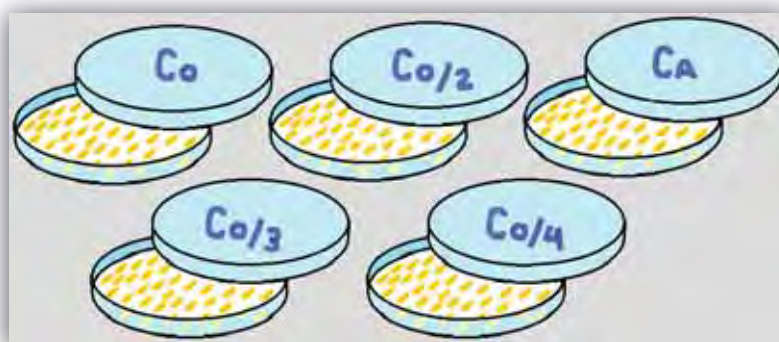


Figura 14: Placas com sementes de *C. sativus*, água e nutrientes em diferentes concentrações.

No procedimento de introdução das soluções nas placas, é importante a utilização de uma pipeta para cada diluição, pois qualquer resíduo de água com sais pode alterar a concentração da solução.

As placas prontas foram cobertas com uma tampa de vidro e deixadas próximas à janela em contato com a luz solar, por 24 horas. Após este período, 1 mL de cada solução foi injetado em sua placa correspondente.

As placas foram novamente tampadas e deixadas à temperatura ambiente próximas à luminosidade natural por mais 48 horas. Em seguida, as sementes germinadas foram contabilizadas.

Tanto para o Experimento 1, quanto para o Experimento 2, foi utilizada uma fórmula para verificar a “eficiência” do contaminante ou das concentrações de sais, ao inibir a germinação de sementes. A fórmula de Abbott fornece a porcentagem desta eficiência de inibição da germinação (NAKANO *et al.*, 1981). A fórmula

adaptada, descrita abaixo, calcula a porcentagem de inibição (%I), a partir do número de sementes germinadas no controle (C) e do número de sementes germinadas no tratamento (T). A Tabela 7 mostra as avaliações toxicológicas feitas a partir do resultado das porcentagens de inibição obtidas por meio dos bioensaios.

$$\%I = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Tabela 7: Classificação da água, de acordo com o valor obtido na porcentagem de inibição

%I	Classificação
> 40%	Tóxica
$10\% \leq x \leq 40\%$	Baixa toxicidade
< 10%	Não tóxica

Fonte: Barbosa (2000).

4.4. Análise do pH nas Colunas de Winogradsky

Após a data de montagem das colunas de Winogradsky e das réplicas I e IV, o pH de todas as colunas foi medido mensalmente, no topo, meio e fundo de cada corpo d'água, utilizando tiras de papel de pH, da marca Macherey- Nagel.

Para que o as tiras de pH não entrassem em contato com o contaminante na superfície das colunas, foram usadas pipetas de 1 mL para retirar amostras de água. Desta forma, as colunas contaminadas foram inclinadas a 45° para que o óleo lubrificante ou o biodiesel formasse uma película mais fina. Em seguida a pipeta foi introduzida sem provocar perda significativa de contaminante.

Foram realizadas 3 medições de pH: a primeira, no dia da montagem das colunas, a segunda após 1 mês e a terceira após 2 meses.

4.5. Identificação de algas

Passado 1 mês da data de montagem das colunas, quando a população fitoplanctônica estava estabilizada, foram realizadas coletas da água proveniente dos 3 estratos no microecossistema: topo, meio e fundo. Estes estratos correspondem às zonas aeróbia, microaerofílica e anóxica, respectivamente.

Primeiramente, foram coletados 5 mL da água de cada zona, de todas as colunas: I, II, III, IV, V, VI, RII e RIV. As amostras foram retiradas rente à parede interna das provetas, com o auxílio de uma pipeta volumétrica de 5 mL.

As amostras foram identificadas, condicionadas em tubos de ensaio com água e álcool e mantidas sob refrigeração, para uso posterior.

É importante que a pipeta usada para cada coluna seja diferente, para não ocorrer a contaminação de outras amostras.

Foram montadas 3 lâminas para cada zona, com a finalidade de amostrar significativamente a comunidade fitoplanctônica das colunas. Cada tubo de ensaio foi agitado para homogeneizar seu conteúdo e com uma pipeta de ponta fina foi colocada uma gota da amostra sobre a lâmina.

Para a identificação das algas foi utilizado o microscópio óptico da marca Nikon. As algas foram identificadas por meio de chaves taxonômicas (BICUDO & MENEZES, 2006) e de comparação do material com pranchas de gêneros. Buscou-se identificar todos os gêneros encontrados em cada lâmina.

4.5.1. Utilização de algas como bioindicadores

Após a identificação dos gêneros de algas presentes em todas as colunas de Winogradsky, inclusive nas réplicas, foi realizada uma pesquisa com a finalidade de descobrir se os gêneros encontrados englobavam algas típicas de ambientes aquáticos poluídos, ou límpidos.

Dependendo de quais gêneros fossem encontrados, poder-se-ia inferir se o tratamento dos contaminantes com o surfactante Tween 80 e/ou com o inóculo do *Bacillus subtilis* foi eficaz no processo de biodegradação do óleo lubrificante usado e do biodiesel. Desta forma, as algas foram utilizadas como bioindicadores da qualidade das águas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Desenvolvimento de algas e BRS nas colunas de Winogradsky

Um mês após a montagem das colunas (Figura 15), observou-se uma coloração escura na água das colunas II, IV e VI, devido ao desenvolvimento acelerado de bactérias redutoras de sulfato.



Figura 15: Colunas de Winogradsky, 1 mês após a montagem.

Na coluna I, houve o aparecimento de pequenas algas no lodo e formou-se uma camada esbranquiçada de 0,5 mm de espessura constituída por partículas finas de material decantado sobre o solo. Ainda não havia uma quantidade considerável de algas para fazer a análise das mesmas.

Nas colunas II, IV e VI a água apresentou coloração marrom mais clara conforme se aproximava da superfície e mais escura à medida que a profundidade aumentava, visto que as bactérias sulfato redutoras se desenvolveram rapidamente, da zona anóxica para a zona aeróbia.

Nas colunas III e V a água estava turva por causa das partículas em suspensão provenientes do lodo. Entretanto, no fundo de ambas as colunas havia uma coloração mais acinzentada, originada pelo desenvolvimento de BRS (bactérias redutoras de sulfato).

Durante o metabolismo das BRS, o sulfato é reduzido a sulfeto de hidrogênio (H_2S), que juntamente com o ferro ferroso (Fe^{2+}) presente no lodo promove a formação de um precipitado preto, o sulfeto ferroso (FeS). O escurecimento da água

pela formação de FeS é um indicativo da atividade metabólica de BRS (BARBOSA, 2009).

Em todas as colunas houve o aparecimento de pequenas bolhas de ar no solo, o que indica a ação bacteriana, potencializada pela adição de nutrientes.

Dois meses após a montagem das colunas (Figura 16), observou-se o escurecimento na coloração da água de todas as colunas, exceto da coluna controle.



Figura 16: Colunas de Winogradsky, 2 meses após a montagem.

Na coluna I (controle), as algas se desenvolveram sobre a superfície do lodo e nas paredes da proveta, de modo que as coletas de amostras puderam ser realizadas neste período para identificação e análise de gêneros das algas.

Em todas as outras colunas ocorreu dominância das BRS, as quais cresceram primeiramente no estrato mais anaeróbio do corpo d'água e posteriormente se proliferaram no sentido da zona aeróbia. A principal fonte de sulfato utilizada por estas bactérias foi encontrada no $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amônio) e no Na_2SO_4 (sulfato de sódio), nutrientes acrescentados ao início do experimento. As bactérias sulfato-redutoras são fundamentais nos processos relacionados aos ciclos do enxofre e do carbono.

O fato das BRS não terem se desenvolvido na coluna controle é justificado pela ausência do Tween 80 em sua composição. Pois o surfactante estava presente em todas as outras colunas. Conseqüentemente, o Tween 80 (Figura 17) foi utilizado como fonte de carbono para as bactérias sulfato-redutoras.

O sinergismo entre os ciclos do enxofre e do carbono disponibiliza recursos essenciais para o metabolismo celular das BRS.

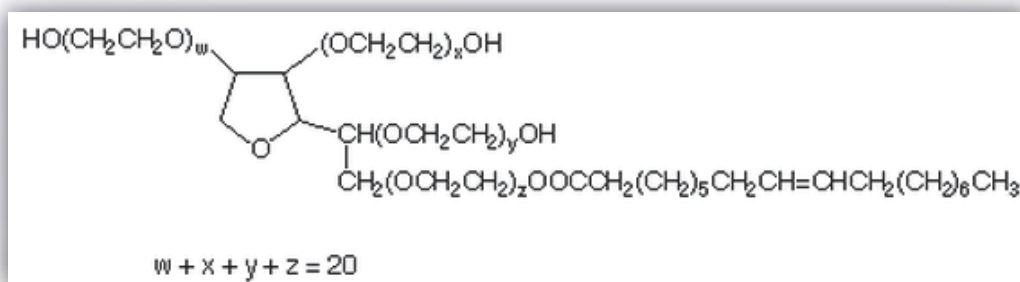


Figura 17: Fórmula molecular do Polissorbato 80 (Tween 80).

Os mecanismos de redução bacteriana de sulfato estão relacionados diretamente com a oxidação de matéria orgânica. Na zona anóxica, a mineralização de carbono orgânico envolve uma série complexa de degradação e requer a interação de diferentes grupos de microrganismos (BARBOSA, 2009).

O sucesso das espécies de BRS está relacionado com a origem e a concentração de substrato orgânico e de íons sulfato presentes no meio. Foi por esta razão, que as BRS cresceram mais rapidamente nas colunas com o óleo lubrificante usado do que nas colunas contendo biodiesel, afinal o óleo lubrificante usado possui produtos de degradação do óleo básico e partículas de carbono originadas no craqueamento de combustíveis, componentes que também serviram como fonte matéria orgânica e de carbono para as BRS.

No microscópio puderam-se identificar bactérias sulfato-redutoras do gênero *Desulfovibrio*. Este gênero costuma se desenvolver entre 25°C e 44°C, em uma faixa bem ampla de pH, que varia de 5,5 a 9. Suportam altas concentrações salinas, exigem para seu crescimento condições redutoras bastante severas e não formam esporos.

Passados 3 meses da montagem das colunas (Figura 18a), o interior das paredes nas provetas começou a apresentar uma coloração púrpura. As bactérias sulfurosas púrpuras (Figura 18b) puderam ser observadas no microscópio. Elas são facilmente detectáveis por possuírem células relativamente grandes, com grânulos de enxofre em seu interior.

A difusão do H₂S pela água da coluna permitiu o crescimento dessas bactérias púrpuras, as quais produzem seus materiais celulares a partir do CO₂. Estas bactérias não produzem O₂ durante o processo de fotossíntese, pois utilizam o H₂S como redutor e não a água, na produção de S.

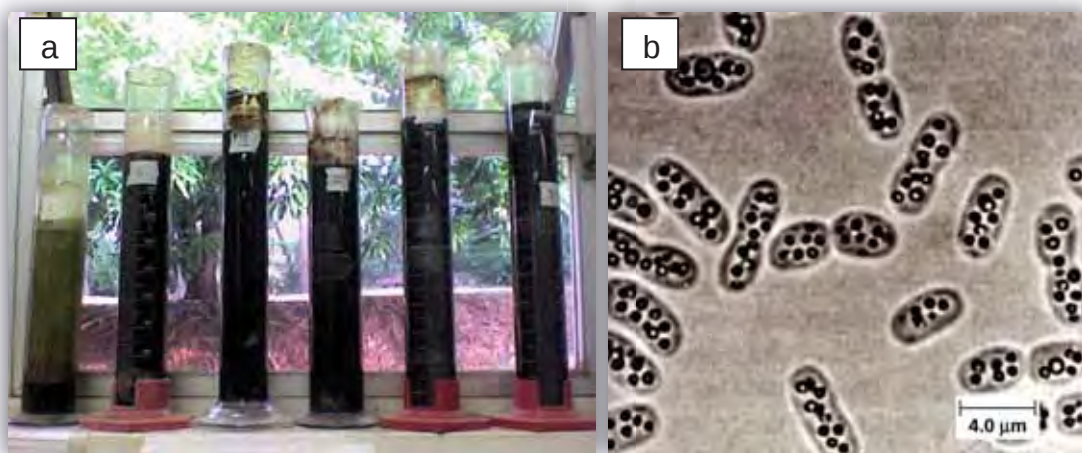


Figura 18: (a) Colunas de Winogradsky, 3 meses após a montagem. Todas as colunas, exceto o controle, apresentaram bactérias púrpuras na parede interna. (b) Bactérias púrpuras com grânulos de enxofre em seu interior, vistas no microscópio.

A coluna I (controle) apresentou uma grande quantidade de algas, visíveis em todos os estratos do corpo d'água. A comunidade de algas se estabilizou na coluna, possibilitando novas análises de gêneros ali presentes. A água das outras colunas também foi analisada no microscópio.

5.1.1. Réplicas das colunas II e IV

Nas zonas anóxicas das réplicas II e IV, 1 mês após a montagem das colunas (Figura 19a), também foi observado o crescimento das BRS, em consequência da presença do Tween 80 e da matéria orgânica presente no lodo (fontes de carbono), além do sulfato de amônio e do sulfato de sódio, os quais forneceram o substrato necessário para a síntese de energia celular via produção de sulfeto.

Na Figura 19b (2 meses após a montagem das colunas) vê-se claramente o processo de desenvolvimento das BRS no sentido da zona aeróbia. Apesar das BRS serem anaeróbias, elas podem apresentar tolerância ao oxigênio.

Passados 3 meses da construção das réplicas, as BRS já haviam atingido todas as zonas de ambas as colunas (Figura 19c). E as bactérias sulfurosas verdes e púrpuras estavam começando a se desenvolver nas paredes das colunas. Não foi possível visualizar as bactérias verdes no microscópio, pois elas possuem células menores do que as bactérias púrpuras e depositam o enxofre do lado externo da célula. O sulfato produzido pelas bactérias verdes e púrpuras é reaproveitado pelas bactérias do gênero *Desulfovibrio* (também presentes nas réplicas II e IV). E desta forma ocorre o ciclo do enxofre.

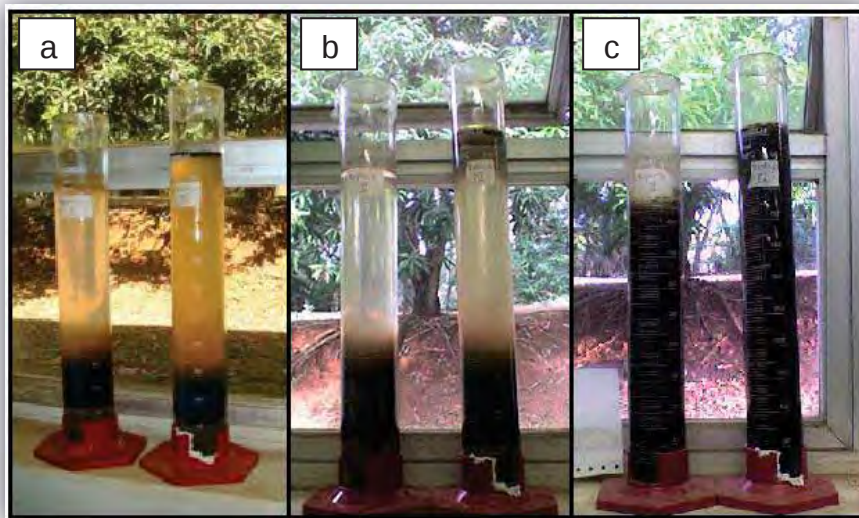


Figura 19: Réplicas das colunas II e IV (a) 1 mês após a montagem, com dominância das BRS na zona anóxica das colunas. (b) 2 meses após a montagem, com BRS nas zonas anóxica e microaerofílica. (c) 3 meses após a montagem com início do desenvolvimento de bactérias púrpuras e verdes.

5.2. Resultados das análises de pH

As três medições de pH realizadas para cada zona de todas as colunas (inclusive das réplicas) foram feitas em três períodos: a primeira no dia da montagem das colunas (T0), a segunda, 1 mês após a montagem (T1) e a terceira, 2 meses após a montagem (T2).

A Figura 20 representa os valores de pH determinados para o fundo de todas as colunas, nos tempos T0, T1 e T2.

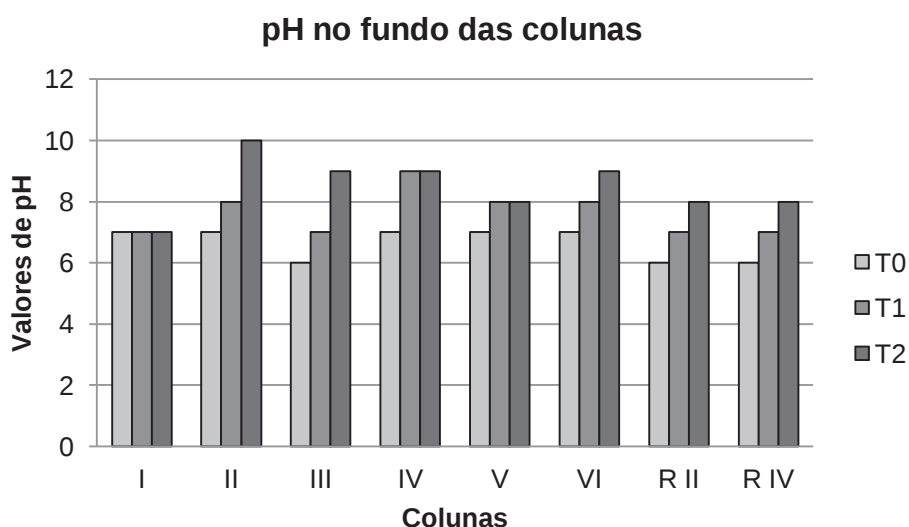


Figura 20: Valores de pH da zona mais profunda em todas as colunas, no dia da montagem das colunas (T0), 1 mês após a montagem (T1) e 2 meses após a montagem (T2).

Somente o pH da coluna I manteve-se constante e neutro no fundo, no decorrer de 2 meses. Este resultado condiz com o fato dela ter sido a única, cuja biota não teve dominância de BRS, visto que essas bactérias liberam o sulfeto de hidrogênio (H_2S), que por sua vez se dissocia em bissulfeto (HS^-), uma base conjugada do H_2S .

Nas colunas II e III, o pH variou mais do T1 para o T2, sendo que inicialmente o pH de ambas era neutro. Nas colunas VI, RII e RIV, o pH foi aumentando gradativamente a cada mês. Porém, com exceção do controle, todas as colunas apresentaram pH básico ($pH \geq 8$) no T2.

As BRS foram encontradas mais freqüentemente no fundo das colunas do que em qualquer outro estrato, pois necessitam da matéria orgânica presente em maiores quantidades no lodo, como fonte de carbono. Além disso, o fundo da coluna constitui normalmente a zona anaeróbia, que favorece o crescimento destas bactérias e conseqüentemente, a presença de bissulfeto na água, o que colabora para que o meio fique ainda mais básico.

Já na zona central da coluna, o quadro de pHs têm um aspecto um pouco distinto do fundo (Figura 21). Em algumas colunas, as BRS ainda não colonizaram integralmente o estrato e, portanto, a redução do sulfato e posterior reação de dissociação do sulfeto de hidrogênio para bissulfeto, não ocorreram.

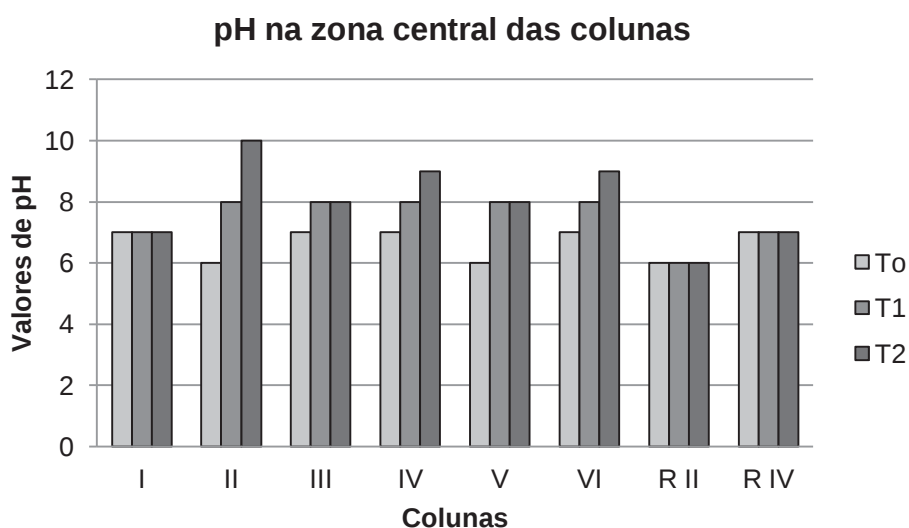


Figura 21: Valores de pH da zona central de todas as colunas, no dia da montagem das colunas (T0), 1 mês após a montagem (T1) e 2 meses após a montagem (T2).

A coluna I permaneceu com o pH neutro em todos os períodos medidos. As colunas II, VI, V e VI acompanharam praticamente o mesmo crescimento dos valores de pH encontrados para o fundo, o que significa maior presença de BRS na zona

central dessas colunas. Já as colunas III, RII e RIV, apresentaram valores de pH mais baixos do que os do fundo, o que significa uma menor presença do ânion $[\text{HS}]^-$ neste estrato.

A Figura 22 contém os valores de pH no topo das colunas.

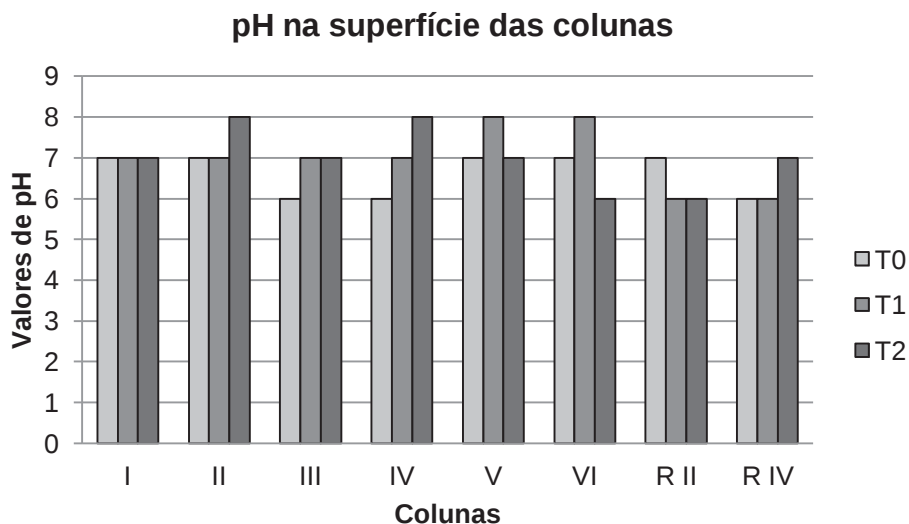


Figura 22: Valores de pH da zona central de todas as colunas, no dia da montagem das colunas (T0), 1 mês após a montagem (T1) e 2 meses após a montagem (T2).

Se o pH aumenta ou permanece básico na superfície, significa que pode ocorrer no topo da coluna, a dissociação do H_2S para HS^- . Também poderia ser um indício de que uma situação de anaerobiose se formou na superfície por conta do óleo, que não deixaria a água com mais oxigênio dissolvido. É o caso da coluna IV, que neste caso simula um derramamento de óleo. Isto traria sérias consequências para a biota aquática dependente de O_2 , numa situação real.

Obtiveram-se resultados interessantes nas colunas V e VI (ambas contaminadas com biodiesel e óleo lubrificante usado, respectivamente). Se o óleo provoca a situação de anaerobiose, ele favorece o desenvolvimento de BRS, que produzem H_2S , que por sua vez pode dissociar-se em HS^- ou até mesmo em sulfeto (S^{2-}), em condições extremamente alcalinas, deixando o meio ainda mais básico. Porém, se os valores de pH das colunas V e VI diminuíram, do período T1 para o T2, isto poderia ser um indício de que ocorreu um rompimento na barreira de óleo na superfície. E coincidentemente, isto aconteceu nas colunas que receberam o inóculo do *Bacillus subtilis*.

Nas colunas V e VI, os contaminantes de ambas apresentaram 1 mm de espessura, sendo que no início do experimento o óleo lubrificante usado tinha 4 mm e o biodiesel, 3 mm. Portanto, o resultado pode ser um indício de que o *B. subtilis* produziu a surfactina, que degradou parcialmente os poluentes, quando o pH da

região superficial das colunas apresentava-se neutro. Como já foi dito, a surfactina tem a vantagem de não sofrer alterações moleculares diante da mudança no pH. Porém, sua atividade ótima ocorre quando o pH está neutro.

Nas colunas III e IV não ocorreu a diminuição do valor do pH. Ele permaneceu neutro na superfície da coluna III e ficou mais básico no topo da coluna IV. Quando medida a espessura dos contaminantes, ela apresentou 1,5 mm de biodiesel na coluna III e 3 mm de óleo lubrificante na coluna IV. Neste caso, a biodegradação do biodiesel pode ter ocorrido parcialmente, por conta do efeito do surfactante Tween 80. Na coluna IV, o óleo lubrificante usado não apresentou mudança significativa na medida de sua espessura.

5.3. Experimento 1

Neste experimento foram utilizadas 9 placas de petri com sementes de *Lactuca sativa*. Dessas 9, ocorreu a germinação de sementes em apenas uma, a placa controle (Figura 23).

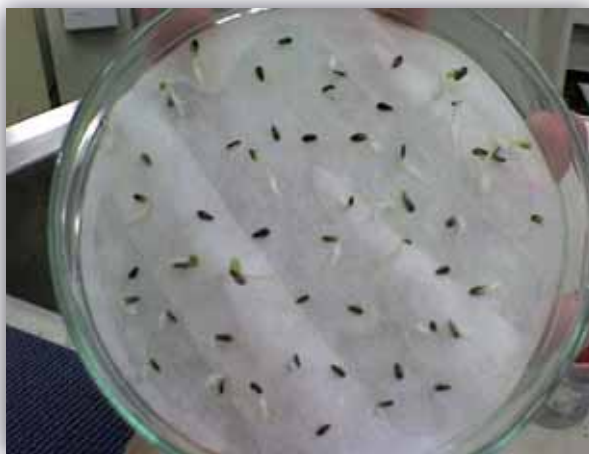


Figura 23: Placa controle com sementes de *Lactuca sativa*.

Germinaram 34 sementes na placa controle. Porém, deve-se considerar que a taxa de germinação dessas sementes era de 98% (consta na embalagem). Portanto, se a taxa de germinação fosse 100%, teoricamente teriam germinado 41 sementes. De qualquer modo, o resultado da fórmula de Abbott não se altera quando a germinação nos outros tratamentos é nula.

A porcentagem de inibição foi de 100% em todos os tratamentos (Figura 24), ou seja, a água de todas as colunas foi considerada tóxica para as sementes de *Lactuca sativa*. A partir deste resultado pôde-se inferir que os contaminantes não

foram os responsáveis pela inibição da germinação, visto que as sementes das placas contendo a água da coluna controle, da coluna II e da réplica II (todas desprovidas de óleo) também não germinaram.

Outro teste de toxicidade foi realizado, mas desta vez, levando-se em consideração a concentração de nutrientes presentes nas colunas.

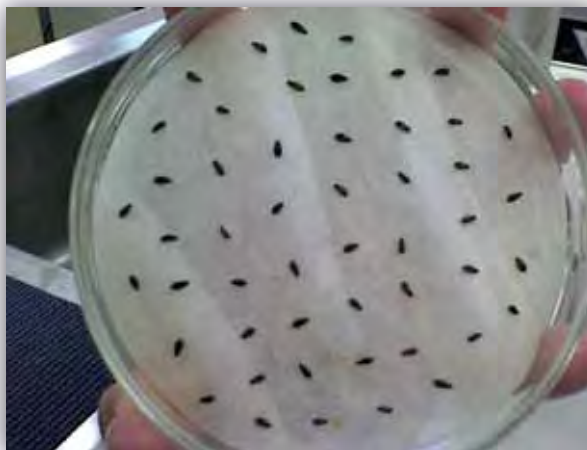


Figura 24: Sementes não germinadas, em todos os outros tratamentos.

5.4. Experimento 2

O segundo teste de toxicidade foi realizado para determinar em que nível a concentração de nutrientes interfere na germinação de sementes, levando-se em consideração os resultados do experimento anterior e partindo do princípio de que o ecossistema reproduzido consiste num ambiente de águas salobras (devido a presença de sais dentre os nutrientes acrescentados à água doce).

As espécies utilizadas para o teste de toxicidade foram *Lactuca sativa* e *Cucumis sativus*. Acredita-se que nenhuma dessas espécies seriam cultivadas com água proveniente de fonte salobra, no entanto, elas foram utilizadas por apresentar alta sensibilidade às perturbações do meio externo, às substâncias químicas e às concentrações de sais presentes no substrato.

Apesar de sementes das duas espécies terem germinado na solução contendo a concentração original de sais, a maior parte das sementes não nasceram, pois se o meio é mais hipertônico do que o interior da semente, ela perde água para a solução salina, deixando de realizar trocas catiônicas com o meio e de absorver a água necessária para se desenvolver.

A quantidade de *C. sativus* com radículas visíveis foi maior do que o número de sementes de *L. sativa* germinadas. Isto ocorreu, pois o endosperma do *C. sativus* é maior e por isso a disponibilidade de material de reserva para o crescimento do embrião teve uma relação direta com o tamanho do albúmen. As células do endosperma possuem todo o aparato para a síntese enzimática e para a germinação da semente em condições ambientais propícias.

A Figura 25 permite confirmar a hipótese de que a concentração salina foi o fator responsável pela inibição da germinação de sementes no experimento 1. Quanto mais diluído o conjunto de nutrientes, menor a concentração e sais e maior a quantidade de sementes germinadas.

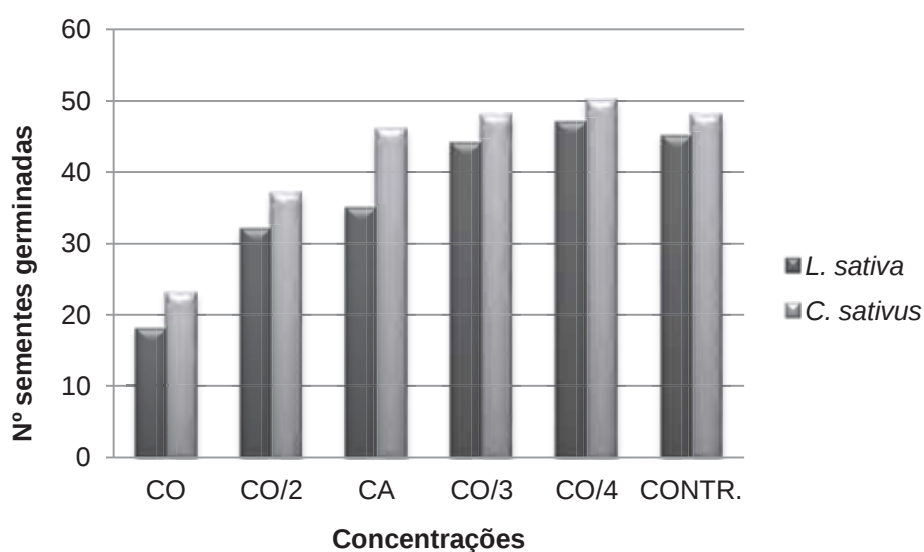


Figura 25: Estabelece a relação entre a quantidade de sementes germinadas e as concentrações de sais na água.

Para se verificar o nível de toxicidade de cada concentração, foram calculadas as porcentagens de inibição, representadas na Tabela 8, abaixo:

Tabela 8: Porcentagens de inibição por concentração, para ambas as espécies

Concentração	I%	
	L. sativa	C. sativus
CO	60	52
CO/2	28,9	22,9
CA	22,2	4,1
CO/3	2,2	0
CO/4	0	0

A partir da Figura 26, pode-se inferir que a concentração salina original de 10,8 g/L, presente em todas as colunas de Winogradsky, é considerada tóxica, tanto para as sementes de *L. sativa*, quanto para as sementes de *C. sativus*.

A metade da concentração original (CO/2), correspondente a 5,4 g/L, é classificada como sendo de baixa toxicidade para as duas espécies. Já a Ca, concentração de nutrientes encontrada em ambientes de água doce, de 3,9 g/L apresentou baixa toxicidade somente para a *L. sativa*.

As duas soluções salinas CO/3 e CO/4, correspondentes a 3,6 g/L e a 2,7 g/L, respectivamente, não apresentaram toxicidade para ambas as espécies.

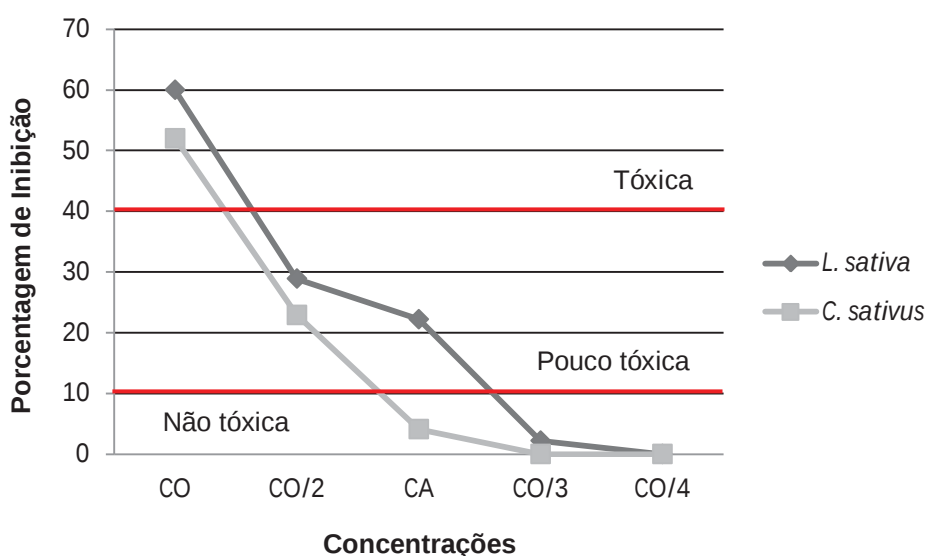


Figura 26: Caracterização das concentrações, de acordo com a porcentagem de inibição.

Se for considerada a tendência das curvas no gráfico, dada pelos pontos que relacionam a porcentagem de inibição com as concentrações, há uma grande chance da taxa de germinação, para a concentração salina de 3,9 g/L, ter apresentado erro prático, visto que não há lógica no fato da água doce apresentar toxicidade às sementes de *L. sativa*, mesmo em nível baixo. Neste caso, a taxa de germinação descrita na embalagem da semente, como sendo 98%, pode ter tido influência no teste de toxicidade.

Para pesquisas posteriores, recomenda-se construir réplicas para todos os experimentos, como os que foram realizados no atual trabalho, com o propósito de minimizar os erros práticos.

5.5. Gêneros de algas

Foram identificados diversos gêneros de algas nas 3 zonas de todas as colunas. Uma grande quantidade de cianobactérias e de microalgas verdes estava presente, sobretudo na coluna controle. Os gêneros de algas estão representados na Tabela 9.

Tabela 9: Gêneros de algas presentes em cada coluna, no topo (T), meio (M) e fundo (F)

Gênero	Coluna																	
	I			II			III			IV			V			VI		
	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F
<i>Aphanocapsa</i> spp.							X	X										
<i>Anabaena</i> spp.				X														
<i>Anacystis</i> spp.							X											
<i>Ankistrodesmus</i> spp.			X															
<i>Aphanizomenon</i> spp.																	X	
<i>Aphanochaete</i> spp.		X	X	X														
<i>Aphanothece</i> spp.	X																	
<i>Arthrospira</i> spp.								X					X					
<i>Botryococcus</i> spp.							X	X										
<i>Calothrix</i> spp.	X	X																
<i>Chlorella</i> spp.	X															X		
<i>Chlorococcum</i> spp.							X			X	X		X					
<i>Chroococcus</i> spp.		X												X				
<i>Cladophora</i> spp.										X								
<i>Coelosphaerium</i> spp.				X														
<i>Cylindrospermopsis</i> spp.							X											
<i>Geitlerinema</i> spp.			X															
<i>Gleocapsa</i> spp.			X															
<i>Gloeotheca</i> spp.					X													
<i>Gomphonema</i> spp.							X	X		X		X				X		
<i>Gomphosphaeria</i> spp.				X														
<i>Gonium</i> spp.								X								X		
<i>Heteroleibleinia</i> spp.	X																	
<i>Johannesbaptistia</i> spp.	X	X		X														
<i>Leptolyngbya</i> spp.	X																	
<i>Lyngbya</i> spp.			X															
<i>Mallomonas</i> spp.										X								
<i>Merismopedia</i> spp.			X															
<i>Microcoleus</i> spp.	X	X																
<i>Microcrocisspp.</i>			X															
<i>Microcystis</i> spp.							X	X										
<i>Microspora</i> spp.	X		X		X													

Gênero	Coluna																	
	I			II			III			IV			V			VI		
	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F	T	M	F
<i>Nephrocytium</i> spp.			X															
<i>Nitzschia</i> spp.										X	X					X		
<i>Nodularia</i> spp.	X																	
<i>Oscillatoria</i> spp.			X															
<i>Pandorina</i> spp.				X														
<i>Peridinium</i> spp.				X														
<i>Pseudanabaena</i> spp.		X	X															
<i>Schizothrix</i> spp.	X																	
<i>Snowella</i> spp.				X	X													
<i>Spirulina</i> spp.			X															
<i>Synechococcus</i> spp.	X																	
<i>Synechocystis</i> spp.	X																	
<i>Synura</i> spp.													X					
<i>Tetrastrum</i> spp.	X																	
<i>Tolypothrix</i> spp.		X	X															
<i>Ulothrix</i> spp.			X															
<i>Zygnema</i> spp.		X																

A Tabela 10 contém os gêneros encontrados nos estratos das réplicas.

Tabela 10: Gêneros de algas presentes nas três zonas da Réplica II e da Réplica IV

Gênero	Coluna					
	RII			RIV		
	T	M	F	T	M	F
<i>Aphanocapsa</i> spp.						X
<i>Anacystis</i> spp.				X		
<i>Aphanochaete</i> spp.	X					
<i>Aphanothece</i> spp.				X		
<i>Arthrospira</i> spp.					X	X
<i>Chlorella</i> spp.	X	X				
<i>Chlorococcum</i> spp.					X	
<i>Chroococcus</i> spp.	X			X		
<i>Cladophora</i> spp.						X
<i>Coelosphaerium</i> spp.			X			
<i>Cylindrospermopsis</i> spp.					X	
<i>Geitlerinema</i> spp.	X			X		
<i>Gloeotheca</i> spp.	X					
<i>Gomphonema</i> spp.						X

Gênero	Coluna					
	RII			RIV		
	T	M	F	T	M	F
<i>Mallomonas</i> spp.			X			
<i>Microcystis</i> spp.						X
<i>Nitzschia</i> spp.					X	X
<i>Pandorina</i> spp.					X	
<i>Peridinium</i> spp.						X
<i>Synechococcus</i> spp.		X				
<i>Tetrastrum</i> spp.				X	X	
<i>Tolypothrix</i> spp.	X					

Na coluna controle foi encontrado o maior número de algas, tanto de cianofíceas, quanto de algas verdes. Dos gêneros identificados, 27 caracterizam ambientes límpidos na coluna I, como é o caso do *Calothrix* spp., *Ulothrix* spp., *Heteroleibleinia* spp., *Aphanothece* spp., *Microcoleus* spp., *Pseudanabaena* spp., dentre outros. O gênero *Chroococcus* spp foi o mais representativo em termos de abundância de indivíduos. Trata-se de um gênero cosmopolita, freqüente no plâncton e no metafíton de diversos ambientes, inclusive no de águas salobras.

Na coluna II, foram encontrados somente 5 gêneros que caracterizam ambientes aquáticos límpidos, no topo e no meio da coluna. Apesar de apresentarem um número muito reduzido de indivíduos, foram identificados: *Aphanochaete* spp., *Gloeothece* spp., *Johannesbaptistia* spp., *Leibleinia* spp. e *Microspora* spp. O gênero *Snowella* spp., encontrado no topo e no meio da coluna, é comumente encontrado no plâncton de águas salobras ou doces, podendo também viver no metafíton (FRANCESCHINI et al., 2010).

Na coluna III não foi encontrado qualquer gênero de algas que costumam se desenvolver em águas límpidas. Isto se deve à presença do biodiesel na superfície da água, que bloqueia a passagem de oxigênio, produzindo uma zona anaeróbia no topo da coluna, que favorece o aparecimento de BRS, como o *Desulfovibrio*, que por sua vez deposita grânulos de enxofre em seu interior, acarretando uma coloração escura na água e impedindo a passagem de luz. Por conseguinte, o desenvolvimento de algas fica comprometido. No entanto, foram encontrados poucos indivíduos de gêneros bioindicadores de águas poluídas, como: *Arthrospira* spp., *Gomphonema* spp. e *Chlorococcum* spp.. O gênero *Botryococcus* spp., encontrado no topo e no meio da coluna, pode aparecer em águas moderadamente alcalinas, incluindo águas oligotróficas a eutróficas e levemente salgadas (FRANCESCHINI et al., 2010).

Na coluna IV, não foi encontrada uma grande quantidade de algas, também por causa da presença de contaminante, no caso, o óleo lubrificante usado na superfície da coluna. Os indivíduos amostrados pertenciam a gêneros que, em sua maioria, são representativos de águas poluídas, são eles: *Arthrospira* spp., *Chlorococcum* spp., *Gomphonema* spp. e *Nitzchia* spp. (no topo e no meio da coluna).

A coluna V apresentou 3 indivíduos do gênero *Chroococcus* spp. na zona central do corpo d'água. Este gênero é característico de águas límpidas. Entretanto, foram encontrados outros gêneros bioindicadores de ambientes contaminados, com mais representatividade em abundância de indivíduos: *Arthrospira* spp., *Chlorococcum* spp. e *Gomphonema* spp.

Foram identificados 4 gêneros de algas representativas de águas contaminadas na coluna VI: *Chlorococcum* spp., *Nitzchia* spp., *Chlorella* spp. e *Gomphonema* spp. Também foram encontrados 2 indivíduos de *Aphanizomenon* spp.. Este gênero desenvolve-se em ambientes eutrofizados e pode causar florações. Algumas espécies produzem toxinas, podendo afetar a dinâmica natural da biota.

Na réplica II foram encontrados 4 gêneros de algas, os quais apresentaram vários indivíduos muito dispersos nas amostras analisadas: *Chroococcus* spp., *Geitlerinema* spp., *Synechococcus* spp. e *Tolypothrix* spp. Estes gêneros são geralmente encontrados em águas límpidas. A *Chlorella* spp., representativa de ambiente contaminado também estava presente na coluna.

Na réplica IV foram encontrados muitos indivíduos de *Tetrastrum* spp., um gênero cosmopolita, que possui muitas espécies planctônicas, de águas alcalinas e que geralmente se desenvolvem em ambientes eutróficos. Foram identificados alguns gêneros típicos de águas límpidas, como *Chroococcus* spp., *Geitlerinema* spp. e *Pandorina* spp.. Porém, a maior parte dos indivíduos encontrados pertencia a gêneros indicadores de água contaminada: *Anacystis* spp., *Arthrospira* spp., *Chlorococcum* spp., *Gomphonema* spp. e *Nitzchia* spp.

6. CONCLUSÕES

Com este trabalho pode-se concluir que houve grandes alterações na biota das colunas. E uma das principais mudanças foi o desenvolvimento de bactérias redutoras de sulfato, que teve foco na pesquisa, por conta da relação de dominância estabelecida pela população de BRS. A mudança rápida na coloração das águas indicou o crescimento dessas bactérias, providas de grânulos de enxofre depositados interna ou externamente às suas células. As BRS são importantíssimas para a manutenção dos ciclos de enxofre e do carbono e constituem o início da dinâmica microbiana na coluna de Winogradsky, pois seus produtos metabólicos são aproveitados por outros microrganismos, que participam deste consórcio composto por diferentes funções ecossistêmicas realizadas por bactérias, protozoários, algas, dentre outros microrganismos.

O surfactante Tween 80, incluído na metodologia com o propósito de potencializar o processo de biodegradação dos contaminantes, acabou servindo como fonte de carbono para as BRS, juntamente com a matéria orgânica presente no lodo. Os nutrientes acrescentados às colunas forneceram o sulfato necessário ao metabolismo das BRS e reproduziram um ecossistema de água salobra. Pelo fato da água ter uma concentração salina mais alta do que a água doce, as algas que se estabeleceram nas colunas também são encontradas em águas salobras.

Posteriormente, apareceram bactérias púrpuras e verdes fotossintetizantes, as quais utilizaram os produtos do metabolismo de outras BRS para se desenvolver.

A atividade microbiana dentro das colunas, somada às condições de salinidade e à presença de contaminantes em algumas colunas, resultaram em alterações significativas do pH das águas.

Nas colunas V e VI, ambas contaminadas com biodiesel e óleo lubrificante usado, respectivamente, houve uma diminuição no valor do pH após um período de alcalinização da água. Isto, somado ao fato da espessura dos contaminantes ter diminuído no decorrer de 2 meses, gera evidências de que ocorreu a biodegradação parcial dos poluentes por meio da ação conjunta do *Bacillus subtilis*, com a biota aquática e o surfactante Tween 80. Entretanto, não se pode concluir que o fator principal para a ocorrência da biodegradação consiste na produção de surfactina pelo *B. subtilis*. Pois a rede de interações entre a biota diversificada e o meio é bastante complexa e repleta de reações provocadas pelo consórcio microbiano.

Quanto aos testes de toxicidade realizados com as sementes de *L. sativa* e de *C. sativus*, pôde-se inferir que a concentração de sais presentes na água foi o responsável pela inibição da germinação, pois o meio hipertônico não permite que as sementes absorvam água. Houve uma relação inversamente proporcional entre o valor das concentrações e a taxa de germinação de sementes. A presença de óleo também é outro fator limitante à germinação, visto que ele impermeabiliza o tegumento e não permite que ocorra a passagem de nutrientes e de água para a semente.

E por fim, o uso de algas como bioindicadores mostrou-se como uma técnica bastante eficaz na determinação da qualidade da água. Na coluna controle e nas zonas mais superficiais de colunas desprovidas de contaminante, os gêneros de algas amostrados indicaram boa qualidade da água, enquanto nas colunas contaminadas, apareceram algas típicas de ambientes poluídos. O número de gêneros e de indivíduos encontrados se concentrou na coluna controle, pois o escurecimento da água das outras colunas não permitiu o efetivo processo de fotossíntese, necessário ao desenvolvimento de algas no meio.

7. Referências Bibliográficas

ADAMS, S.M. Aquatic toxicology testing methods. In: HOFFMAN, D.J; RATTNER, B.A; BURTON JR, G.A; CAIRNS, JR, J. (Org). Handbook of toxicology. Boca Raton: Lewis, 1995, 755p.

ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. Science, v. 2, n. 11, p. 132-138, 1981.

ANP, Biodiesel: O biodiesel obrigatório. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp>>. Acesso em: 15 ago. 2011.

ANP. Resolução nº 19, de 18 de junho de 2009. Estabelece os requisitos necessários à regulação da atividade de rerrefino. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 20 ago. 2011

APROMAC - Associação de Proteção ao Meio Ambiente de Cianorte. Gerenciamento, 2007.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiology, v. 45, n. 1, p.180-209, 1981.

ATLAS, R. M., BARTHA, R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Advances in Microbial Ecology*, v. 12, n. 1, p. 287-338, 1992.

ATLAS, R. M.; HOROWITZ, A.; KRICHEVSKY, M. Response of microbial population to environmental disturbance. Microbial Ecology, v. 22, p.1157-1165, 1991.

BARBOSA, F. A. R.; CALLISTO, M. Rapid assessment of water quality and diversity of benthic macroinvertebrates in the upper and middle Paraguay river using the Aqua-RAP approach. Verh. Internat. Verein. Limnol, v. 27, 2000.

BARBOSA, L. P. **Cultivo de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e sua aplicação na biorremediação de efluentes ácidos contendo metais.** 115 f.

Dissertação (Mestrado em Saneamento Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

BARROS, F. F. C. et al. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. Quím. Nova, São Paulo, v. 30, n. 2, Abr. 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/30.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2011.

BAUDO, R. Ecotoxicological testing with Daphnia. Intit. Ital. Idrobiol, v.45, p.461-482, 1987.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Biorremediation of soil contaminated by diesel oil. Brazilian Journal of Microbiology, v.34, p.65-68, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v34s1/arq22.pdf>>. Acesso em: 05 ago. 2011.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Gêneros de algas continentais do Brasil – Chave para identificações e descrições. 2. ed., São Carlos: Rima, 2006. 489 p.

Biocombustíveis. São Paulo: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2001.

BODOUR, A. A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. Applied and Environmental Microbiology, v. 69, n. 6, p. 3280–3287, 2003.

BRAGG, J. R. et al. Bioremediation effectiveness following the Exxon Valdez spill. Proceeding of the Oil Spill Conference, American Petroleum Institute, v. 1, n. 1, p. 435-447, 1993.

BRASIL, A. Óleo Lubrificante. Revista Meio Ambiente Industrial, Curitiba, v. 6, ed. 31, 2001, p.1.

CHAMUSCA, B. et al. Bactérias Oxidantes de Hidrocarbonetos. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/bacterias-oxidantes-de-hidrocarbonetos-doc-a27646.html>>. Acesso em: 03 abr. 2011.

CHAPMAN, P. M. Emerging substances — Emerging problems?. Environmental Toxicology and Chemistry, v.25, n.6, p.1445-1447, 2006.

COOKSON, J. T. Bioremediation Engineering: design and application. Nova Iorque: McGrawHill Inc, 1995. 525 p.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus*.

COSTA, G. A. N.; Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005.

CRAPEZ, M. A. C. (1982) Isolement à Partir du Sol et Bactéries Aérobiees Sporullées Dégradant Composés Aromatiques. PhD Thesis, Université D'Aix-MarseilleII, França, p. 1-76.

CRAWFORD, R. L., CRAWFORD, D. L. (1996) Bioremediation: principles and applications. Biotechnology Research Series, v.1, p. 1-12.

DIFCO. Difco Manual. Difco Laboratories, Detroit, 1984.

FABIANO, D. P.; ROSA, C. A.; MARCINIUK, L. L.; CARDOSO, D. Simulação da Reação de Esterificação para Obtenção do Biodiesel. Congresso 2007, São Carlos, v.1, p. 1-6, 2007.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. Química Nova, São Paulo, v. 28, n. 1, p.19-23, 2004.

FRANCESCHINI, I.M.; BURLIGA, A.L.; REVIERS, B. de; PRADO, J.F. e RÉZIG S.H. Algas – Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Artmed Editora S.A. 2010.

FOBES, N. National Geographic. Disponível em<<http://ngm.nationalgeographic.com/1990/01/alaska-oil-spill/hodgson-text> >. Acesso em: 2 set. 2011.

GAMAZO, C.; LÓPEZ-GOÑI, I.; DÍAZ, R. Manual Práctico de Microbiología. 3. Ed. Barcelona: Masson, 2005. 264 p.

GAZZONI, D. L. Matérias Primas para Produção de Biodiesel. São Paulo: 2011. p. 64. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/plantas/oleaginosas.htm>> Acesso em: 17 jun. 2011.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. Fuel Processing Technology, v.86, p.1097-1107, 2005.

GOMES, A. P. N. Biodegradação de biodiesel soja, mamona e hidrocarbonetos monoaromáticos em ambientes aquáticos. Universidade Federal de Santa Catarina. p.89, 2008.

GÜLENSOY, N.; ALVAREZ, J. J. Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbon biodegradation capabilities. Biodegradation. v. 10, p. 331-340, 1999.

HAUS, F.; BOISSEL, O.; JENTER, G. A. Primary and ultimate biodegradabilities of mineral base oils and their relationships with oil viscosity. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 54, p. 189-192, 2004.

HIGGINS, I. J.; BURNS, R. G. The chemistry and microbiology of pollution. London: Academic Press Inc, 1975. 248 p.

HOFF, R. Z. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. Marine Pollution Bulletin, v. 26, n. 9, p.476-481, 1993.

HOLT, J. G. et al (Eds.). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9. ed. Filadélfia: The Williams & Wilkins Company, 1999. 787 p.

INAZAKI, T. H. et al. Teste de toxicidade utilizando sementes de *Eruca sativa*. Arquivo do Instituto Biológico, v. 68, p. 1-131, 2001.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

KING, R. LONG, B., GILBERT, M., SHELDON, J. K. Practical Environmental Bioremediation - The Field Guide. V. 1. Nova Iorque: Lewis Publishers Press, 1997. 208 p.

KOWALL, M. et al. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 204, n. 1, p. 1-8, 1998.

LAWS, E.A. Aquatic pollution: an introductory text. 2. ed. Nova Iorque: Interscience publication, John Wiley & Sons, 2000. 624 p.

LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J. ; SHADOMY, H.J. – Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1985.

LIMA, W. L. N. Novos sistemas microemulsionados aplicados na recuperação de óleos usados. Natal: Agência Nacional do Petróleo. p.26, 2004.

LINDSTROM, J. E. et al. Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. Appli. Env. Micro, v. 57, n. 1, p. 2514-2522, 1991.

LOMBARDI, J.V. Fundamentos de toxicologia aquatica. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTA ; R.M.; LIZAMA; M.A.P. (Eds.). Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Org. Livraria Varela, 2004. p. 261-270.

MAGALHÃES, D.P.; FILHO, A.S.F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Oecol. Bras. v.12, n.3, p. 355-381, 2008. Disponível em:
<<http://www.oecologiaaustralis.org/ojs/index.php/oa/article/view/112/38>>. Acesso em: 13 jul. 2011.

MARGENSIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, Oxford, v.40, p.339-346, 2000.

MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 147 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARRAFA, P. R.; AMARO, S.; MENDES, R.; CHAVES, P.; Lourosa, S. LexTec – Léxico Técnico do Português: Ambiente, Instituto Camões, 2005, 1p.

MARSCHNER, A. Biologische Bodensanierung und ihre Erfolgskontrolle durch Biomonitoring. In: Oehlmann, J; Markert, B. (Eds.). *Okotoxikologie-Okosystemare Ansätze und Methoden*. Ecomed, Landsberg: 1999. Pp. 568-576.

MASJUK, H.; SAPUAN, M. S.; J. Am. Oil Chem. Soc. 1995, 12, 609, <<http://www.tecbio.com.br/Downloads/LIVRO%Biodiesel.pdf>>, acessada em Jul. 2011.

MELO, I.S.; SILVA, C.M.M. S.; SCRAMIN, S. e Andréia SPESSOTO, A. Jaguariúna, SP; Embrapa Meio Ambiente, 2001. 440p.

MERLIN, F. X., LEE, K., SWANEEL, R., OUTDOT, J., BASSERES, A., RELLY, T., CHAUFERY, C., DALMAZZONE, C., SVEUM, P. (1994) Protocol for experimental assessment of bioremediation agents on a petroleum polluted shoreline. *Proceeding of the 17 th Arctic and Marine Oilspill Program (AMOP) Technical Seminar*, 1:465-478.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. International Biodeterioration & Biodegradation, v.63, n. 3, p. 297-305, 2009.

MONYEM, A.; VAN GERPEN, J. H.; *Biomass & Bioenergy* 2001, 20, 317.

MULLIGAN, C. N.; YOUNG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant enhanced remediation of contaminated soil: a review. Eng. Geol., v. 60, p. 371-380, 2001.

NAKANO, O.; NETO, S.S.; ZUCCHI, R.A. **Entomologia econômica**. Piracicaba: Livroceres, 1981. 314p.

NASA- National Aeronautics and Space Administration. Building a Winogradsky Column. Educational Product, Estados Unidos, 2001. Acessado em 11 abr. 2011.

PARRA, O. O.; BICUDO, C. E. M. Introducción a la biología y sistemática de las algas de águas continentales. Concepción: Ediciones Universidad de Concepción, 1995. 268 p.

PEREZ, J. P. L. La columna de Winogradsky: um exemplo de microbiologia básica em um laboratório de educação secundaria. Revista Eureka Enseñanza y Divulgación Científica, Cadiz, v. 5, n. 3, p. 373-376, 2008.

PORTER, M. R. Waters Recent Developments in the Analysis of Surfactants. Elsevier, Londres, v. 32, p. 606–615, 1991.

PRPICH, G. P.; DAUGULIS, A. J. Enhanced biodegradation of fenol by a microbial consortium in a solid-liquid two phase partitioning bioreactor. Biodegradation, v. 16, p. 329-339, 2005.

RAHMAN, K. S. M. et al. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Bioresource Technol., v. 90, p.159-168, 2003.

RAMADE, F. Ecotoxicologie. Paris: Masson, 1997.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application. London: Hemisphere Publishing Corporation, 1985.

RYTKONEN, J., ITAVAARA, M., PAULSEN, J. E. (1997) The Improvement of oil biodegradation on the shoreline. Proceedings of the 7 th International Offshore and Polar Engineering Conference, Honolulu, USA, 2(1):25-30.

SALMINEN, J. M. et al. Potencial for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface. Biodegradation, v. 15, p. 29-39, 2004.

SANTAS, R. et al. Mesocosm assays of oil spill bioremediation with oleophilic fertilizers: Inipol, F1. Marine Pollution Bulletin, v. 38, n. 1, p. 44-48, 1999.

SCHVARTSMAN, S. Intoxicações agudas. 4, ed. Sao Paulo: Sarvier, 1991.

SILVA, E. M. P. e SAKATSUME, F. A Política Brasileira de Biocombustíveis. São Paulo: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2001.

SILVEIRA, E. L. C. et al.. Determinação de contaminantes em óleos lubrificantes usados e em esgotos contaminados por esses lubrificantes. Química Nova, São Paulo, v.29, nº 6, p. 1193- 1197, 2006.

SLIVINS, A., TREMIER, B. (1985) La biodégradation des hydrocarbures. La Recherche, 171(16):1344-1352.

SOARES, A.M.V.M. Ecotoxicologia e Determinação de Riscos Ecológicos. Prática e Perspectivas. In: CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE, 2., 1990, Lisboa, Anais. Lisboa: Universidade de Lisboa, 1990, p. 43-52.

SOHN, H. Gerenciamento de Óleos Lubrificantes Usados ou Contaminados. Curitiba: Ciapress Editora, 2009. 64 p.

SOUSA, M.L.; Moraes, P.B.; Lopes, P.R.M.; Montagnolli, R.N.; Angelis, D.F.; Bidoia, E.D. Textile dye treated photoelectrolytically and monitored by Winogradsky columns. Environmental Engineering Science, 2011 - In press.

SOUZA, C. A. Sistemas catalíticos na produção de biodiesel por meio de óleo residual. Encontro de Energia no Meio Rural, Agrener, 2006, Campinas.

SOUZA, R. M. Determinação de elementos refratários em óleo lubrificante usado e em óleo combustível por ICP OES após emulsificação da amostra. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio, 2003, 121p.

STEPHAN, C.E.; MOUNT, D.I. Use of toxicity tests with fish in water pollution control. In, Biological Methods for the Assessment of Water Quality, ASTM STP 528. Am. Soc. Testing and materials. Philadelphia, Pa. 1973.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. 70º aniversário do biodiesel em 2007: evolução histórica e situação atual no Brasil. Revista Química Nova, São Paulo, v. 30, p. 2068-2071, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n8/a47v30n8.pdf>>. Acesso em: 29 ago. 2011.

TODAR, Kenneth. Todar's Online Textbook of Bacteriology - the genus bacillus. Wiscosin, 2011. Disponível em: < <http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>>. Acesso em: 4 jul. 2011.

Trainor, F.R. Em *Algae as Ecological Indicators*; Shubert, L. E., ed.; Academic Press: UK, 1983, p.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.1, p. 151-173, 1977.

URURAHY, A. F. P. et al. Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. Rev. Microbiol., São Paulo, v.29, p.254-258, 1998.

USEPA. U.S. Environmental Protection Agency. 1988. Water Quality Standards Criteria Summaries: A Compilation of State/Federal Criteria. EPA 440/5-88-007.

VIDOTTI, E. C. ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. Quím. Nova, São Paulo, v. 27, n. 1, 2004.

WOLFE, D. A. et al. The fate of the oil spilled from the Exxon Valdez. Environmental Science Technology, v. 13, n. 28, p. 561-568, 1994.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações. 1. ed. São Carlos: Editora Rima, 2006. 478 p.

8- ANEXOS

8.1- ANEXO A- Resolução CONAMA nº. 362/2005

Resoluções

Publicado no DOU em 27/06/2005, Seção 01, páginas 128, 129 e 130, Edição Número 121

Ministério do Meio Ambiente Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA

RESOLUÇÃO N o 362, DE 23 DE JUNHO DE 2005

O CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA, no uso das competências que lhe são conferidas pela Lei 6.938, de 31 de agosto de 1981, regulamentada pelo Decreto nº 99.274, de 6 de junho de 1990, tendo em vista o disposto em seu Regimento Interno, anexo à Portaria nº 499, de 18 de dezembro de 2002, e:

Considerando que o uso prolongado de um óleo lubrificante acabado resulta na sua deterioração parcial, que se reflete na formação de compostos tais como ácidos orgânicos, compostos aromáticos polinucleares potencialmente carcinogênicos, resinas e lacas;

Considerando que a Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT, em sua NBR-10004, "Resíduos Sólidos - classificação", classifica o óleo lubrificante usado como resíduo perigoso por apresentar toxicidade;

Considerando que o descarte de óleo lubrificante usado ou contaminado para o solo ou cursos de água gera graves danos ambientais;

Considerando que a combustão de óleos lubrificantes usados gera gases residuais nocivos ao meio ambiente e à saúde pública;

Considerando que a categoria de processos tecnológico-industriais chamada genericamente de rerrefino, corresponde ao método ambientalmente mais seguro para a reciclagem do óleo lubrificante usado ou contaminado, e, portanto, a melhor alternativa de gestão ambiental deste tipo de resíduo; e

Considerando a necessidade de estabelecer novas diretrizes para o recolhimento e destinação de óleo lubrificante usado ou contaminado, resolve:

Art. 1º

Todo óleo lubrificante usado ou contaminado deverá ser recolhido, coletado e ter destinação final, de modo que não afete negativamente o meio ambiente e propicie a máxima recuperação dos constituintes nele contidos, na forma prevista nesta Resolução.

Art. 2º

Para efeito desta Resolução serão adotadas as seguintes definições:

I - coletor: pessoa jurídica devidamente autorizada pelo órgão regulador da indústria do petróleo e licenciada pelo órgão ambiental competente para realizar atividade de coleta de óleo lubrificante usado ou contaminado;

II - coleta: atividade de retirada do óleo usado ou contaminado do seu local de recolhimento e de transporte até à destinação ambientalmente adequada;

III - certificado de coleta: documento previsto nas normas legais vigentes que comprova os volumes de óleos lubrificantes usados ou contaminados coletados;

IV - certificado de recebimento: documento previsto nas normas legais vigentes que comprova a entrega do óleo lubrificante usado ou contaminado do coletor para o rerrefinador;

V - gerador: pessoa física ou jurídica que, em decorrência de sua atividade, gera óleo lubrificante usado ou contaminado;

VI - importador: pessoa jurídica que realiza a importação do óleo lubrificante acabado, devidamente autorizada para o exercício da atividade;

VII - óleo lubrificante básico: principal constituinte do óleo lubrificante acabado, que atenda a legislação pertinente;

VIII - óleo lubrificante acabado: produto formulado a partir de óleos lubrificantes básicos, podendo conter aditivos;

IX - óleo lubrificante usado ou contaminado: óleo lubrificante acabado que, em decorrência do seu uso normal ou por motivo de contaminação, tenha se tornado inadequado à sua finalidade original;

X produtor: pessoa jurídica responsável pela produção de óleo lubrificante acabado em instalação própria ou de terceiros, devidamente licenciada pelo órgão ambiental competente, e autorizada para o exercício da atividade pelo órgão regulador da indústria do petróleo;

XI - reciclagem: processo de transformação do óleo lubrificante usado ou contaminado, tornando-o insumo destinado a outros processos produtivos;

XII - recolhimento: é a retirada e armazenamento adequado do óleo usado ou

contaminado do equipamento que o utilizou até o momento da sua coleta, efetuada pelo revendedor ou pelo próprio gerador;

XIII - rerrefinador: pessoa jurídica, responsável pela atividade de rerrefino, devidamente autorizada pelo órgão regulador da indústria do petróleo para a atividade de rerrefino e licenciada pelo órgão ambiental competente;

XIV - rerrefino: categoria de processos industriais de remoção de contaminantes, produtos de degradação e aditivos dos óleos lubrificantes usados ou contaminados, conferindo aos mesmos características de óleos básicos, conforme legislação específica;

XV - revendedor: pessoa jurídica que comercializa óleo lubrificante acabado no atacado e no varejo tais como: postos de serviço, oficinas, supermercados, lojas de autopeças, atacadistas, etc; e

XVI - águas interiores: as compreendidas entre a costa e as linhas de base reta, a partir das quais se mede a largura do mar territorial; as dos portos; as das baías; as dos rios e de seus estuários; as dos lagos, lagoas e canais, e as subterrâneas.

Art. 3º Todo o óleo lubrificante usado ou contaminado coletado deverá ser destinado à reciclagem por meio do processo de rerrefino.

§ 1º A reciclagem referida no caput poderá ser realizada, a critério do órgão ambiental competente, por meio de outro processo tecnológico com eficácia ambiental comprovada equivalente ou superior ao rerrefino.

§ 2º Será admitido o processamento do óleo lubrificante usado ou contaminado para a fabricação de produtos a serem consumidos exclusivamente pelos respectivos geradores industriais.

§ 3º Comprovada, perante ao órgão ambiental competente, a inviabilidade de destinação prevista no caput e no § 1º deste artigo, qualquer outra utilização do óleo lubrificante usado ou contaminado dependerá do licenciamento ambiental.

§ 4º Os processos utilizados para a reciclagem do óleo lubrificante deverão estar devidamente licenciados pelo órgão ambiental competente.

Art.4º Os óleos lubrificantes utilizados no Brasil devem observar, obrigatoriamente, o princípio da reciclabilidade.

Art. 5º O produtor, o importador e o revendedor de óleo lubrificante acabado, bem como o gerador de óleo lubrificante usado, são responsáveis pelo recolhimento do óleo lubrificante usado ou contaminado, nos limites das atribuições previstas nesta Resolução.

Art. 6º O produtor e o importador de óleo lubrificante acabado deverão coletar ou garantir a coleta e dar a destinação final ao óleo lubrificante usado ou contaminado, em conformidade com esta Resolução, de forma proporcional em relação ao volume total de óleo lubrificante acabado que tenham comercializado.

§ 1º Para o cumprimento da obrigação prevista no caput deste artigo, o produtor e o importador poderão:

I - contratar empresa coletora regularmente autorizada junto ao órgão regulador da indústria do petróleo; ou

II - habilitar-se como empresa coletora, na forma da legislação do órgão regulador da indústria do petróleo.

§ 2º A contratação de coletor terceirizado não exonera o produtor ou importador da responsabilidade pela coleta e destinação legal do óleo usado ou contaminado coletado.

§ 3º Respondem o produtor e o importador, solidariamente, pelas ações e omissões dos coletores que contratarem.

Art. 7º Os produtores e importadores são obrigados a coletar todo óleo disponível ou garantir o custeio de toda a coleta de óleo lubrificante usado ou contaminado efetivamente realizada, na proporção do óleo que colocarem no mercado conforme metas progressivas intermediárias e finais a serem estabelecidas pelos Ministérios de Meio Ambiente e de Minas e Energia em ato normativo conjunto, mesmo que superado o percentual mínimo fixado.

Parágrafo único. Os órgãos referidos no caput deverão estabelecer, ao menos anualmente, o percentual mínimo de coleta de óleos lubrificantes usados ou contaminados, não inferior a 30% (trinta por cento), em relação ao óleo lubrificante acabado comercializado, observado o seguinte:

I análise do mercado de óleos lubrificantes acabados, na qual serão considerados os dados dos últimos três anos;

II - tendência da frota nacional quer seja rodoviária, ferroviária, naval ou aérea;

III - tendência do parque máquinas industriais consumidoras de óleo, inclusive agroindustriais;

IV - capacidade instalada de rerrefino;

V - avaliação do sistema de recolhimento e destinação de óleo lubrificante usado ou contaminado;

VI - novas destinações do óleo lubrificante usado ou contaminado, devidamente autorizadas;

VII - critérios regionais; e

VIII - as quantidades de óleo usado ou contaminado efetivamente coletadas.

Art. 8º O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA, o órgão regulador da indústria do petróleo e o órgão estadual de meio ambiente, este, quando solicitado, são responsáveis pelo controle e verificação do exato cumprimento dos percentuais de coleta fixados pelos Ministérios do Meio Ambiente e de Minas e Energia. Parágrafo único. Para a realização do controle de que trata o caput deste artigo, o IBAMA terá como base as informações relativas ao trimestre civil anterior.

Art. 9º O Ministério do Meio Ambiente, na primeira reunião ordinária do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA de cada ano, apresentará o percentual mínimo de coleta de óleo lubrificante usado ou contaminado, acompanhado de relatório justificativo detalhado, e o IBAMA apresentará relatório sobre os resultados da implementação desta Resolução.

Art. 10. Não integram a base de cálculo da quantia de óleo lubrificante usado ou contaminado a ser coletada pelo produtor ou importador os seguintes óleos lubrificantes acabados:

I - destinados à pulverização agrícola;

II - para correntes de moto-serra;

III - industriais que integram o produto final, não gerando resíduo;

IV - de estampagem;

V - para motores dois tempos;

VI - destinados à utilização em sistemas selados que não exijam troca ou que impliquem em perda total do óleo;

VII - solúveis;

VIII - fabricados à base de asfalto;

IX - destinados à exportação, incluindo aqueles incorporados em máquinas e equipamentos destinados à exportação; e

X - todo óleo lubrificante básico ou acabado comercializado entre as empresas produtoras, entre as empresas importadoras, ou entre produtores e importadores, devidamente autorizados pela Agência Nacional do Petróleo-ANP.

Art. 11. O Ministério do Meio Ambiente manterá e coordenará grupo de monitoramento permanente para o acompanhamento desta Resolução, que deverá

se reunir ao menos trimestralmente, ficando assegurada a participação de representantes do órgão regulador da indústria do petróleo, dos produtores e importadores, dos revendedores, dos coletores, dos rerrefinadores, das entidades representativas dos órgãos ambientais estaduais e municipais e das organizações não governamentais ambientalistas.

Art. 12. Ficam proibidos quaisquer descartes de óleos usados ou contaminados em solos, subsolos, nas águas interiores, no mar ritorial, na zona econômica exclusiva e nos sistemas de esgoto ou evacuação de águas residuais.

Art. 13. Para fins desta Resolução, não se entende a combustão ou incineração de óleo lubrificante usado ou contaminado como formas de reciclagem ou de destinação adequada.

Art. 14. No caso dos postos de revenda flutuantes que atendam embarcações, o gerenciamento do óleo lubrificante usado ou contaminado deve atender a legislação ambiental vigente.

Art. 15. Os óleos lubrificantes usados ou contaminados não rerrefináveis, tais como as emulsões oleosas e os óleos biodegradáveis, devem ser recolhidos e eventualmente coletados, em separado, segundo sua natureza, sendo vedada a sua mistura com óleos usados ou contaminados rerrefináveis.

Parágrafo único. O resultado da mistura de óleos usados ou contaminados não rerrefináveis ou biodegradáveis com óleos usados ou contaminados rerrefináveis é considerado integralmente óleo usado ou contaminado não rerrefinável, não biodegradável e resíduo perigoso (classe I), devendo sofrer destinação ou disposição final compatível com sua condição.

Art. 16. São, ainda, obrigações do produtor e do importador:

I - garantir, mensalmente, a coleta do óleo lubrificante usado ou contaminado, no volume mínimo fixado pelos Ministérios do Meio Ambiente e de Minas e Energia, que será calculado com base no volume médio de venda dos óleos lubrificantes acabados, verificado no trimestre civil anterior.

II - prestar ao IBAMA e, quando solicitado, ao órgão estadual de meio ambiente, até o décimo quinto dia do mês subsequente a cada trimestre civil, conforme previsto no Anexo I desta Resolução, informações mensais relativas aos volumes de:

- a) óleos lubrificantes comercializados por tipo, incluindo os dispensados de coleta;
- b) coleta contratada, por coletor; e

c) óleo básico rerrefinado adquirido, por rerrefinador.

III receber os óleos lubrificantes usados ou contaminados não recicláveis decorrentes da utilização por pessoas físicas, e destiná-los a processo de tratamento aprovado pelo órgão ambiental competente;

IV - manter sob sua guarda, para fins fiscalizatórios, os Certificados de Recebimento emitidos pelo rerrefinador e demais documentos legais exigíveis, pelo prazo de cinco anos;

V - divulgar, em todas as embalagens de óleos lubrificantes acabados, bem como em informes técnicos, a destinação e a forma de retorno dos óleos lubrificantes usados ou contaminados recicláveis ou não, de acordo com o disposto nesta Resolução;

VI - a partir de um ano da publicação desta resolução, divulgar em todas as embalagens de óleos lubrificantes acabados, bem como na propaganda, publicidade e em informes técnicos, os danos que podem ser causados à população e ao ambiente pela disposição inadequada do óleo usado ou contaminado.

§ 1º O produtor ou o importador que contratar coletor terceirizado deverá celebrar com este contrato de coleta, com a interveniência do responsável pela destinação adequada.

§ 2º Uma via do contrato de coleta previsto no parágrafo anterior será arquivada, à disposição do órgão estadual ambiental, onde o contratante tiver a sua sede principal, por um período mínimo de cinco anos, da data de encerramento do contrato.

Art. 17. São obrigações do revendedor:

I - receber dos geradores o óleo lubrificante usado ou contaminado;

II - dispor de instalações adequadas devidamente licenciadas pelo órgão ambiental competente para a substituição do óleo usado ou contaminado e seu recolhimento de forma segura, em lugar acessível à coleta, utilizando recipientes propícios e resistentes a vazamentos, de modo a não contaminar o meio ambiente;

III - adotar as medidas necessárias para evitar que o óleo lubrificante usado ou contaminado venha a ser misturado com produtos químicos, combustíveis, solventes, água e outras substâncias, evitando a inviabilização da reciclagem;

IV - alienar os óleos lubrificantes usados ou contaminados exclusivamente ao coletor, exigindo:

a) a apresentação pelo coletor das autorizações emitidas pelo órgão ambiental competente e pelo órgão regulador da indústria do petróleo para a atividade de coleta;

b) a emissão do respectivo certificado de coleta.

V - manter para fins de fiscalização, os documentos comprobatórios de compra de óleo lubrificante acabado e os Certificados de Coleta de óleo lubrificante usado ou contaminado, pelo prazo de cinco anos;

VI - divulgar em local visível ao consumidor, no local de exposição do óleo acabado posto à venda, a destinação disciplinada nesta Resolução, na forma do Anexo III; e

VII manter cópia do licenciamento fornecido pelo órgão ambiental competente para venda de óleo acabado, quando aplicável, e do recolhimento de óleo usado ou contaminado em local visível ao consumidor.

Art. 18. São obrigações do gerador:

I - recolher os óleos lubrificantes usados ou contaminados de forma segura, em lugar acessível à coleta, em recipientes adequados e resistentes a vazamentos, de modo a não contaminar o meio ambiente;

II adotar as medidas necessárias para evitar que o óleo lubrificante usado ou contaminado venha a ser misturado com produtos químicos, combustíveis, solventes, água e outras substâncias, evitando a inviabilização da reciclagem;

III alienar os óleos lubrificantes usados ou contaminados exclusivamente ao ponto de recolhimento ou coletor autorizado, exigindo:

a) a apresentação pelo coletor das autorizações emitidas pelo órgão ambiental competente e pelo órgão regulador da indústria do petróleo para a atividade de coleta;

b) a emissão do respectivo Certificado de Coleta.

IV - fornecer informações ao coletor sobre os possíveis contaminantes contidos no óleo lubrificante usado, durante o seu uso normal;

V - manter para fins de fiscalização, os documentos comprobatórios de compra de óleo lubrificante acabado e os Certificados de Coleta de óleo lubrificante usado ou contaminado, pelo prazo de cinco anos;

VI no caso de pessoa física, destinar os óleos lubrificantes usados ou contaminados não recicláveis de acordo com a orientação do produtor ou do importador; e

VII - no caso de pessoa jurídica, dar destinação final adequada devidamente autorizada pelo órgão ambiental competente aos óleos lubrificantes usados ou contaminados não recicláveis.

§ 1º Os óleos usados ou contaminados provenientes da frota automotiva devem preferencialmente ser recolhidos nas instalações dos revendedores.

§ 2º Se inexistirem coletores que atendam diretamente os geradores, o óleo lubrificante usado ou contaminado poderá ser entregue ao respectivo revendedor.

Art. 19 São obrigações do coletor:

I - firmar contrato de coleta com um ou mais produtores ou importadores com a interveniência de um ou mais rerrefinadores, ou responsável por destinação ambientalmente adequada, para os quais necessariamente deverá entregar todo o óleo usado ou contaminado que coletar;

II - disponibilizar, quando solicitado pelo órgão ambiental competente, pelo prazo de cinco anos, os contratos de coleta firmados;

III - prestar ao IBAMA e, quando solicitado, ao órgão estadual de meio ambiente, até o décimo quinto dia do mês subsequente, a cada trimestre civil, na forma do Anexo II, informações mensais relativas ao volume de:

- a) óleo lubrificante usado ou contaminado coletado, por produtor/importador; e
- b) óleo lubrificante usado ou contaminado entregue por rerrefinador ou responsável por destinação ambientalmente adequada.

IV- emitir a cada aquisição de óleo lubrificante usado ou contaminado, para o gerador ou revendedor, o respectivo Certificado de Coleta;

V - garantir que as atividades de armazenamento, manuseio, transporte e transbordo do óleo lubrificante usado ou contaminado coletado, sejam efetuadas em condições adequadas de segurança e por pessoal devidamente treinado, atendendo à legislação pertinente e aos requisitos do licenciamento ambiental;

VI adotar as medidas necessárias para evitar que o óleo lubrificante usado ou contaminado venha a ser misturado com produtos químicos, combustíveis, solventes, água e outras substâncias, evitando a inviabilização da reciclagem;

VII - destinar todo o óleo lubrificante usado ou contaminado coletado, mesmo que excedente de cotas pré-fixadas, a rerrefinador ou responsável por destinação ambientalmente adequada interveniente em contrato de coleta que tiver firmado, exigindo os correspondentes Certificados de Recebimento, quando aplicável;

VIII - manter atualizados os registros de aquisições, alienações e os documentos legais, para fins fiscalizatórios, pelo prazo de cinco anos; e

IX - respeitar a legislação relativa ao transporte de produtos perigosos.

Art. 20. São obrigações dos rerrefinadores:

I - receber todo o óleo lubrificante usado ou contaminado exclusivamente do coletor, emitindo o respectivo Certificado de Recebimento;

II - manter atualizados e disponíveis para fins de fiscalização os registros de emissão de Certificados de Recebimento, bem como outros documentos legais exigíveis, pelo prazo de cinco anos;

III - prestar ao IBAMA e, quando solicitado, ao órgão estadual de meio ambiente, até o décimo quinto dia do mês subsequente a cada trimestre civil, informações mensais relativas:

a) ao volume de óleos lubrificantes usados ou contaminados recebidos por coletor;

b) ao volume de óleo lubrificante básico rerrefinado produzido e comercializado, por produtor/ importador.

§ 1º Os óleos básicos procedentes do rerrefino deverão se enquadrar nas normas estabelecidas pelo órgão regulador da indústria do petróleo e não conter substâncias proibidas pela legislação ambiental.

§ 2º O rerrefinador deverá adotar a política de geração mínima de resíduos inservíveis no processo de rerrefino.

§ 3º O resíduo inservível gerado no processo de rerrefino será considerado como resíduo classe I, salvo comprovação em contrário com base em laudos de laboratórios devidamente credenciados pelo órgão ambiental competente.

§ 4º Os resíduos inservíveis gerados no processo de rerrefino deverão ser inertizados e receber destinação adequada e aprovada pelo órgão ambiental competente.

§ 5º O processo de licenciamento da atividade de rerrefino, além do exigido pelo órgão estadual de meio ambiente, deverá conter informações sobre:

a) volumes de outros materiais utilizáveis resultantes do processo de rerrefino;

b) volumes de resíduos inservíveis gerados no processo de rerrefino, com a indicação da correspondente composição química média; e

c) volume de perdas no processo.

Art. 21. São obrigações dos demais recicladores, nos processos de reciclagem previstos no art. 3º, desta Resolução:

I - prestar ao IBAMA e, quando solicitado, ao órgão estadual de meio ambiente, até o décimo quinto dia do mês subsequente a cada trimestre civil, informações mensais relativas:

- a) ao volume de óleos lubrificantes usados ou contaminados recebidos;
- b) ao volume de produtos resultantes do processo de reciclagem.

§ 1º O reciclador deverá adotar a política de geração mínima de resíduos inservíveis no processo de reciclagem.

§ 2º O resíduo inservível gerado no processo de reciclagem será considerado como resíduo classe I, salvo comprovação em contrário com base em laudos de laboratórios devidamente credenciados pelo órgão ambiental competente.

§ 3º Os resíduos inservíveis gerados no processo de reciclagem deverão ser inertizados e receber destinação adequada e aprovada pelo órgão ambiental competente.

§ 4º O processo de licenciamento da atividade de reciclagem, além do exigido pelo órgão estadual de meio ambiente, deverá conter informações sobre:

- a) volumes de outros materiais utilizáveis resultantes do processo de reciclagem;
- b) volumes de resíduos inservíveis gerados no processo de reciclagem, com a indicação da correspondente composição química média;
- c) volume de perdas no processo.

Art. 22. O não cumprimento ao disposto nesta Resolução acarretará aos infratores, entre outras, as sanções previstas na Lei n o 9.605, 12 de fevereiro de 1998, e no Decreto n o 3.179, de 22 de setembro de 1999.

Art. 23. As obrigações previstas nesta Resolução são de relevante interesse ambiental.

Art. 24. A fiscalização do cumprimento das obrigações previstas nesta Resolução e aplicação das sanções cabíveis é de responsabilidade do IBAMA e do órgão estadual e municipal de meio ambiente, sem prejuízo da competência própria do órgão regulador da indústria do petróleo.

Art. 25. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 26. Fica revogada a Resolução CONAMA n o 9, de 31 de agosto de 1993.

MARINA SILVA

ANEXO I

INFORMAÇÕES DOS PRODUTORES E IMPORTADORES

Os produtores e/ou importadores deverão prestar trimestralmente ao IBAMA as informações constantes nas Tabelas I, II e III deste anexo, até o 15º dia útil do mês imediatamente subsequente ao período de tempo considerado.

TABELA I

Produtor e/ou importador :

CNPJ:

Ano:

Discriminação de cada produto fabricado ou importado pelo nº registro na ANP		Volume comercializado (m³)			Total trimestre (m³)
		Mês:	Mês:	Mês:	
Total					
Total Volume dispensado de coleta (m³)					
Nº Registro ANP	Uso preponderante				
Total					

TABELA II

Mês/ano	Coleta contratada (m³)	Coletor	CNPJ
Total			
Total			

TABELA III

Mês/ano	Volume Adquirido (m³)	Rerrefinador (CNPJ)
Total		
Total		

Sendo:

Volume comercializado = o volume (em m³) comercializado de óleo lubrificante acabado em cada mês do trimestre relativo para todos os óleos que compõem a sua linha de produção e/ou importação, devidamente discriminados pelo número de registro na Agência Nacional do Petróleo-ANP.

Volume dispensado de coleta = o volume (em m³) comercializado de todos os óleos dispensáveis de coleta que compõem sua linha de produção e/ou importação, devidamente discriminados pelo número de registro na Agência

Nacional do Petróleo-ANP, classificados pelo seu uso/destinação principal de acordo com a informação contida no artigo.

Volume coletado = volume (em m³) de óleo lubrificante usado ou contaminado coletado em cada mês do trimestre considerado

Volume enviado ao rerrefino = o volume (em m³) de óleo lubrificante usado ou contaminado, em cada mês do trimestre considerado, enviado a cada rerrefinador, identificado pelo seu respectivo Cadastro Nacional de Pessoa JurídicaCNPJ.

Volume adquirido = o volume (em m³) de óleo lubrificante básico adquirido, em cada mês do trimestre considerado, oriundo da operação de rerrefino, devidamente identificado em cada rerrefinador, por meio de seu CNPJ.

As empresas rerrefinadoras deverão prestar trimestralmente ao IBAMA as informações constantes nas Tabelas IV e V, deste anexo, até o décimo quinto dia útil do mês imediatamente subsequente ao período de tempo considerado. 76

TABELA IV

Rerrefinador:

CNPJ:

Mês/ano	Volume Recebido (m ³)	Coletor (CNPJ)
Total		
Total		

TABELA V

Mês/ano	Volume Rerrefinado Acabado (m³)		Produtor e/ou Importador (CNPJ)
	Produzido	Comercializado	
Total			
Total			

Sendo:

Volume Recebido = o volume (em m³) de óleo lubrificante usado ou contaminado recebido da operação de coleta, em cada mês do trimestre considerado, e enviado a cada produtor e/ou importador, identificado pelo respectivo CNPJ.

Volume Rerrefinado Acabado = o volume (em m³) de óleo lubrificante rerrefinado acabado, em cada mês do trimestre considerado, enviado a cada produtor e/ou importador, identificado pelo respectivo CNPJ.

O IBAMA disponibilizará anualmente relatórios específicos onde constarão os percentuais atingidos por produtor e/ou importador, relativos a coleta de óleo lubrificante usado ou contaminado e ao óleo lubrificante acabado comercializado pelo site menu relatórios.

ANEXO II

INFORMAÇÕES DOS COLETORES

Os Coletores deverão prestar trimestralmente ao IBAMA as informações constantes deste Anexo, Tabelas I e II até o décimo quinto dia útil do mês imediatamente subsequente ao período de tempo considerado.

Coletor

CNPJ nº

Registro na ANP nº

Ano

TABELA I

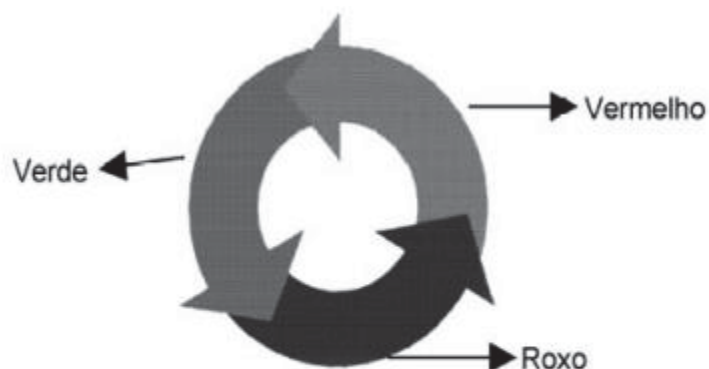
Mês/ano	Volume coletado (m³)	Produtor/Importador	(CNPJ)
Total			
Total			

TABELA II

Mês/ano	Volume entregue (m³)	Rerrefinador	(CNPJ)
Total			
Total			

ANEXO III

MODELO DE ALERTA PARA AS EMBALAGENS DE ÓLEO E PONTOS DE REVENDA



ATENÇÃO O ÓLEO LUBRIFICANTE APÓS SEU USO É UM RESÍDUO PERIGOSO

O óleo lubrificante usado quando é descartado no meio ambiente provoca impactos ambientais negativos, tais como : contaminação dos corpos de água, contaminação do solo por metais pesados .

O produtor, importador e revendedor de óleo lubrificante, bem como o consumidor de óleo lubrificante usado, são responsáveis pelo seu recolhimento e sua destinação.

Senhor Consumidor: retorne o óleo lubrificante usado ao revendedor.

O não cumprimento da Resolução CONAMA acarretará aos infratores as sanções previstas na Lei nº 9.605 de 12 de fevereiro de 1998 e no Decreto nº 3.179, de 22 de setembro de 1999.

8.2- ANEXO B- Resolução nº. 7 – Agência Nacional do Petróleo (ANP)

RESOLUÇÃO ANP Nº 7, DE 19.3.2008 - DOU 20.3.2008

O DIRETOR-GERAL da AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP, no uso de suas atribuições,

Considerando o disposto no inciso I, art. 8º da Lei nº 9.478, de 6 de agosto de 1997, alterada pela Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005 e com base na Resolução de Diretoria nº 207, de 19 de março de 2008,

Considerando o interesse para o País em apresentar sucedâneos para o óleo diesel;

Considerando a Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005, que define o biodiesel como um combustível para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão, renovável e biodegradável, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil;

Considerando as diretrizes emanadas pelo Conselho Nacional de Política Energética – CNPE, quanto à produção e ao percentual de biodiesel na mistura óleo diesel/biodiesel a ser comercializado; e

Considerando a necessidade de estabelecer as normas e especificações do combustível para proteger os consumidores, resolve:

Art. 1º Fica estabelecida no Regulamento Técnico ANP, parte integrante desta Resolução, a especificação do biodiesel a ser comercializado pelos diversos agentes econômicos autorizados em todo o território nacional.

Parágrafo único. O biodiesel deverá ser adicionado ao óleo diesel na proporção de 4%, em volume, a partir de 1º de julho de 2009.

(Nota)

Art. 2º Para efeitos desta Resolução, define-se:

I – biodiesel – B100 – combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais conforme a especificação contida no Regulamento Técnico, parte integrante desta Resolução;

II – mistura óleo diesel/biodiesel – BX – combustível comercial composto de (100-X)% em volume de óleo diesel, conforme especificação da ANP, e X% em volume do biodiesel, que deverá atender à regulamentação vigente;

III – mistura autorizada óleo diesel/biodiesel – combustível composto de biodiesel e óleo diesel em proporção definida quando da autorização concedida para uso experimental ou para uso específico conforme legislação específica;

IV – produtor de biodiesel – pessoa jurídica autorizada pela ANP para a produção de biodiesel;

V – distribuidor – pessoa jurídica autorizada pela ANP para o exercício da atividade de distribuição de combustíveis líquidos derivados de petróleo, álcool combustível, biodiesel, mistura óleo diesel/biodiesel especificada ou autorizada pela ANP e outros combustíveis automotivos;

VI – batelada – quantidade segregada de produto em um único tanque que possa ser caracterizada por um "Certificado da Qualidade".

Art. 3º O biodiesel só poderá ser comercializado pelos Produtores, Importadores e Exportadores de biodiesel, Distribuidores e Refinarias autorizadas pela ANP.

§ 1º Somente os Distribuidores e as Refinarias autorizados pela ANP poderão proceder mistura óleo diesel/biodiesel para efetivar sua comercialização.

§ 2º É vedada a comercialização do biodiesel diretamente de produtores, importadores ou exportadores a revendedores.

Art. 4º Os Produtores e Importadores de biodiesel deverão manter sob sua guarda, pelo prazo mínimo de 2 (dois) meses a contar da data da comercialização do produto, uma amostra-testemunha, de 1 (um) litro, referente à batelada do produto comercializado, armazenado em embalagem apropriada de 1 (um) litro de capacidade, fechada com batoque e tampa plástica com lacre, que deixe evidências em caso de violação, mantida em local protegido de luminosidade e acompanhada de Certificado da Qualidade.

§ 1º O Certificado da Qualidade deverá indicar a data de produção, as matérias-primas utilizadas para obtenção do biodiesel, suas respectivas proporções e observar todos os itens da especificação constante do Regulamento Técnico, bem como ser firmado pelo responsável técnico pelas análises laboratoriais efetivadas, com a indicação legível de seu nome e número da inscrição no órgão de classe.

§ 2º O produto somente poderá ser liberado para a comercialização após a sua certificação, com a emissão do respectivo Certificado da Qualidade, que deverá acompanhar o produto.

§ 3º Após a data de análise de controle de qualidade da amostra, constante do Certificado da Qualidade, se o produto não for comercializado no prazo máximo

de 1 (um) mês, deverá ser novamente analisada a massa específica a 20°C. Caso a diferença encontrada com relação à massa específica a 20°C do Certificado da Qualidade seja inferior a 3,0 kg/m³, deverão ser novamente avaliadas o teor de água, o índice de acidez e a estabilidade à oxidação a 110°C. Caso a diferença seja superior a 3,0 kg/m³, deverá ser realizada a recertificação completa segundo esta Resolução.

§ 4º As análises constantes do Certificado da Qualidade só poderão ser realizadas em laboratório próprio do produtor ou contratado, os quais deverão ser cadastrados pela ANP conforme Resolução ANP nº 31 de 21 de outubro de 2008.

(Nota)

§ 5º (Revogado).

(Nota)

§ 6º No caso de certificação do biodiesel utilizando laboratório próprio e contratado, o Produtor deverá emitir Certificado da Qualidade único, agrupando todos os resultados que tenha recebido do laboratório cadastrado pela ANP. Esse Certificado deverá indicar o laboratório responsável por cada ensaio.

§ 7º A amostra-testemunha e seu Certificado da Qualidade deverão ficar à disposição da ANP para qualquer verificação julgada necessária, pelo prazo mínimo de 2 meses e 12 meses, respectivamente.

§ 8º Os Produtores deverão enviar à ANP, até o 15º (décimo quinto) dia do mês, os dados de qualidade constantes dos Certificados da Qualidade, emitidos no mês anterior, com a devida indicação do material graxo e álcool usados para a produção do biodiesel certificado.

§ 9º Os Produtores deverão enviar à ANP, até 15 (quinze) dias após o final de cada trimestre civil, os resultados de uma análise completa (considerando todas as características e métodos da especificação) de uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre correspondente e, em caso de nesse período haver mudança de tipo de matéria-prima, o produtor deverá analisar um número de amostras correspondente ao número de tipos de matérias-primas utilizadas.

§ 10º Os dados de qualidade mencionados nos parágrafos oitavo e nono deste artigo deverão ser encaminhados, em formato eletrônico, seguindo os modelos disponíveis no sítio da ANP, para o endereço: cerbiodiesel@anp.gov.br.

§ 11º A ANP poderá cancelar o cadastro de laboratório indicado pelo Produtor, quando da detecção de não-conformidade quanto ao processo de certificação de biodiesel.

Art. 5º A documentação fiscal, referente às operações de comercialização e de transferência de biodiesel realizadas pelos Produtores e Importadores de biodiesel, deverá ser acompanhada de cópia legível do respectivo Certificado da Qualidade, atestando que o produto comercializado atende à especificação estabelecida no Regulamento Técnico.

Parágrafo único. No caso de cópia emitida eletronicamente, deverão estar indicados, na cópia, o nome e o número da inscrição no órgão de classe do responsável técnico pelas análises laboratoriais efetivadas.

Art. 6º A ANP poderá, a qualquer tempo, submeter os Produtores e Importadores de biodiesel, bem como os laboratórios contratados à inspeção técnica de qualidade sobre os procedimentos e equipamentos de medição que tenham impacto sobre a qualidade e a confiabilidade dos serviços de que trata esta Resolução, bem como coletar amostra de biodiesel para análise em laboratórios contratados.

§ 1º Esta inspeção técnica poderá ser executada diretamente pela ANP com apoio de entidade contratada ou órgão competente sobre os procedimentos e equipamentos de medição que tenham impacto na qualidade e confiabilidade das atividades de que trata esta Resolução.

§ 2º O produtor ou laboratório cadastrado na ANP ficará obrigado a apresentar documentação comprobatória das atividades envolvidas no controle de qualidade do biodiesel, caso seja solicitado.

Art. 7º É proibida adição ao biodiesel de: corante em qualquer etapa e quaisquer substâncias que alterem a qualidade do biodiesel na etapa de distribuição.

Art. 8º A adição de aditivos ao biodiesel na fase de produção deve ser informada no Certificado da Qualidade, cabendo classificar o tipo.

Art. 9º O não atendimento ao estabelecido na presente Resolução sujeita os infratores às sanções administrativas previstas na Lei nº 9.847, de 26 de outubro de 1999, alterada pela Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, e no Decreto nº 2.953, de 28 de janeiro de 1999, sem prejuízo das penalidades de natureza civil e penal.

Art. 10. Os casos não contemplados nesta Resolução serão analisados pela Diretoria da ANP.

Art. 11. Fica concedido, aos produtores e importadores de biodiesel, o prazo máximo de até 30 de junho de 2008 para atendimento ao disposto no Regulamento

Técnico anexo a esta Resolução, período no qual poderão ainda atender à especificação constante da Resolução ANP nº 42, de 24 de novembro 2004.

Art. 12. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação no Diário Oficial da União.

Art. 13. Fica revogada a Resolução ANP nº 42, de 24 de novembro 2004, observados os termos do art. 11 desta Resolução.

HAROLDO BORGES RODRIGUES LIMA

ANEXO

REGULAMENTO TÉCNICO ANP Nº 1/2008

1. Objetivo

Este Regulamento Técnico aplica-se ao biodiesel, de origem nacional ou importada, a ser comercializado em território nacional adicionado na proporção prevista na legislação aplicável ao óleo diesel conforme a especificação em vigor, e em misturas específicas autorizadas pela ANP.

2. Normas Aplicáveis

A determinação das características do biodiesel será feita mediante o emprego das normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), das normas internacionais "American Society for Testing and Materials" (ASTM), da "International Organization for Standardization" (ISO) e do "Comité Européen de Normalisation" (CEN).

Os dados de incerteza, repetitividade e reprodutibilidade fornecidos nos métodos relacionados neste Regulamento devem ser usados somente como guia para aceitação das determinações em duplicata do ensaio e não devem ser considerados como tolerância aplicada aos limites especificados neste Regulamento.

A análise do produto deverá ser realizada em uma amostra representativa do mesmo obtida segundo métodos ABNT NBR 14883 – Petróleo e produtos de petróleo – Amostragem manual ou ASTM D 4057 – Prática para Amostragem de Petróleo e Produtos Líquidos de Petróleo (Practice for Manual Sampling of

Petroleum and Petroleum Products) ou ISO 5555 (Animal and vegetable fats and oils – Sampling).

As características constantes da Tabela de Especificação deverão ser determinadas de acordo com a publicação mais recente dos seguintes métodos de ensaio:

2.1. Métodos ABNT

MÉTODO	TÍTULO
NBR 6294	Óleos lubrificantes e aditivos - Determinação de cinza sulfatada
NBR 7148	Petróleo e produtos de petróleo - Determinação da massa específica, densidade relativa e °API - Método do densímetro
NBR 10441	Produtos de petróleo - Líquidos transparentes e opacos - Determinação da viscosidade cinemática e cálculo da viscosidade dinâmica
NBR 14065	Destilados de petróleo e óleos viscosos - Determinação da massa específica e da densidade relativa pelo densímetro digital.
NBR 14359	Produtos de petróleo - Determinação da corrosividade - método da lâmina de cobre
NBR 14448	Produtos de petróleo - Determinação do índice de acidez pelo método de titulação potenciométrica
NBR 14598	Produtos de petróleo - Determinação do Ponto de Fulgor pelo aparelho de vaso fechado Pensky-Martens
NBR 14747	Óleo Diesel - Determinação do ponto de entupimento de filtro a frio
NBR 15341	Biodiesel - Determinação de glicerina livre em biodiesel de mamona por cromatografia em fase gasosa
NBR 15342	Biodiesel - Determinação de monoglicerídeos, diglicerídeos em biodiesel de mamona por cromatografia em fase gasosa
NBR 15343	Biodiesel - Determinação da concentração de metanol e/ou etanol por cromatografia gasosa
NBR 15344	Biodiesel - Determinação de glicerina total e do teor de triglicerídeos em biodiesel de mamona
NBR 15553	Produtos derivados de óleos e gorduras - Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos - Determinação dos teores de cálcio, magnésio, sódio, fósforo e potássio por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICPOES)
NBR 15554	Produtos derivados de óleos e gorduras - Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos - Determinação do teor de sódio por espectrometria de absorção atômica
NBR 15555	Produtos derivados de óleos e gorduras - Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos - Determinação do teor de potássio por espectrometria de absorção atômica
NBR 15556	Produtos derivados de óleos e gorduras - Ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos - Determinação de sódio, potássio, magnésio e cálcio por espectrometria de absorção atômica

NBR 15586	Produtos de petróleo - Determinação de microrresíduo de carbono
NBR 15764	Biodiesel - Determinação do teor total de ésteres por cromatografia em fase gasosa
NBR 15771	Biodiesel - Determinação de glicerina livre - Método Volumétrico

2.2. Métodos AST

MÉTODO	TÍTULO
ASTM D93	Flash Point by Pensky-Martens Closed Cup Tester
ASTM D130	Detection of Copper Corrosion from Petroleum Products by the Copper Strip Tarnish Test
ASTM D445	Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and the Calculation of Dynamic Viscosity)
ASTM D613	Cetane Number of Diesel Fuel Oil
ASTM D664	Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration
ASTM D874	Sulfated Ash from Lubricating Oils and Additives
ASTM D1298	Density, Relative Density (Specific Gravity) or API Gravity of Crude Petroleum and Liquid Petroleum Products by Hydrometer
ASTM D4052	Density and Relative Density of Liquids by Digital Density Meter
ASTM D4530	Determination of Carbon Residue (Micro Method)
ASTM D4951	Determination of Additive Elements in Lubricating Oils by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry
ASTM D5453	Total Sulfur in Light Hydrocarbons, Motor Fuels and Oils by Ultraviolet Fluorescence
ASTM D6304	Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils, and Additives by Coulometric Karl Fisher Titration
ASTM D6371	Cold Filter Plugging Point of Diesel and Heating Fuels
ASTM D6584	Determination of Free and Total Glycerine in Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography
ASTM D6890	Determination of Ignition Delay and Derived Cetane Number (DCN) of Diesel Fuel Oils by Combustion in a Constant Volume Chamber

2.3. Métodos EN/ ISO

MÉTODO	TÍTULO
EN 116	Determination of Cold Filter Plugging Point
EN ISO 2160	Petroleum Products – Corrosiveness to copper – Copper strip test
EN ISO 3104	Petroleum Products – Transparent and opaque liquids – Determination of kinematic viscosity and calculation of dynamic viscosity
EN ISO 3675	Crude petroleum and liquid petroleum products – Laboratory determination of density – Hydrometer method
EN ISO 3679	Determination of flash point – Rapid equilibrium closed cup method
EN ISO 3987	Petroleum Products – Lubricating oils and additives – Determination of sulfated ash
EN ISO 5165	Diesel fuels – Determination of the ignition quality of diesel fuels – Cetane engine
EN 10370	Petroleum Products – Determination of carbon residue – Micro Method
EN ISO 12185	Crude petroleum and liquid petroleum products. Oscillating U-tube
EN ISO 12662	Liquid Petroleum Products – Determination of contamination in middle distillates
EN ISO 12937	Petroleum Products – Determination of water – Coulometric Karl Fischer Titration
EN 14103	Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents
EN 14104	Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of acid value
EN 14105	Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of free and total glycerol and mono-, di- and triglyceride content – (Reference Method)
EN 14106	Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of free glycerol content
EN 14107	Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of phosphorous content by inductively coupled plasma (ICP) emission spectrometry
EN 14108	Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of sodium content by atomic absorption spectrometry
EN 14109	Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of potassium content by atomic absorption spectrometry
EN 14110	Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of methanol content
EN 14111	Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of iodine value
EN 14112	Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test)
EN 14538	Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of Ca, K, Mg and Na content by optical emission spectral analysis with inductively coupled plasma (ICP-OES)

EN ISO 20846	Petroleum Products – Determination of low sulfur content – Ultraviolet fluorescence method
EN ISO 20884	Petroleum Products – Determination of sulfur content of automotive fuels – Wavelength- dispersive X-ray fluorescence spectrometry

Tabela I: Especificação do Biodiesel

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m³	850-900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 - EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	Mm²/s	3,0-6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de Água, máx. (2)	mg/kg	500	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	EN ISO 12662
Ponto de fulgor, mín. (3)	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103
Resíduo de carbono (4)	% massa	0,050	15586	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	50	- -	5453	- EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número de Cetano (5)	-	Anotar	-	613 6890 (6)	EN ISO 5165

Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19 (7)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448 -	664 -	- EN 14104 (8)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 15771 - -	6584 (8) -	- EN 14105 (8) EN 14106 (8)
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344 -	6584 (8) -	- EN 14105 (10)
Mono, di, triacilglicerol (5)	% massa	Anotar	15342 15344	6584 (8)	- - EN 14105 (8)
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de Iodo (5)	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.(2)	h	6	-	-	EN 14112 (8)

Nota:

(1) LII – Límpido e isento de impurezas com anotação da temperatura de ensaio.

(2) O limite indicado deve ser atendido na certificação do biodiesel pelo produtor ou importador.

(3) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130°C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.

(4) O método ABNT NBR 15342 poderá ser utilizado para amostra oriunda de gordura animal.

(5) Para biodiesel oriundo de duas ou mais matérias-primas distintas das quais uma consiste de óleo de mamona:

- a) teor de ésteres, mono-, diacilgliceróis: método ABNT NBR 15342;
- b) glicerol livre: método ABNT NBR 15341;
- c) glicerol total, triacilgliceróis: método ABNT NBR 15344;
- d) metanol e/ou etanol: método ABNT NBR 15343.

(6) O resíduo deve ser avaliado em 100% da amostra.

(7) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da tabela de especificação a cada trimestre civil. Os

resultados devem ser enviados pelo produtor de biodiesel à ANP, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de matéria-prima, o produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de matérias-primas utilizadas.

(8) Poderá ser utilizado como método alternativo o método ASTM D6890 para número de cetano.

(9) O limite máximo de 19°C é válido para as regiões Sul, Sudeste, CentroOeste e Bahia, devendo ser anotado para as demais regiões. O biodiesel poderá ser entregue com temperaturas superiores ao limite supramencionado, caso haja acordo entre as partes envolvidas. Os métodos de análise indicados não podem ser empregados para biodiesel oriundo apenas de mamona.

(10) Os métodos referenciados demandam validação para as matérias-primas não previstas no método e rota de produção etílica.

ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA UTILIZANDO COLUNAS DE WINOGRADSKY CONTAMINADAS POR ÓLEO LUBRIFICANTE USADO E BIODIESEL

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Aluna: Karen Hosomi Teramae